

Amanda Alves Ribeiro

Efeitos epigenéticos de uma dieta com alto teor calórico e lipídico e da suplementação de micronutrientes em animais com lúpus

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

São Paulo

2024

Amanda Alves Ribeiro

Efeitos epigenéticos de uma dieta com alto teor calórico e lipídico e da suplementação de micronutrientes em animais com lúpus

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

Programa de Ciências do Sistema Musculoesquelético.

Orientadora: Profa. Dra. Carolina Nicoletti Ferreira Fino

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

São Paulo

2024

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Ribeiro, Amanda Alves

Efeitos epigenéticos de uma dieta com alto teor calórico e lipídico e da suplementação de micronutrientes em animais com lúpus / Amanda Alves Ribeiro; Carolina Nicoletti Ferreira Fino, orientadora. -- São Paulo, 2024.

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

1. Metilação do DNA 2. Ácido fólico 3. Vitamina B12 4. Tecido adiposo 5. Autoimunidade 6. Inflamação 7. Suplementação I. Fino, Carolina Nicoletti Ferreira, orient.; II. Título.

USP/FM/DBD-135/24

Responsável: Daniela Amaral Barbosa, CRB/8 7533

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Amanda Alves Ribeiro

Efeitos epigenéticos de uma dieta com alto teor calórico e lipídico e da suplementação de micronutrientes em animais com lúpus

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

Programa de Ciências do Sistema Musculoesquelético.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento:

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento:

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento:

Dedico este trabalho a minha irmã pelo companheirismo em todos os momentos da minha vida. Aos meus pais Luís Carlos (*In Memoriam*) e Ana Cristina por participarem ativamente de toda minha formação, por todo amor, cuidado e por serem meus maiores incentivadores desde o início, sempre me encorajando a nunca desistir dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, ele sabe de todas as coisas.

À minha mãe Ana Cristina, meu pai Luís Carlos e minha irmã Tayná, que sempre me incentivaram e proporcionaram meus estudos, o que, apesar de toda dificuldade, foi prioridade em suas vidas. Sem o apoio deles, não seria possível realizar este objetivo.

Aos professores que trilharam meu caminho até aqui, em especial à Dra. Caroline Aquino Moreira Nunes e Dra. Kalina Kelma Oliveira de Sousa por me inspirar, ensinar e por me fazer admirar cada etapa de uma pesquisa científica.

Aos companheiros de projeto, Lucas Carvalho, Letícia Lobato, Jhulia Caroline e Beatriz Garcia, pela parceria e colaboração no projeto, pelo acolhimento, suporte, incentivos, amizade e essenciais pausas para café. Obrigado de coração!

À minha orientadora Dra. Carolina Nicoletti Ferreira Fino por ser muito mais que uma orientadora para mim, obrigada por me acolher, ser amiga, companheira, e muitas vezes até uma mãe que cuida de todos os seus alunos de forma singular. Obrigada pela oportunidade da realização do sonho de fazer mestrado, trabalhar com epigenética, nutrigenética e pesquisa clínica na Faculdade de Medicina da USP e por ter confiado em mim para a realização deste projeto.

A todos os colaboradores do laboratório de Fisiologia aplicada à Nutrição da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste sonho, que me encorajaram a lutar por meus sonhos e por tornarem minha vida mais leve e feliz durante este percurso, os meus mais sinceros agradecimentos.

Por fim, agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro (processo nº 2021/09753-8) pela concessão de Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior (processo nº 2022/13266-8) e apoio na realização do projeto.

RESUMO

RIBEIRO AA: Efeitos epigenéticos de uma dieta com alto teor calórico e lipídico e da suplementação de micronutrientes em animais com lúpus [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2024.

Introdução: O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma condição complexa associada a uma desregulação imune, cuja fisiopatologia resulta da interação entre fatores genéticos, epigenéticos e ambientais, incluindo dieta. Assim, padrões de metilação do DNA vem emergindo como um elemento crucial no desenvolvimento da autoimunidade, progressão da doença e resposta aos tratamentos. Ainda, obesidade representa um risco adicional de complicações e piora no estado inflamatório e na gravidade do LES, provavelmente devido ao aumento da secreção de adipocinas inflamatórias. **Objetivo:** Este estudo exploratório teve como objetivo avaliar o perfil de metilação do DNA e a expressão dos genes Dnmt1, Il-6, TNF-alfa, Stat3 e Lep no tecido adiposo de um modelo animal de LES alimentado com ração padrão ou com alto teor calórico e lipídico; além de investigar os efeitos da suplementação com ácido fólico e vitamina B12 nessas variáveis. **Materiais e Métodos:** Trinta camundongos fêmeas da linhagem NZBWF1/J foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos de acordo com a ração a ser recebida durante 12 semanas do protocolo experimental: 1. Grupo Ração Padrão (SD, n = 7) que recebeu ração regular (4,2 kcal/g), 2. Grupo Obesidade (HFD, n = 7) que recebeu ração hipercalórica e hiperlipídica (6,6 kcal/g); 3. Grupo Ração Padrão Suplementada (SDS, n = 8) que recebeu ração regular suplementada e 4. Grupo Obesidade Suplementado (HFDS, n = 8) que recebeu ração hiperlipídica e hipercalórica suplementada. A suplementação consistiu em 8 mg de ácido fólico e 50 µg de vitamina B12 por kg de ração. Após as 12 semanas, foram coletadas amostras de tecido adiposo para extração de DNA e RNA, utilizando kits comerciais específicos. A análise de metilação do DNA foi realizada utilizando o ensaio Infinium Mouse Methylation BeadChip, enquanto a expressão gênica foi avaliada por reação em cadeia de polimerase. As mudanças ($\Delta\beta$) no nível de metilação de cada CpGs foram calculadas considerando $\Delta\beta$ com valor mínimo de 5%, $p < 0,001$ e taxa de falsa descoberta $< 0,05$. **Resultados:** Observou-se que os animais do grupo HFD ganharam o dobro do peso daqueles do grupo SD ($14,5 \pm 1,6$ g vs. $7,5 \pm 2,7$ g, $p < 0,05$); no entanto, não houve diferenças significativas do peso entre os grupos SDS vs. SD e HFDS vs. HFD. Foram identificados 193 sítios CpGs diferentemente metilados (DMCpGs) entre os grupos SD e HFD, associados a genes das vias de sinalização de insulina e migração transendotelial de leucócitos. Entre os grupos SD e SDS, foram encontrados 79 DMCpGs relacionados a genes da via de regulação da lipólise em adipócitos e interação citocina-receptor de citocina. A comparação entre os grupos HFD e HFDS revelou 356 DMCpGs relacionados a genes das vias de sinalização da insulina e detecção de DNA citosólico. Destaca-se que a expressão de TNF-alfa e Stat3 foi inferior nos grupos suplementados em comparação com aqueles não suplementados. **Conclusão:** Animais alimentados com ração hipercalórica e hiperlipídica apresentaram diferente perfil de metilação do DNA e expressão gênica do que aqueles alimentados com ração padrão, ressaltando a hipometilação de genes associados à inflamação e resistência à insulina. O perfil de metilação do DNA e a expressão dos genes alvos foi diferente entre animais alimentados com ração suplementada daqueles que receberam a ração padrão, modulando genes envolvidos na cascata de inflamação e autoimunidade.

Palavras-chaves: Metilação do DNA. Ácido fólico. Vitamina B12. Tecido adiposo. Autoimunidade. Inflamação. Suplementação.

ABSTRACT

RIBEIRO AA. Epigenetic effects of a high-calorie, high-fat diet and micronutrient supplementation in animals with lupus [dissertation]. São Paulo: Faculty of Medicine, University of São Paulo; 2024.

Introduction: Systemic lupus erythematosus (SLE) is a complex condition associated with immune dysregulation, where the pathophysiology results from the interaction between genetic, epigenetic, and environmental factors, including diet. Thus, DNA methylation patterns are emerging as a crucial element in the development of autoimmunity, disease progression, and response to treatments. Furthermore, obesity represents an additional risk for complications, exacerbating the inflammatory state and severity of SLE, likely due to the increased secretion of inflammatory adipokines. **Objective:** This exploratory study aimed to evaluate the DNA methylation profile and the expression of the genes *Dnmt1*, *Il-6*, *TNF-alpha*, *Stat3*, and *Lep* in adipose tissue of an SLE animal model fed either a standard diet or a high-calorie, high-fat diet; additionally, the study sought to investigate the effects of folic acid and vitamin B12 supplementation on these variables. **Materials and Methods:** Thirty female NZBWF1/J mice were randomly assigned into four groups according to the diet received over 12 weeks of the experimental protocol: 1. Standard Diet Group (SD, $n = 7$) receiving regular chow (4.2 kcal/g), 2. Obesity Group (HFD, $n = 7$) receiving high-calorie, high-fat chow (6.6 kcal/g); 3. Supplemented Standard Diet Group (SDS, $n = 8$) receiving regular chow with supplementation, and 4. Supplemented Obesity Group (HFDS, $n = 8$) receiving high-calorie, high-fat chow with supplementation. The supplementation consisted of 8 mg of folic acid and 50 μ g of vitamin B12 per kg of chow. After 12 weeks, adipose tissue samples were collected for DNA and RNA extraction using specific commercial kits. DNA methylation analysis was performed using the Infinium Mouse Methylation BeadChip assay, while gene expression was assessed by polymerase chain reaction. Changes ($\Delta\beta$) in methylation levels at each CpG site were calculated, considering a minimum $\Delta\beta$ value of 5%, $p < 0.001$, and a false discovery rate < 0.05 . **Results:** The HFD group animals gained twice as much weight as those in the SD group (14.5 ± 1.6 g vs. 7.5 ± 2.7 g, $p < 0.05$); however, there were no significant weight differences between the SDS vs. SD and HFDS vs. HFD groups. A total of 193 differentially methylated CpG sites (DMCpGs) were identified between the SD and HFD groups, associated with genes involved in insulin signaling and leukocyte transendothelial migration pathways. Between the SD and SDS groups, 79 DMCpGs were found related to genes in the adipocyte lipolysis regulation pathway and cytokine-cytokine receptor interaction. Comparing the HFD and HFDS groups revealed 356 DMCpGs related to genes in the insulin signaling and cytosolic DNA sensing pathways. Notably, *TNF-alpha* and *Stat3* expression was lower in the supplemented groups compared to the non-supplemented ones. **Conclusion:** Animals fed a high-calorie, high-fat diet displayed different DNA methylation and gene expression profiles compared to those fed a standard diet, highlighting hypomethylation of genes associated with inflammation and insulin resistance. The DNA methylation profile and target gene expression differed between animals fed a supplemented diet and those on a standard diet, modulating genes involved in the inflammation and autoimmunity cascade.

Keywords: DNA methylation. Folic acid. Vitamin B12. Adipose tissue. Autoimmunity. Inflammation. Supplementation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AANs – Anticorpos Antinucleares

Actb – beta-actina

Adcy5 – adenilato ciclase

ADIPOR1/2 – receptor de adiponectina

Adipo – gene adiponectina

AMPc – monofosfato de adenosina cíclico

AMPK – proteína quinase ativada por monofosfato-adenosina

AIN-93G – Instituto Americano de Nutrição

ATP – trifosfato de adenosina

cAMP – Monofosfato cíclico de adenosina

CCL21 – ligante de quimiocina 21

cDNA – ácido desoxirribonucléico complementar

CH3 – grupo metil

CpG – Citosina-fosfato-Guanina

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

pDCs – Células Dendríticas plasmocitóides

DNA – ácido desoxirribonucléico

DNMT – DNA metiltransferase

Dnmt3 – DNA metiltransferase 3

DMCpGs – sítios diferencialmente metilados

DIO – obesidade induzida por dieta

FAN – fator antinuclear

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Fasn – Ácido graxo sintase

FDR – taxa de descoberta falsa

FM-USP– Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

GLUT – transportador de glicose

HFD – Obesidade

HFDS – Obesidade suplementado

H3K18 – Acetilação da histona 3 na lisina na posição 18

HDL – lipoproteína de alta densidade

Hprt – hipoxantina guanina fosforibosil transferase

IMC – índice de massa corporal

IL-4 – interleucina 4

IL-6 (Il-6) – interleucina 6

IL-10 – interleucina 10

IL-13 – interleucina 13

IL-17 – interleucina 17

IFN – interferon tipo I

JAK2 – (Jak2) Janus tirosina quinase 2

KEGG – Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto

LES – lúpus eritematoso sistêmico

Lep – Leptina

MAPK– MAP quinase

RNA– ácido ribonucléico

RNA_m – ácido ribonucléico mensageiro

PCR – proteína c reativa

Ppars – receptores ativados por proliferadores de peroxissoma

PI3K – fosfoinositídeo 3-quinase

RT– qPCR reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa

SAH S –adenosilhomocisteína

SAM S –adenosilmetionina

SD –Ração padrão

SDS – Ração padrão suplementada

STAT3 (Stat3) – transdutor de sinal e ativador de transcrição 3

TAS – tecido adiposo subcutâneo

TGF-beta – fator de transformação do crescimento beta

TNF (Tnf) – alfa fator de necrose tumoral alfa

TSS200 e TS1500 – início da transcrição 200 e 1500

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais manifestações clínicas no lúpus eritematoso sistêmico.	23
Figura 2 - Tecido adiposo na obesidade e seus mecanismos celulares.	26
Figura 3 - Ciclo da metionina.	31
Figura 4 - Chegada dos animais ao Biotério de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.	39
Figura 5 - Gaiolas com os grupos separados por cores de acordo com o tipo de ração recebida no experimento.	40
Figura 6 - Delineamento experimental do estudo.	40
Figura 7 - Pesagem da ração.	41
Figura 8 - Pesagem dos camundongos.	41
Figura 9 - Incorporação do DNA nas lâminas (Beadchip) utilizadas para análises de metilação de DNA.	44
Figura 10 - Fluxograma representativo das etapas realizadas durante o estudo.	47
Figura 11 - Apresentação de <i>rash</i> malar como sinal do desenvolvimento da doença nos camundongos avaliados.	49
Figura 12 - Ingestão de ração pelos animais dos grupos ração padrão e ração hipercalórica e hiperlipídica.	50
Figura 13 - Peso corporal dos animais dos grupos ração padrão e ração hipercalórica e hiperlipídica.	50
Figura 14 - Quantidade de tecido adiposo abdominal.	51
Figura 15 - <i>Heatmap</i> dos sítios CpGs diferentemente metilados entre animais submetidos do grupo ração padrão e grupo ração hipercalórica e hiperlipídica.	52
Figura 16 - Caracterização das regiões gênicas e a distribuição genômica e cromossômica dos sítios diferencialmente metilados entre os animais dos grupos SD e HFD.	53
Figura 17 - Análise de enriquecimentos das CpGs diferentemente metiladas entre animais que receberam ração padrão e ração hipercalórica e hiperlipídica.	55

Figura 18 - Expressão gênica relativa no tecido adiposo de animais alimentados com ração padrão e ração hipercalórica e hiperlipídica.	56
Figura 19 - Ingestão de ração pelos animais dos grupos ração padrão e ração padrão suplementada.	57
Figura 20 - Peso corporal dos animais dos grupos ração padrão e ração padrão suplementada.	57
Figura 21 - Heatmap dos sítios CpGs diferentemente metilados entre animais submetidos do grupo ração padrão e grupo ração padrão suplementada.	58
Figura 22 - Caracterização das regiões gênicas e a distribuição genômica e cromossômica dos sítios diferencialmente metilados (DMCpGs) entre os animais dos grupos SD e SDS.	59
Figura 23 - Análise de enriquecimentos das CpGs diferentemente metiladas entre animais que receberam ração padrão e ração padrão suplementada.	61
Figura 24 - Expressão gênica relativa no tecido adiposo de animais alimentados com ração padrão e ração padrão suplementada.	62
Figura 25 - Ingestão de ração pelos animais dos grupos ração hipercalórica e hiperlipídica e ração hipercalórica e hiperlipídica suplementada.	63
Figura 26 - Peso corporal dos animais dos grupos ração hipercalórica e hiperlipídica e ração hipercalórica e hiperlipídica suplementada.	63
Figura 27 - <i>Heatmap</i> dos sítios CpGs diferentemente metilados entre animais submetidos do grupo ração hipercalórica e hiperlipídica e grupo ração hipercalórica e hiperlipídica. suplementada.	64
Figura 28 - Caracterização das regiões gênicas e a distribuição genômica e cromossômica dos sítios diferencialmente metilados (DMCpGs) entre os animais dos grupos HFD e HFDS.	65
Figura 29 - Análise de enriquecimentos das CpGs diferentemente metiladas entre animais que receberam ração hipercalórica e hiperlipídica e ração hipercalórica e hiperlipídica suplementada.	67
Figura 30 - Expressão gênica relativa no tecido adiposo de animais alimentados com ração hipercalórica e hiperlipídica e ração hipercalórica e hiperlipídica suplementada.	68

Figura 31 - Diagrama de Venn entre as CpGs diferentemente metiladas na comparação dos grupos.

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Divisão dos animais por grupos de acordo com a ração recebida no experimento.	39
Quadro 2 - Composição das rações regular ou hipercalórica e hiperlipídica.	43
Quadro 3 - Genes alvos e genes de referência avaliados no presente estudo.	45
Tabela 1 - Top 20 sítios CpGs diferencialmente metilados nos animais que receberam ração padrão quando comparados àqueles que receberam ração hipercalórica e hiperlipídica.	53
Tabela 2 - Top 20 sítios CpGs diferencialmente metilados nos animais que receberam ração padrão quando comparados àqueles que receberam ração padrão suplementada.	59
Tabela 3 - Top 20 sítios CpGs diferencialmente metilados nos animais que receberam ração hipercalórica e hiperlipídica quando comparados àqueles que receberam ração hipercalórica e hiperlipídica suplementada.	65

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 Doenças reumáticas	21
2.2. Lúpus Eritematoso Sistêmico	21
2.3. Obesidade e tecido adiposo como órgão secretor	24
2.4 A obesidade como possível fator agravante do LES	31
2.5 Metilação do DNA: implicações no LES e na obesidade	30
2.6 Papel dos nutrientes na maquinaria epigenética	33
3. OBJETIVOS	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1 Aspectos éticos	38
4.2 Animais	38
4.3 Desenho experimental	39
4.4 Rações	42
4.5 Análise dos níveis de metilação do DNA	43
4.6 Análise de expressão gênica	44
5. RESULTADOS	49
6. DISCUSSÃO	71
7. CONCLUSÃO	83
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
9. ANEXO	112

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune em que o sistema imunológico atua contra as células e tecidos do próprio organismo (1). A etiologia e os mecanismos patogênicos do LES ainda não foram totalmente elucidados, mas acredita-se que tenha relação intrínseca com fatores genéticos e epigenéticos, hormonais e ambientais (2,3). A doença caracteriza-se pelo aumento de citocinas séricas relacionadas com vias pró-inflamatórias e diferenças no perfil de autoanticorpos, com envolvimento multissistêmico que comumente é caracterizado por manifestações clínicas heterogêneas como as cutâneas, renais, musculoesqueléticas e hematopoiéticas (4). A ativação do sistema imunológico no LES é caracterizada por uma hiper resposta de células do sistema imune (linfócitos B e linfócitos T), inflamação crônica, deposição de imunocomplexos e perda de tolerância imunológica contra autoantígenos(5).

A obesidade surgiu como um fator importante no mal prognóstico de muitas doenças, inclusive as doenças autoimunes; por seu envolvimento nas vias de inflamação e imunidade, principalmente por sua inflamação crônica e de baixo grau caracterizada pela secreção de adipocinas e de citocinas pró-inflamatórias(6). Além disso, a obesidade também pode agravar o curso das doenças e prejudicar a resposta às terapias(6). Ainda, ressalta-se que a prevalência de obesidade entre pacientes com LES é alta, atingindo cerca de 30 a 40% (7,8).

Na literatura atual existem poucos dados disponíveis que explicam a ligação entre obesidade e o LES (9) Um estudo experimental demonstrou haver um possível efeito indutor da leptina (adipocina pró-inflamatória que se encontra elevada na obesidade) no desenvolvimento de autoimunidade em modelos murinos com tendência aos LES (10). Outros estudos demonstraram que a obesidade está associada a um processo inflamatório caracterizado pelo aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF)-alfa, interleucina (IL)-6 e proteínas C reativa (PCR) (11–14), o que parece estar associado ao LES (15). Ainda, autores sugerem que leptina e adiponectina são possíveis mediadores que conectam obesidade e LES (16). Atualmente, a compreensão das condições metabólicas e moleculares específicas da obesidade associada ao LES é limitada e o papel da epigenética nessa conexão vem sendo cada vez mais explorado. Existem evidências de que genes pró-inflamatórios (como IL-10 e IL-

13) estão hipometilados em células imunes de pacientes com LES, o que leva ao aumento de sua expressão gênica, com consequente desbalanço na cascada de inflamação(17).

Considerando os mecanismos de metilação do DNA, evidências apontam que o perfil de metilação do DNA está relacionado à disponibilidade de nutrientes específicos, como folato e vitamina B12 (18,19). Esses nutrientes participam do metabolismo de um carbono que fornece os grupos metil para as reações de metilação biológica (19,20). Assim, a biodisponibilidade de S-adenosilmetionina (SAM), o substrato para as reações de metiltransferase, é regulada pela ingestão dietética de folato, vitamina B2, B6 e B12 (21). Estudos anteriores *in vivo* mostraram que a deficiência ou excesso de doadores de metil nas dietas podem ter impactos massivos no ciclo da metionina, o que resulta em alterações marcantes dos substratos metabólicos, por exemplo, SAM, S-adenosilhomocisteína (SAH) e homocisteína, acarretando a hipometilação ou hipermetilação global do DNA (22,23).

Nesse sentido, o presente estudo vem testar a hipótese de que existe um perfil de metilação do DNA distinto entre animais com LES e aqueles com LES e obesidade, o que acarreta também em diferença na expressão gênica. Ainda, que o uso de micronutrientes doadores de agrupamento metil (ácido fólico e vitamina B12) por meio da suplementação pode modular o perfil de metilação do DNA e de expressão gênica.

Revisão da literatura

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Doenças reumáticas

As doenças reumáticas possuem uma etiologia complexa que ainda não está totalmente compreendida. De maneira geral, são caracterizadas como um grupo heterogêneo de distúrbios que afetam os tecidos articulares, do sistema musculoesquelético e, em alguns casos, órgãos como a pele, coração, rins e pulmão (24). Estas doenças apresentam um grande impacto na qualidade de vida dos indivíduos, comprometendo as suas capacidades físicas e motoras (25,26).

A patogênese das doenças reumáticas é multifatorial e envolve uma interação de fundo genético e vários fatores ambientais (27). Dentre as principais condições que estão incluídas no grupo de doenças reumáticas são artrite reumatoide, esclerose sistêmica e LES, foco principal desse estudo (25).

2.2 Lúpus Eritematoso Sistêmico

O LES é uma doença multifatorial de caráter autoimune que apresenta grande heterogeneidade de manifestações clínicas, afetando vários órgãos e tecidos. Se desenvolve a partir de características genéticas do indivíduo e de sua interação com fatores ambientais (28). É uma doença predominantemente feminina caracterizada por perda de tolerância imunológica, produção de células B autoimunes e produção de autoanticorpos patogênicos (29). Indivíduos com LES apresentam em sua sorologia altas concentrações de autoanticorpos, incluindo anticorpos anti-dsDNA e antinucleares (ANAs), que formam um complexo imune patogênico, o qual induz uma inflamação dependente do complemento (30).

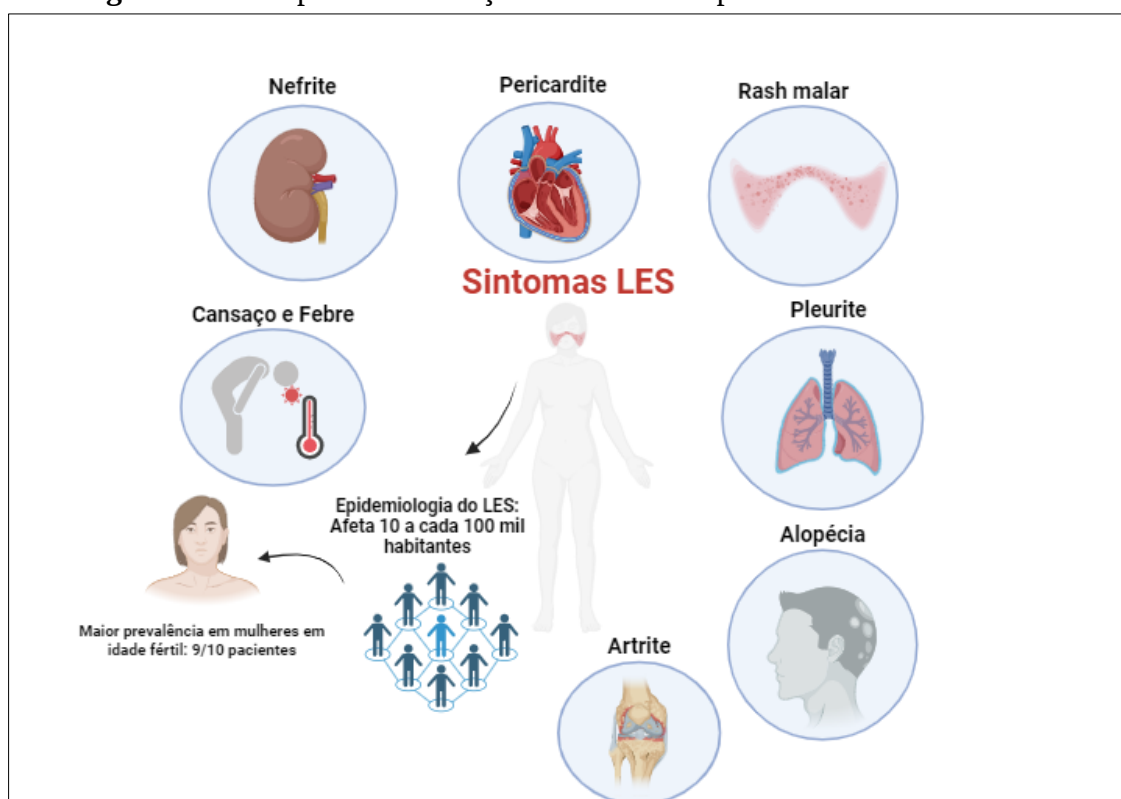
A mortalidade substancial, o curso da doença crônica e a dependência excessiva da terapia com corticosteroides contribuem para o dano de órgãos em longo prazo, levando até ao risco de morte (31). A complexidade das manifestações clínicas e o desafio do diagnóstico dificultam a realização de estudos epidemiológicos do LES. No entanto, sabe-se que a incidência e prevalência do LES no contexto global varia de acordo com a população demográfica, fatores socioeconômicos e etnia, sendo mais prevalente na população hispânica, asiática e negra (32). Apesar da prevalência do LES em todas as

faixas etárias, esta é mais comum entre as idades de 15 e 45 anos (33). A disparidade de gênero do LES também é amplamente reconhecida, com uma incidência e prevalência de LES geralmente maior em mulheres, em uma proporção de 1:9 de homens para mulheres (34). No Brasil, estima-se que existam cerca de 65.000 indivíduos acometidos com LES, com uma faixa etária média de 30 anos e de etnia não branca (3).

No contexto de diagnóstico do LES, há uma grande discussão devido a sua alta variedade tanto no viés genético quanto fenotípico, que está associado as manifestações clínicas da doença. Desse modo, a confirmação do diagnóstico do LES pode ser realizada por meio de alguns exames laboratoriais. A pesquisa de autoanticorpos e fator antinuclear (FAN) são elementos indispensáveis em caso de suspeita clínica de doenças autoimunes, sendo a presença de AANs e anti -dsDNA o alicerce básico para detectar a presença e o desenvolvimento do LES (35). Além disso, também é necessário considerar a história clínica do indivíduo (35). O diagnóstico do LES em muitos casos ocorre tardiamente devido à grande variação da sintomatologia e a evolução heterogênea da doença (36); no entanto, há um método classificatório muito utilizado, conhecido como critérios de classificação do LES do *American College of Rheumatology* que objetiva estabelecer uma padronização de critérios clínicos para identificação e diagnóstico da doença. a partir de 11 fatores classificatórios, o diagnóstico é feito pela apresentação clínica de pelo menos quatro ou mais dos fatores: *rash* malar, lesão discoide, fotossensibilidade, úlceras orais/nasais, artrite, serosite, comprometimento renal, alterações neurológicas, alterações hematológicas, alterações imunológicas e anticorpos antinucleares (35) (Figura 1).

No LES todos os componentes do sistema imune parecem estar envolvidos nos mecanismos de indução, manutenção e progressão da doença (37). Além disso, tem sido sugerido que os hormônios sexuais por exemplo, os estrogênios, desempenham um papel importante na sua patogênese (38). De fato, os hormônios sexuais são potentes reguladores da função imune a nível da produção de citocinas. Assim, a fisiopatologia do LES compreende múltiplas variedades de respostas celulares e moleculares de participantes ativos da resposta imune inata e adaptativa (38). Em essência, a patogênese do LES caracteriza-se por promover quadros inflamatórios em todos os órgãos, o que determina sua apresentação clínica heterogênea, envolvendo uma cascata de citocinas pró-inflamatórias e imunocomplexos (39).

Figura 1 - Principais manifestações clínicas no lúpus eritematoso sistêmico.



LES: lúpus eritematoso sistêmico.

Fonte: Autoria Própria.

Nesse sentido, a fisiopatologia do LES pode ser resumida por quatro características principais: 1. produção excessiva de células apoptóticas e eliminação reduzida de material apoptótico com vias de complemento defeituosas; 2. estimulação de antígeno nuclear de células imunes inatas, como células dendríticas plasmocitóides (pDCs) e produção aberrante de interferon tipo I (IFN); 3. alterações da tolerância das células T acentuada pela diminuição das células T reguladoras (Tregs) e alterações nas populações de células T; e 4. quebra na tolerância das células B, ativação das células B e produção de autoanticorpos (40,41). Além disso, já está bem descrito na literatura que o LES está fortemente associado a um quadro inflamatório com função anormal das células T, produção anormal de citocinas e aumento da resposta imune (41). Autores sugerem que este aumento da produção de citocinas e de autoanticorpos no LES está relacionado à hipometilação da região reguladora de DNA em células T (42). Ainda, pesquisadores apontam a importância da metilação do DNA no desenvolvimento do LES, visto que a hipometilação do DNA de genes de cascatas da inflamação parece desempenhar um papel importante na etiologia desta doença (42).

A finalidade terapêutica do tratamento do LES se baseia na remissão da doença e manutenção dos níveis de atividade de sua resposta inflamatória. O tratamento do LES é individualizado devido a heterogeneidade da doença e geralmente é realizado com base nas manifestações clínicas dos pacientes. O manejo medicamentoso frequentemente utilizado para o controle da atividade da doença é principalmente composto de imunossupressores como metotrexato e a ciclofosfamida; corticosteroides; imunoglobulinas e antimaláricos (43). As condutas baseadas nos parâmetros utilizados no tratamento são feitas de acordo com as manifestações clínicas do paciente e por meio do monitoramento e verificação da resposta ao tratamento e a qualidade de vida (44). No entanto, em casos potencialmente mais graves se faz necessária uma conduta mais específica devido ao potencial risco de danos em órgãos alvo (45).

2.3 Obesidade e tecido adiposo como órgão secretor

A obesidade é uma doença complexa de etiologia multifacetada, com sua própria fisiopatologia, comorbidades e aspectos debilitantes (15). Atualmente, um dos principais focos de pesquisas em obesidade é o tecido adiposo, devido a uma revolução nas últimas décadas sobre o entendimento de sua função biológica (46). As diferentes respostas aos diversos tratamentos e uma compreensão mais detalhada dos mecanismos moleculares envolvidos na obesidade, tem sido cada vez mais relacionados com as características celulares do tecido adiposo (47).

O tecido adiposo por muito tempo foi reconhecido somente como um tecido conjuntivo com função de sintetizar e armazenar lipídeos em forma de gotículas de gordura, fornecer isolamento aos órgãos e proteção contra choques mecânicos, atuar como isolante térmico e ainda ser a maior reserva de energia do corpo humano ((48)). No entanto, à medida que a ciência avançou nas últimas décadas, vem se descobrindo uma nova face desse tecido, que ultrapassa estas não menos importantes atividades, na qual se destaca sua função imune endócrina, caracterizada pela produção e secreção de hormônios, citocinas e adipocinas(49).

As adipocinas como anteriormente citadas são citocinas secretadas pelos adipócitos. As citocinas são definidas como proteínas solúveis sintetizadas por células imunes ou não, que mediam a comunicação intracelular por transmitirem informações às células-alvo, via interações com receptores específicos(50). Desse modo, as adipocinas

tem importante função fisiológica no organismo desde, por exemplo, a regulação do metabolismo lipídico à homeostase energética. As principais adipocinas secretadas pelo tecido adiposo são a leptina e adiponectina (50). Ainda, os adipócitos são capazes de secretar diversas citocinas inflamatórias como as interleucinas (e.g. IL-6, IL-10, IL-17), TNF-alfa e proteínas de fase aguda (51).

O tecido adiposo magro e saudável é caracterizado pela presença de células T reguladoras anti-inflamatórias (Tregs) e macrófagos de um fenótipo M2, alternativamente ativado, que promovem a regulação positiva de fatores anti-inflamatórios, como IL-10 ou adiponectina, e a regulação negativa de citocinas pró-inflamatórias, associando-se ao reparo tecidual e à resolução da inflamação. Por outro lado, a hipertrofia dos adipócitos geralmente não permite que haja uma irrigação adequada do tecido, ocasionando uma hipóxia tecidual, com consequentemente morte celular (52). Essa hipertrofia induz à infiltração de macrófagos de fenótipo M1 e ao aumento da inflamação com produção aumentada de adipocinas pró inflamatórias, como TNF-alfa e IL-6. Isso é acompanhado por uma desregulação da secreção de leptina, adiponectina e resistina, e aumento da infiltração de células T citotóxicas CD8, com diminuição de células auxiliares CD4 (53). Ainda, tal processo inflamatório induz a secreção de espécies reativas de oxigênio e mudanças no estado redox, levando a um aumento do estresse oxidativo no tecido adiposo (54). Nesse sentido, a inflamação é uma importante desordem metabólica que se associa de forma dinâmica com a obesidade (55,56) (Figura 2).

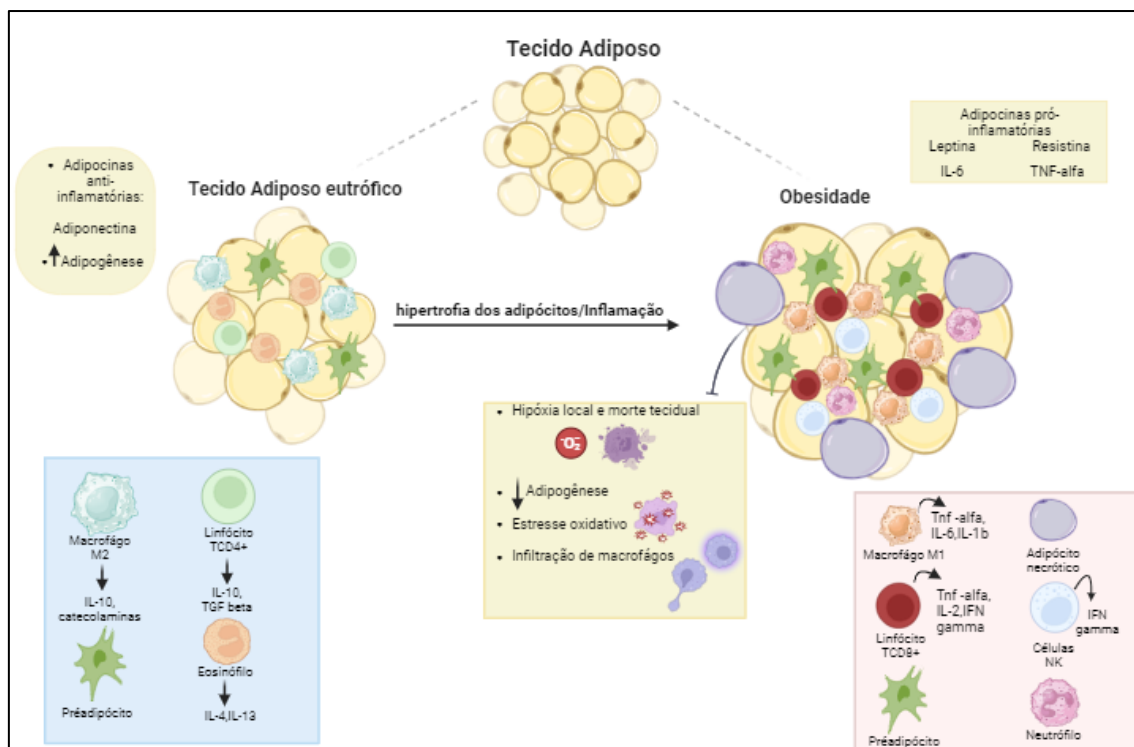
2.3.1 *Leptina*

Na década de 90, por meio de estudos em modelos experimentais de camundongos com obesidade, a leptina foi identificada pela primeira vez (57). Autores demonstraram que camundongos pertencentes a cepa ob/ob, portadores de uma mutação disfuncional do gene da leptina, eram obesos e tinha o apetite aumentado (58).

O principal local de ação da leptina é o cérebro, especificamente tronco cerebral e hipotálamo. No tronco cerebral, a sua principal atividade é modular a saciedade e o controle da recompensa e da aversão. No hipotálamo, a leptina atua como um ator importante na regulação do apetite e da homeostase energética, ou seja, seu papel fisiológico primário é atuar no sistema nervoso central, regulando o gasto energético e o equilíbrio entre a ingestão de alimentos. A leptina exerce suas ações ligando-se aos

receptores de leptina na superfície das células, principalmente no tecido intestinal, neuronal, hepático, pancreático, cardíaco e perivascular (59).

Figura 2 - Tecido adiposo na obesidade e seus mecanismos celulares.



IL6: interleucina 6; Tnf-alfa: fator de necrose tumoral; IFN-gama: interferon gama; TGF-beta: Fator de transformação do crescimento beta; IL-4: interleucina 4, IL-13: interleucina 13; IL-10: interleucina 10; M1: macrófagos M1; M2: macrófagos M2.

Fonte: Autoria Própria

Os receptores de leptina pertencem à família dos receptores de citocinas, que compreende em pelo menos cinco diferentes isoformas: o receptor longo (Ob-Rb), os receptores curtos (Ob-Ra, c e d), além do receptor solúvel (Ob-Re). O receptor longo (Ob-Rb) é o mais descrito na literatura, possui um domínio intracelular de 302 aminoácidos e é expresso em algumas regiões do cérebro, participando da ativação de vias críticas de segundos mensageiros e agindo em resposta às ações centrais da leptina(60). À medida que a leptina se liga ao seu receptor de leptina, ocorre a ativação da janus tirosina quinase 2 de (Jak2) a qual, por sua vez, leva à fosforilação proteínas alvo citoplasmáticas, incluindo o transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT3). O STAT3 fosforilado liga-se e regula genes alvo, desempenhando a função fisiológica da leptina. Dessa maneira, o STAT3 atua como um fator de transcrição responsável pela mediação das ações primárias da leptina (61) .

Na obesidade, a leptina está superexpressa no tecido adiposo(59) . Por outro lado, outros estudos demonstraram que indivíduos com obesidade parece apresentar expressão alterada da leptina e do seu receptor, levando a um estado denominado resistência à leptina (62) À medida que a obesidade progride gradualmente com o aumento da massa do tecido adiposo (como resultado de um desequilíbrio entre a ingestão e o gasto energético), é tipicamente observado um aumento concomitante proeminente nos níveis circulantes de leptina; entretanto a sensibilidade a leptina é reduzida, podendo levar aos distúrbios metabólicos associados (63).

2.3.2 *Adiponectina*

A adiponectina, também conhecida como proteína complementar relacionada com o adipócito (Acrp30), é uma proteína plasmática de aproximadamente 30 kDa, relativamente abundante, secretada especificamente pelo tecido adiposo(64). Além disso, é a adipocina mais abundante na circulação, e seus níveis se apresentam inversamente correlacionados ao índice de massa corporal (IMC), aos níveis de triglicerídeos e à resistência à insulina (64).

Seus efeitos biológicos dependem não somente dos seus níveis circulantes na corrente sanguínea, mas também da especificidade tecidual e de seus receptores (ADIPOR1 e ADIPOR2). Estes são encontrados em maior quantidade no músculo estriado esquelético e no fígado, respectivamente. Dentre suas principais funções, a adiponectina diminui a resistência à insulina, aumentando a oxidação dos ácidos graxos e estimulando a utilização da glicose. Por exemplo, a ligação da adiponectina aos seus receptores (ADIPOR1) em células musculares promove a ativação da proteína quinase ativada por monofosfato-adenosina (AMPK) (65), aumentando a beta-oxidação de ácidos graxos e a captação da glicose. Por outro lado, a ligação da adiponectina aos seus receptores (ADIPOR2) em células hepáticas promove a ativação da AMPK, com consequente inibição da gliconeogênese e aumento da oxidação de ácidos graxos. Assim, altas concentrações séricas de adiponectina estão associadas com o decréscimo do nível de triglicerídeos, aumento da sensibilidade à insulina, aumento dos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL) e efeitos anti-vasculares e anti-inflamatórios (66).

No entanto, a concentração de adiponectina está diminuída em indivíduos com obesidade (67). Na obesidade, diversas alterações que ocorrem no microambiente dos

adipócitos são responsáveis por inibir a expressão e/ou secreção de adiponectina, como, por exemplo, o aumento da expressão de IL-6 (68) ,TNF-alfa (68,69), a micro hipóxia (70) e o estresse do retículo endoplasmático (71).

2.3.3 *TNF-alfa*

O TNF-alfa é considerado uma citocina pró-inflamatória multifuncional com a capacidade de exercer uma diversidade de funções biológicas e celulares em tecidos distintos por meio da interação com os seus receptores específicos. Além disso, pode ser secretado por macrófagos ativados, linfócitos ou monócitos (72). Desempenha um papel crucial na imunidade inata e adaptativa, proliferação celular e no processo de apoptose. Seu principal efeito fisiológico é promover a resposta imune e a inflamatória por meio do recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da infecção, além de ativá-los. Quando liberado em pequenas concentrações, estimula as células endoteliais a secretarem quimiocinas com ação quimiotática em relação aos leucócitos, promovendo um processo inflamatório local (73).

Nesse cenário, alguns estudos evidenciaram expressão elevada de TNF-alfa no tecido adiposo de múltiplos modelos experimentais de obesidade (74,75). Ainda, estudos clínicos também mostraram aumento das concentrações de TNF-alfa em indivíduos com elevado IMC, sugerindo importante papel do TNF-alfa na regulação da sensibilidade à insulina (76,77) e outras comorbidades associadas a obesidade (78).

2.3.4 *Interleucina-6*

A IL-6 é uma importante citocina pleiotropica com atividade inflamatória e anti-inflamatória que medeia uma série de funções fisiológicas, incluindo a diferenciação de linfócitos, proliferação e sobrevivência celular, além de potencializar sinais apoptóticos (79) . Na cascata de sinalização da IL-6, a citocina ativa seu receptor por meio das vias MAP quinase (MAPK) e fosfoinosítídeo 3-quinase (PI3K), desencadeando, posteriormente, a sinalização intracelular pela via da JAK/STAT. Assim, a IL-6 está intimamente relacionada com a imunidade inata e adaptativa (80). No sistema imune, a IL-6 é a principal indutora dos reagentes de fase aguda e modula respostas de linfócitos

T e B. Além disso a IL-6 junto com o TNF-alfa e a IL-1b promovem a produção de quimiocinas, ativando fagócitos (79).

As concentrações plasmáticas de IL-6 podem refletir a extensão da adiposidade, sendo que esta citocina tem sido associada à orquestração complexa da regulação imunológica alterada no tecido adiposo de indivíduos com obesidade (81).

2.4 A obesidade como possível fator agravante do LES

Evidências recentes apontam o aumento da prevalência de sobrepeso e obesidade entre os indivíduos com LES, chegando a cerca de 40% (16). Acredita-se que a terapia prolongada com glicocorticoides, o sedentarismo, os maus hábitos alimentares, assim como o agravamento do quadro clínico causado pelo perfil inflamatório exacerbado que influencia nos sintomas musculoesqueléticos, diminuindo a mobilidade dos pacientes, são caracterizados como importantes contribuidores para o desenvolvimento da obesidade em pacientes com LES (8,82). Por exemplo, o uso de corticosteroides por esses pacientes tem importante associação ao ganho de peso, pois relaciona-se com aumento na retenção hídrica e aumento significativo do apetite (83) .

De maneira importante, alguns estudos vêm demonstrando que a obesidade tem papel biológico na aceleração da patogênese do LES (82,84–87), entretanto, as causas ainda não foram totalmente elucidadas. Dados recentes evidenciaram que uma dieta hiperlipídica aumentou a incidência de proteinúria grave e intolerância à glicose em modelos animais de LES (88) Já um recente estudo transversal com mulheres com LES mostrou que aquelas com excesso de peso corporal apresentaram maior atividade da doença do que as mulheres com peso corporal adequado(89). Nesse cenário, o tecido adiposo e as citocinas por ele secretadas (como detalhadas na seção anterior) apresentam papel importante nessa relação. Sabe-se que a obesidade está associada à alteração da função sistêmica imunológica, tanto em imunidade inata e adaptativa (90)por meio de vários mecanismos, nos quais o aumento do tamanho dos adipócitos e da secreção de leptina e citocinas inflamatórias é o principal (91).

De maneira interessante, um estudo *in vivo* demonstrou que a ativação imunológica geral e a produção de autoanticorpos anti-DNA foram aumentadas em camundongos com LES alimentados com dieta rica em gordura (92). Outros pesquisadores, em um ensaio clínico, observaram que pacientes com obesidade e LES no

início da infância apresentavam níveis séricos de TNF-alfa mais elevados quando comparados a pacientes com LES sem obesidade e grupos controles saudáveis (93). Tais dados sugerem que o aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias pode acarretar exacerbação da inflamação já presente no LES (94). Por outro lado, outros estudos mostraram que a leptina poderia promover a sobrevivência e proliferação de células T autorreativas em um modelo de LES (49, 50).

No ambiente obesogênico e no contexto de modificações genéticas do eixo leptina/receptor de leptina podem induzir alterações críticas nos níveis ou na ação da leptina de uma maneira que acelera disfunções metabólicas, resultando em estado hiperfágico e expansão do tecido adiposo. Como resultado, inicia-se um ciclo vicioso em que ocorrem hiperleptinemia e resistência à leptina, levando por sua vez ao aumento da ingestão de alimentos e ao aumento de gordura, que é seguido pela superprodução de leptina aumentando o risco de desenvolver condições metabólicas (95).

2.5 Metilação do DNA: implicações no LES e na obesidade

A epigenética é caracterizada por mudanças reversíveis no genoma que não tem relação com alteração nas sequências de nucleotídeos do DNA (96). Compreende um conjunto de mecanismos que promovem a regulação da expressão gênica a nível transcricional (97). Desse modo, alterações epigenéticas impactam na forma como a molécula de DNA é formatada, e consequentemente, regula quais genes permanecerão ativos, influenciando na fisiologia e no metabolismo de um organismo (98). A maquinaria epigenética pode ser influenciada por vários fatores, como fatores ambientais, processo de envelhecimento, nutrição, exposição aos raios ultravioletas, infecções virais, dentre outros (99).

Dentre os principais mecanismos epigenéticos destaca-se a metilação de DNA, a expressão de RNAs não codificantes e as modificações de histonas (e.g. metilação, fosforilação e acetilação) (97,100). Os processos epigenéticos são particularmente importantes no início da vida, quando as células estão recebendo pela primeira vez as instruções que ditarão seu futuro desenvolvimento (101). A comparação do mapa epigenômico de uma célula ou tecido saudável com o mapa da mesma célula ou tecido após uma exposição ambiental ou em relação a uma doença específica auxilia a

compreender melhor como o ambiente afeta os genes por meio de processos epigenéticos (100).

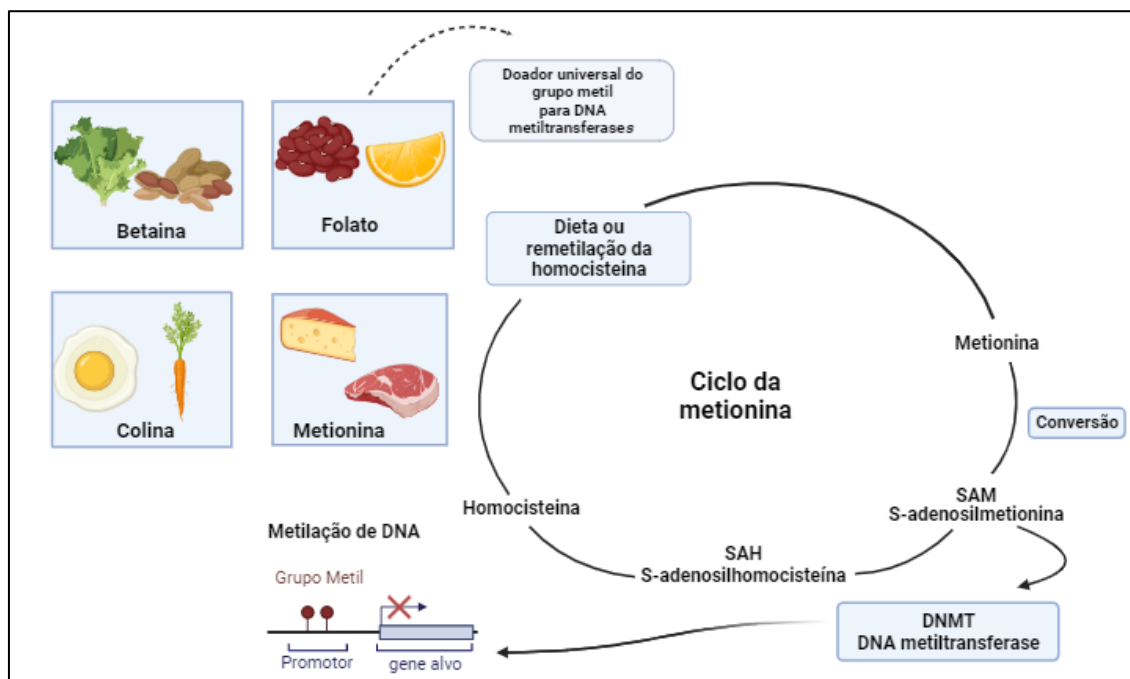
A metilação do DNA é o mecanismo epigenético mais comumente estudado. Refere-se à adição de um grupo metil (CH_3) na posição 5' da citosina na molécula de DNA (102)(103). Em mamíferos, a metilação de DNA ocorre na base nitrogenada citosina antecedendo uma guanina, nos chamados sítios CpG (104). Essa ligação altera a conformação do DNA, tornando os genes mais ou menos ativos em seu papel de produzir proteínas (104). Dito isso, a metilação do DNA é responsável pela regulação da expressão gênica, mais especificamente nos processos de silenciamento de genes (105).

Vários fatores podem influenciar os níveis de metilação do DNA, seja por meio da diminuição da atividade enzimática das enzimas DNA metiltransferases (DNMTs), por alterações nas enzimas relacionadas ao ciclo da metionina, ou pela diminuição da disponibilidade de doadores de agrupamento metil obtidos por meio da dieta ou suplementos alimentares (vitaminas do complexo B) (19,42,106). Vários nutrientes dietéticos chamados de nutrientes doadores de grupo metil como o folato, vitamina B12, metionina, colina e betaina são essenciais no processo de metilação de DNA. Tais nutrientes participam do metabolismo de um carbono, sendo precursores de S-adenosil metionina (SAM). O ciclo se inicia por meio da metionina proveniente da dieta que pode ser convertida a S-adenosilmetionina através da ação da enzima metionina-adenosiltransferase, que catalisa a transferência da adenosina para a metionina. As enzimas DNMTs são responsáveis pela transferência de grupos metil do SAM para a posição carbono-5 das bases citosina, gerando 5-metilcitosina e convertendo SAM em S-adenosilhomocisteína (SAH) que é hidrolisada com a ajuda da enzima adenosilhomocisteína-hidroxilase à homocisteína (107) (Figura 3).

Sabe-se que padrões de metilação do DNA alterados relacionam-se a etiologia e fisiopatologia de diversas doenças e distúrbios metabólicos como o LES e a obesidade (108,109). Nesse cenário, a atividade e progressão do LES tem sido negativamente associada a padrões de metilação do DNA (110). Evidências apontam que pacientes com LES ativo apresentam uma hipometilação global do DNA em linfócitos, resultando em expressão aumentada de células T CD4^+ (111–113), a qual se correlaciona inversamente com a atividade da doença(114). Outros estudos têm demonstrado que os mecanismos epigenéticos envolvidos na patogênese do LES afetam a expressão de genes responsáveis pela regulação da função das células do sistema imune (102,115,116). Mais

especificamente, autores evidenciaram, em humanos, hipometilação de genes codificantes de citocinas inflamatórias como IL-6, IL-17 e TNF-alfa (115) e IL-10 e IL-13 (117).

Figura 3 - Ciclo da metionina.



DNMT: DNA metiltransferase. SAM: S-adenosilmetionina. SAH: s-adenosilhomocisteína.

Fonte: Autoria Própria.

O aumento da expressão de algumas citocinas, como IL-10 e IL-13 permite o recrutamento e ligação aos fatores de transcrição da família STAT (e.g. STAT3) que, por sua vez, co-recruta o coativador transcricional p300. Devido à sua função de atividade de histona acetilase, o p300 suporta a descompactação da cromatina através da acetilação do H3K18 e aumenta a expressão gênica (111,117,118). Este aumento da expressão de IL-10 nas células T promove a atividade das células B no LES. Além disso, a STAT3 apresenta funções críticas nas células T por meio da sinalização e diferenciação por Th17 que é o principal produtor de citocinas da família IL-17, que medeia o recrutamento de neutrófilos e induz a liberação de outras citocinas pró-inflamatórias, que juntas promovem danos teciduais em várias doenças autoimunes, incluindo o LES (119,120)

Ainda, outros estudos vêm avaliando o papel das DNMT, especialmente a DNMT1, na hipometilação associada ao LES, porém os resultados são contraditórios. A

DNMT1 é responsável pela remetilação do DNA durante a divisão celular, restaurando e conservando os padrões de metilação da cadeia de DNA paterna, por isso assim chamada de metiltransferase de manutenção (110). Enquanto alguns autores evidenciaram uma menor expressão do gene DNMT1 nos pacientes com LES quando comparados a controles saudáveis, outros observaram uma maior expressão de DNMT1 nos indivíduos com LES (121,122).

Em se tratando da obesidade, um estudo utilizando um modelo de camundongo com obesidade induzida por dieta (DIO), apresentou que a expressão de RNAm de Dnmt1 e Dnmt3a foi elevada no tecido adiposo (123). Corroborando com estes resultados, um estudo identificou que níveis elevados de Dnmt1 parecem estar associados a inflamação associada à obesidade e a resistências à insulina, promovendo a hipermetilação do *locus* Adiponectina, C1Q e domínio de colágeno (Adipoq) (124).

São escassos os estudos que avaliam o perfil de metilação de DNA no LES, considerando a obesidade como fator contribuidor. Em um estudo realizado com pacientes com LES e obesidade ou peso adequado mostrou que a hipometilação do DNA em células T CD4⁺ ocorrem extensivamente em pacientes com LES, entretanto, são muito mais pronunciadas naqueles com obesidade. Ainda, pacientes com LES e obesidade apresentaram menor expressão de DNMT1 (125).

2.6 Papel dos nutrientes na maquinaria epigenética

Certos nutrientes encontrados na dieta (e.g. folato, metionina, colina e algumas vitaminas do complexo B) podem atuar como doadores de metil ou atuarem como cofatores para enzimas envolvidas em processos epigenéticos (19) e diversos estudos têm mostrado o papel desses nutrientes sob os padrões de metilação do DNA (22,126,127). Esses nutrientes estão envolvidos no metabolismo de 1-carbono e são cruciais para manter a regulação epigenética adequada, a expressão gênica e a homeostase dos processos celulares e moleculares (128). A vitamina B9 (folato) é uma vitamina essencial e solúvel em água encontrada em alimentos como vegetais folhosos escuros (e.g. espinafre, repolho, alface e brócolis), leguminosas (e.g. feijão, lentilha e ervilha), frutas cítricas (e.g. laranja), fígado e grãos fortificados (e.g. farinha de trigo) (129). O folato é um componente importante no metabolismo e crucial em vários processos biológicos, incluindo síntese, reparo e metilação do DNA (130). A vitamina B12 (cobalamina) é uma

vitamina solúvel em água, encontrada principalmente em alimentos de origem animal, como carne e peixes, ovos, laticínios, e produtos fortificados como cereais matinais e leite vegetal (e.g. soja, amêndoa ou aveia). A vitamina B12 contribui com o folato na doação de grupos metil nas reações de metilação do DNA e outros processos celulares (131). Assim, dietas ricas em nutrientes doadores de grupo metil podem alterar a expressão gênica, especialmente durante o desenvolvimento inicial, quando o epigenoma está sendo estabelecido pela primeira vez (19).

Nesse cenário, diversos estudos vêm avaliando o papel de dietas suplementadas com nutrientes doadores de grupo metil no perfil de metilação de diferentes genes alvo. Estudo em modelo experimental mostrou alterações fenotípicas e epigenéticas após o uso de um coquetel de micronutrientes com colina, betaina, ácido fólico e vitamina B12 em um modelo transgeracional de obesidade (19). Ainda, resultados de estudo com camundongos após dietas obesogênicas suplementadas com doadores de grupo metil evidenciou mudanças na maquinaria epigenética, induzindo hipermetilação do DNA (132). Uma recente revisão sistemática e meta-análise demonstrou que a suplementação de micronutrientes doadores de metil pode alterar os níveis de metilação do DNA *in vitro*, em modelos animais e em ensaios clínicos em humanos de diferentes maneiras. A suplementação de altas doses de ácido fólico, por exemplo, alterou os níveis globais de metilação do DNA de animais, enquanto não foram observados efeitos com uso de baixas doses (133).

Apesar das evidências supracitadas, poucos são os estudos avaliando o papel da suplementação de nutrientes doadores de metil no perfil de metilação do DNA no LES. Estudo avaliando a ingestão de nutrientes doadores de metil nos níveis de metilação do gene CD40L em células T de mulheres com LES observou associação entre metionina, colina e cisteína com a metilação média do gene (134). Por outro lado, de acordo com recente revisão, até o presente momento, novos estudos sobre a ação de nutrientes doadores de metil na metilação do DNA são necessários (135). Apesar do uso promissor de dieta/nutrientes como potenciais ferramentas terapêuticas no manejo do LES, os estudos ainda são escassos e há a necessidade de maior esclarecimento (136).

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo primário

Avaliar de maneira exploratória o perfil de metilação do DNA no tecido adiposo de modelo animal de LES alimentado com ração padrão ou ração com alto teor calórico e lipídico, e investigar se a suplementação de ácido fólico e vitamina B12 é capaz de modificar esse perfil.

3.2 Objetivos secundários

- Entre animais com LES alimentados com ração padrão ou ração hipercalórica e hiperlipídica comparar a expressão de genes Dnmt1, Stat3, Lep, Il-6 e Tnf-alfa,
- Dentre os animais com LES alimentados com ração padrão e ração padrão suplementada, comparar a expressão de genes Dnmt1, Stat3, Lep, Il-6 e Tnf-alfa,
- Dentre os animais com LES alimentados com ração hipercalórica e hiperlipídica e ração hipercalórica e hiperlipídica suplementada, comparar a expressão de genes Dnmt1, Stat3, Lep, Il-6 e Tnf-alfa.

Materiais e Métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e após aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM-USP) (nº 1695/2021) (ANEXO A).

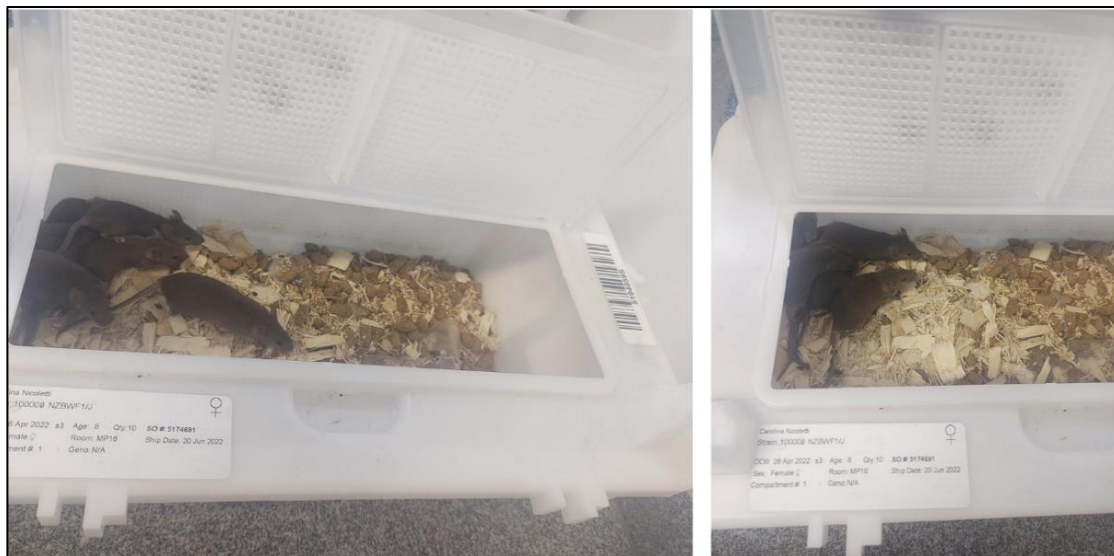
4.2 Animais

Trinta camundongos da linhagem NZBWF1/J, fêmeas, com peso aproximado de 30 g e idade de 8 semanas foram obtidos por meio de importação do *The Jackson Laboratory*® (Bar Harbor, Maine, EUA). Camundongos da linhagem NZBWF1/J são modelos animais espontâneos e induzidos de LES, isto é, não são animais geneticamente modificados. Esse modelo vem sendo utilizado como ferramenta útil para o estudo da etiopatologia da doença, para a identificação de alvos terapêuticos e rastreamento de tratamentos em estudos pré-clínicos. Ressalta-se que o modelo animal compartilha subconjuntos específicos de atributos com a doença observada em humanos(137)

A importação foi realizada diretamente pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Os animais foram transportados dos EUA em caixas apropriadas, com água e alimento necessário para sua sobrevivência (Figura 4). Ao chegarem na FM-USP, os animais foram mantidos no Biotério de Clínica Médica.

No referido biotério, os animais foram alocados em gaiolas plásticas (três a quatro animais por cada gaiola) em sala controlada para ciclos claro-escuro (12:12 horas), temperatura ($24\pm 1^{\circ}\text{C}$) e umidade (60 a 70%). Os camundongos tiveram livre acesso a água e a ração [*American Institute of Nutrition* (AIN-93G)] para adaptação ao novo ambiente por duas semanas antes do início dos experimentos.

Figura 4 - Chegada dos animais ao Biotério de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.



4.3 Desenho experimental

Após o período de adaptação, os animais foram randomizados em quatro grupos (Quadro 1) com auxílio do software *Random.org*. Tais grupos foram baseados nas respectivas rações que os animais iriam receber durante o experimento. Em seguida, cada grupo foi categorizado por cores diferentes para melhor identificação durante o experimento (Figura 5).

Quadro 1 - Divisão dos animais por grupos de acordo com a ração recebida no experimento.

Grupo	Tipo de ração	Número de animais
Ração padrão (SD)	Ração regular	7
Ração padrão suplementada (SDS)	Ração regular suplementada	8
Obesidade (HFD)	Ração hipercalórica e hiperlipídica	7
Obesidade suplementado (HFDS)	Ração hipercalórica e hiperlipídica suplementada	8

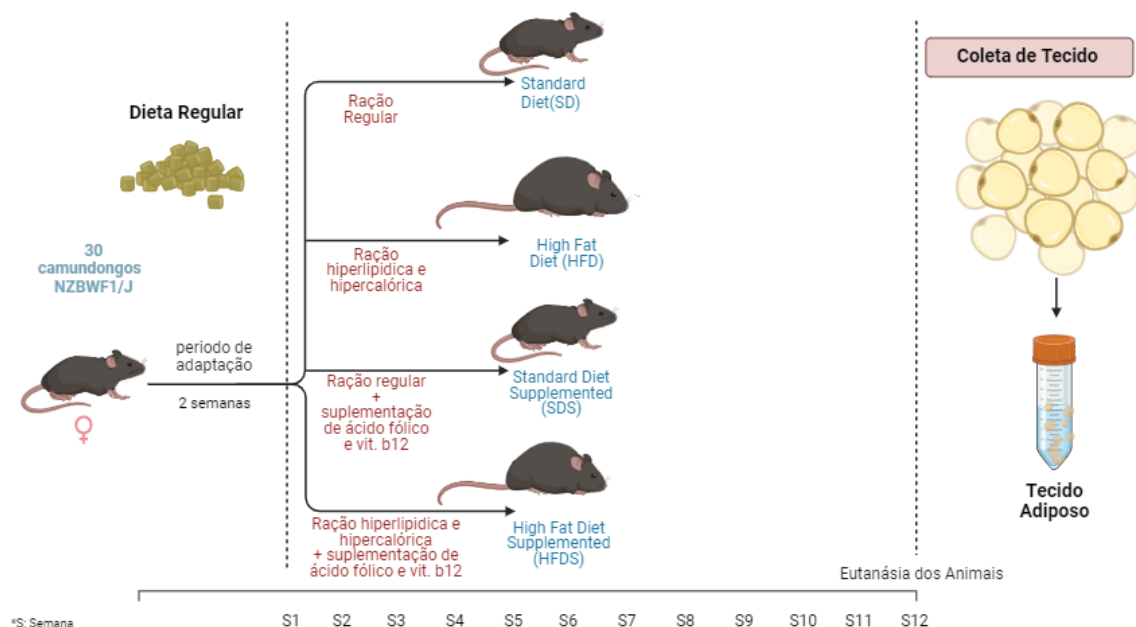
Figura 5 - Gaiolas com os grupos separados por cores de acordo com o tipo de ração recebida no experimento.



Verde: ração padrão, Vermelho: ração padrão suplementada, Azul: ração hipercalórica e hiperlipídica, Amarelo: ração hipercalórica e hiperlipídica suplementada.

O desenho experimental do estudo está demonstrado na Figura 6. Os animais receberam as respectivas rações pelo período de 12 semanas.

Figura 6 - Delineamento experimental do estudo.



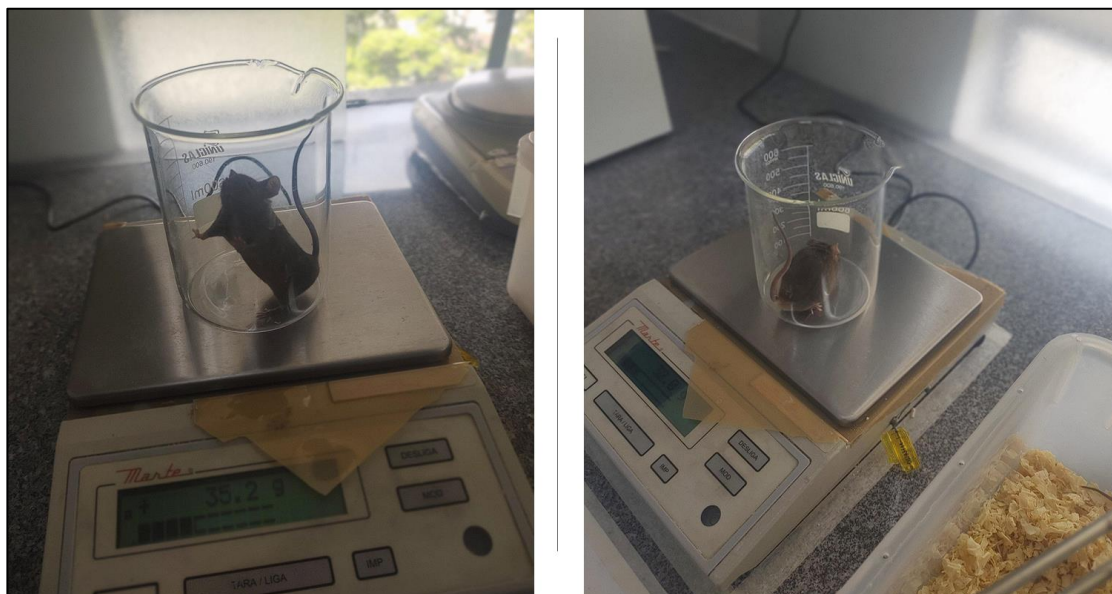
Durante todo o período de experimentação, a quantidade de ração consumida (por caixa) foi aferida três vezes na semana, no mesmo horário (Figura 7). Após essas pesagens, a ração era repostada, deixando sempre quantidade suficiente disponível. O

cálculo da quantidade de ração ingerida por animal foi realizado pela média das três aferições semanais por caixa, dividido pelo número de animais em cada caixa. O peso de cada animal foi registrado semanalmente ao longo do estudo (Figura 8).

Figura 7 - Pesagem da ração.



Figura 8 - Pesagem dos camundongos.



Ao final das 12 semanas, os animais foram submetidos a jejum de 10 horas e anestesiados por meio de injeção intraperitoneal com quetamina e xilazina na dosagem

de 1 ml dos respectivos anestésicos para 10 ml de solução salina e aplicado na dosagem de 10 uL para 1g de peso do animal. Em seguida, os animais foram eutanasiados com uma superdosagem dos respectivos anestésicos, respeitando as normas da Comissão de Ética. Subsequentemente foram coletadas amostras de tecido adiposo subcutâneo (TAS) de cada animal utilizando instrumentos apropriados. O TAS foi coletado da região abdominal. Para cada animal, metade da amostra de TAS coletada foi colocada em tubos criogênicos; enquanto a outra metade foi colocada em tubos criogênicos contendo solução estabilizadora de RNA (*TRIzol® Reagent da Life Technologies*). Todas as amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Logo depois, as amostras foram armazenadas em freezer a -80°C para as análises posteriores.

4.4 Rações

As rações foram adquiridas em comércio local próprio (Rhoster Brasil, Brasil) e armazenadas em temperatura de 4 a 8 °C (geladeira apropriada) de acordo com as instruções do fabricante. A composição de cada ração está descrita no Quadro 2. As rações suplementadas continham a mesma composição das rações iniciais, porém acrescidas, industrialmente, de 8 mg de ácido fólico e 50 ug de vitamina B12 por cada kg de ração.

Quadro 2 - Composição das rações regular ou hipercalórica e hiperlipídica.

Ingredientes (por kg de ração)	Ração regular	Ração hipercalórica e hiperlipídica
Calorias	4.200 (4,2 kcal/g)	6.600 (6,6 kcal/g)
Microcelulose	50	50
Sacarose	100	100
Caseína	200	200
Amido de milho	397	197
Dextrina de milho	130,5	130,5
Gordura vegetal hidrogenada	0	200
Óleo de Soja	70	70
Mix de vitaminas	10	10
Mix de minerais	35	35
L-cisteína	3	3
Colina	2,5	2,5

4.5 Análise dos níveis de metilação do DNA

4.5.1 Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada a partir das amostras de TA por meio do kit *DNeasy Blood and Tissue* (Qiagen) seguindo protocolo do fabricante. A concentração e a pureza do DNA foram determinadas por espectrofotometria usando NanoDrop 2000c. A concentração do DNA foi avaliada a 260 nm e a relação de leituras a 260 nm e a 280 nm para estimar a pureza do DNA, estabelecendo-se o valor de 1,8 como referência mínima.

4.5.2 Tratamento com bissulfito de sódio

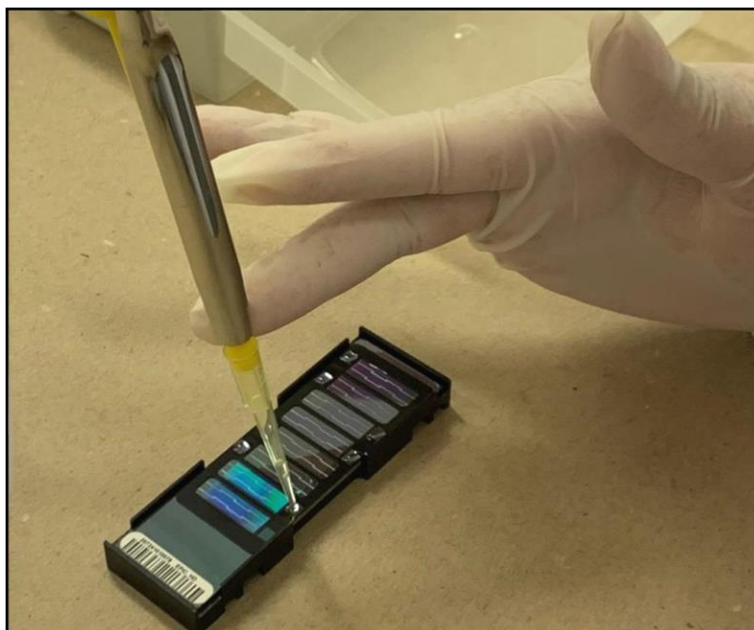
O DNA extraído foi tratado com bissulfito de sódio e purificado utilizando o kit comercial *EZ DNA Methylation-Gold* (Zymo Research) de acordo com as instruções do fabricante. Com o tratamento, as citosinas não metiladas foram convertidas em uracilas, enquanto as citosinas metiladas permaneceram inalteradas.

4.5.3 Ensaio de metilação do DNA

Para análise dos níveis de metilação do DNA utilizou-se a técnica de *beadchip* com o ensaio *Infinium Mouse Methylation BeadChip* (Illumina, San Diego, CA) de acordo com o protocolo do fabricante (*Infinium HD Assay Methylation Protocol Guide*, Part #15019519, Illumina). O DNA previamente tratado foi desnaturado, neutralizado e amplificado. Posteriormente, realizou-se a etapa de precipitação com isopropanol, o e DNA foi ressuspensão em tampão para hibridização. Em seguida, as amostras ressuspensas foram hibridizadas nas lâminas do *beadchip* a 48°C por 16 horas (Figura 9). Em seguida realizou-se lavagem para retirada de fragmentos não anelados, e os *beadchips* foram preparados para uma extensão de bases alelo-específicas incorporando nucleotídeos de citosina marcados. Os *beadchips* foram então escaneados usando o sistema *Illumina iScan SQ* que emprega um laser de duas cores fluorescente do scanner capaz de excitar os fluoróforos incorporados durante a etapa de marcação do protocolo.

A amplificação da marcação incorporada forneceu o sinal identificado permitindo a identificação dos sítios metilados no DNA.

Figura 9 - Incorporação do DNA nas lâminas (Beadchip) utilizadas para análises de metilação de DNA.



4.6 Análise de expressão gênica

4.6.1 Extração de RNA

A extração do RNA a partir das amostras de TAS foi realizada por meio do *RNeasy Mini Kit* (Quiagen), seguindo o protocolo do fabricante. Ao final deste procedimento, a ressuspensão do *pellet* de RNA foi realizada em 20µl de água livre de RNase. O RNA foi quantificado em espectrofotômetro (NanoDrop 2000c) e a absorbância foi medida nos comprimentos de onda de 260, 280 e 230nm, visando avaliação do grau de pureza.

4.6.2 Síntese de DNA complementar

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada utilizando o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Life Technologies) seguindo o protocolo do fabricante, com o aparelho Termociclador Veriti (*Applied Biosystem*TM). Para essa etapa,

utilizou-se 2 µl de RNA tratado (concentração aproximada de 1.227 ng) de cada amostra, seguindo a ciclagem: Etapa inicial temperatura de 25°C 10 minutos, 37 °C por 60 minutos, 95 °C por 5 minutos.

4.6.3 Expressão gênica relativa

A análise da expressão dos genes alvos (Dnmt1, Stat3, Il-6, Tnf-alfa, Lep) foi realizada em duplicata pelo método de reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real utilizando o aparelho *Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems)*. Para tal, utilizou-se sondas *TaqMan® MGB 6-FAM* fluorogênicas (*Applied Biosystems*) (Quadro 3). Os genes de referência utilizados foram beta-actina (Actb) e hipoxantina guanina fosforibosil transferase (Hprt). As condições de da PCR foram as seguintes: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos (95 °C por 10 segundos, 56 °C por 45 segundos, 72 °C por 30 segundos) por 40 ciclos. As amostras foram analisadas pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de Livak e Schmittgen, 2001(138).

Quadro 3 - Genes alvos e genes de referência avaliados no presente estudo.

Gene	Símbolo	Ensaio <i>TaqMan®</i> ID
DNA metil transferase 1	Dnmt1	Mm01151063_m1
Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3	Stat3	Mm01219775_m1
Interleucina 6	Il-6	Mm00446190_m1
Fator de necrose tumoral alfa	Tnf-alfa	Mm00443258_m1
Leptina	Lep	Mm00434759_ml
Beta-actina	Actb	Mm02619580_g1
Hipoxantina guanina fosforibosil transferase	Hprt	Mm03024075_m1

4.7 Análises estatísticas e de bioinformática

Variáveis numéricas foram descritas por valores de média e desvio-padrão. A normalidade de distribuição dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. O teste U- Mann Whitney foi utilizado para comparação dos grupos (SD *versus* HFD, SD *versus* SDS e HFD *versus* HFDS). A significância estatística foi estabelecida em 5% ($p < 0,05$), sendo todas as análises realizadas no software *Statistical Package for Social Science* (SPSS versão 22.0 [Inc. Chicago. IL]).

Os dados da matriz de metilação foram processados no ambiente estatístico R 4.1.1 ([//www.r-project.org/](http://www.r-project.org/)). O pacote R (R Core Team, 2021) RnBeads foi utilizado para controle de qualidade e pré-processamento. Primeiramente, utilizou-se um algoritmo de corte para filtrar sondas e/ou amostras. Posteriormente, sondas que se sobrepunham a polimorfismos de nucleotídeo único, sondas em cromossomos sexuais e/ou sondas cujas sequências mapeavam múltiplas localizações genômicas (reação cruzada) foram removidas. As intensidades brutas obtidas na matriz foram normalizadas usando o método BMIQ, que é uma abordagem de normalização baseada em modelo para corrigir valores β de sondas do tipo II de acordo com a distribuição beta dos valores β das sondas do tipo I. Assim, um valor β específico foi obtido para cada sítio CpG encontrado. O valor β corresponde a razão do sinal fluorescente entre a sonda metilada (M) em relação à soma das sondas M e não metilada (UM) [$\beta = M / (M + UM)$] e variam de 0 (sem metilação) a 1 (100% de metilação de ambos os alelos). Por fim, modelos lineares hierárquicos foram utilizados com pacote *limma* para obter as diferenças entre grupos. Os valores de p foram corrigidos para testes múltiplos (taxa de descoberta falsa, FDR) usando o método Benjamini-Hochberg. Um pipeline de bioinformática semelhante foi aplicado a todas as comparações realizadas.

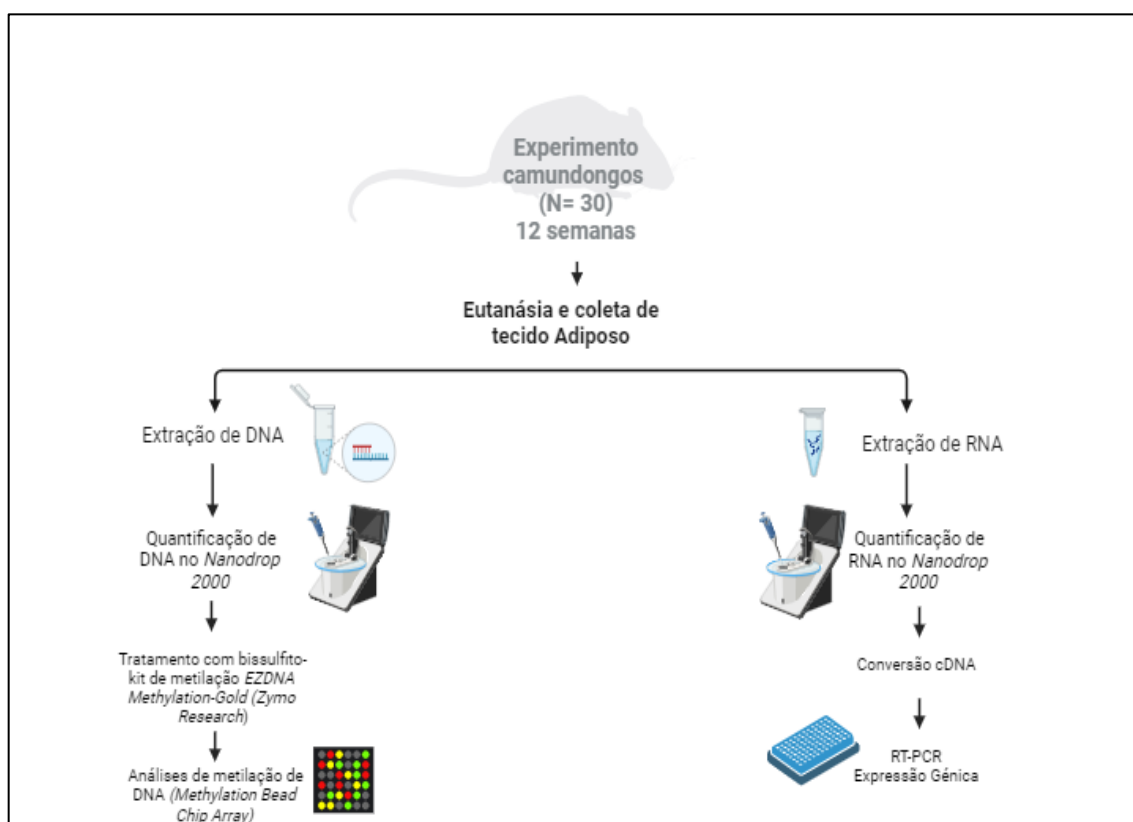
Posteriormente, aplicou-se um limiar para os sítios CpG significativos baseados em $\Delta\beta$ com um valor mínimo de 5% (valor maior que 0,5 ou menor que -0,5), um valor de p menor que 0,01 e de FDR menor que 0,05. A anotação das ilhas CpGs utilizou a seguinte categorização: (1) *shore*, para cada uma das sequências de 2 kb que flanqueiam uma ilha CpG; (2) *shelf*, para cada uma das sequências de 2 kb próximas a um *shore* (2 a 4 kb de uma ilha CpG); e (3) *open sea*, para DNA não incluído em nenhuma das sequências anteriores ou em ilhas CpGs. O local de início da transcrição, TSS200 e TSS1500, indicou as regiões 200 ou 1500 pb a montante do local de início da transcrição, respectivamente. Considerou-se 5'UTR, a região entre TSS e o códon AGT (*start site*). A região definida como corpo do gene correspondeu aquela entre o códon AGT e o *stop codon*. Por fim, considerou-se 3'UTR, a região entre o *stop codon* e a cauda poli A.

4.8 Análises de enriquecimento de vias metabólicas

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

A Figura 10 apresenta um resumo de todas as etapas envolvidas no presente estudo.

Figura 10 - Fluxograma representativo das etapas realizadas durante o estudo.



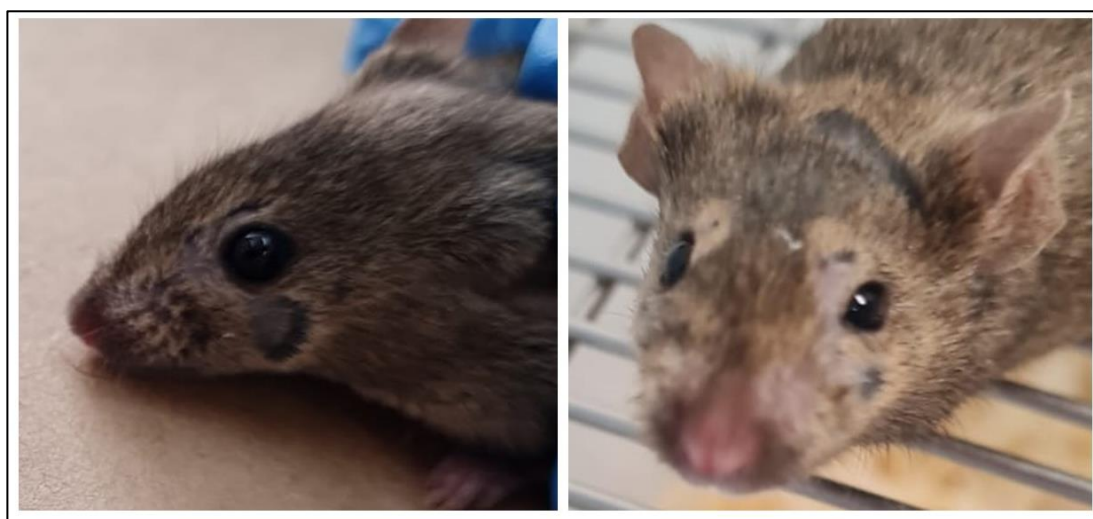
Resultados

5. RESULTADOS

5.1 Sinais do desenvolvimento do LES

Todos os animais finalizaram o experimento. Ainda, observou-se que todos os camundongos apresentaram sinais do desenvolvimento da doença como, por exemplo, o *rash* malar (Figura 11).

Figura 11 - Apresentação de *rash* malar como sinal do desenvolvimento da doença nos camundongos avaliados.

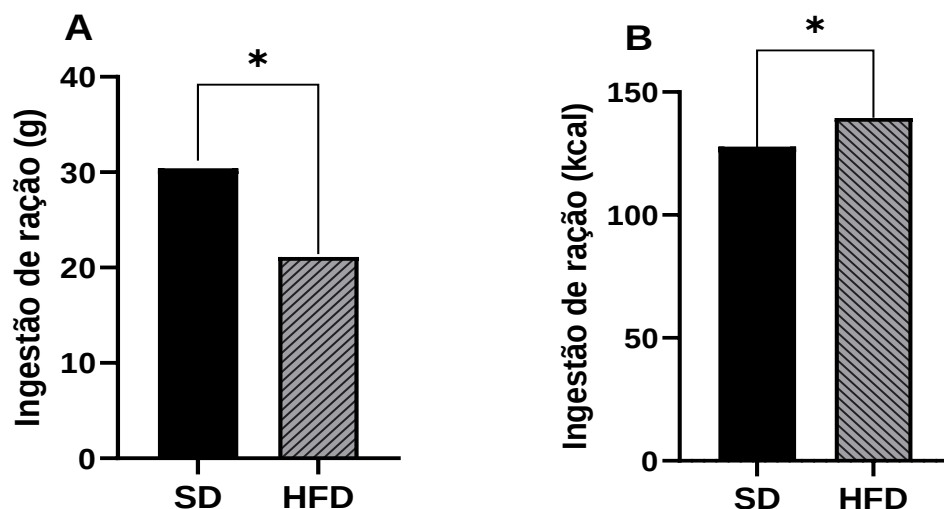


5.2 Efeito de uma dieta hipercalórica e hiperlipídica (SD versus HFD)

Observou-se que animais que receberam a ração hipercalórica e hiperlipídica tiveram um menor consumo de ração (em gramas) quando comparados aos animais que receberam a ração padrão (Figura 12A), entretanto, o consumo calórico foi maior dentre aqueles que consumiram a ração hipercalórica e hiperlipídica (Figura 12B).

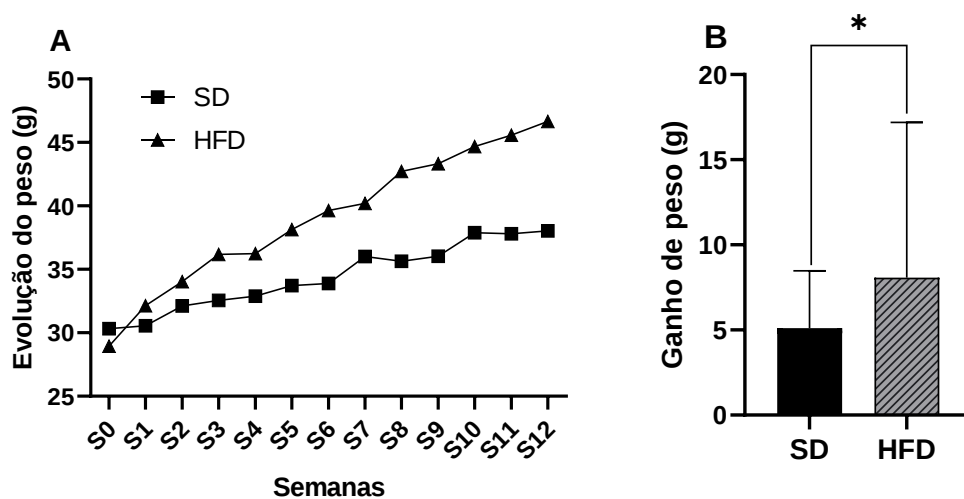
Adicionalmente, observou-se que a ingestão de ração hipercalórica e hiperlipídica durante o experimento favoreceu o aumento significativo do peso corporal (Figura 13A e 13B). Ao final do experimento, os animais do grupo HFD ganharam, em média, o dobro do peso daqueles do grupo SD ($14,5 \pm 1,6$ g versus $7,5 \pm 2,7$ g, $p < 0,05$). Ainda, as imagens da cavidade abdominal dos animais mostram uma maior quantidade de tecido adiposo naqueles do grupo HFD comparado ao grupo SD (Figura 14).

Figura 12 - Ingestão de ração pelos animais dos grupos ração padrão e ração hipercalórica e hiperlipídica.



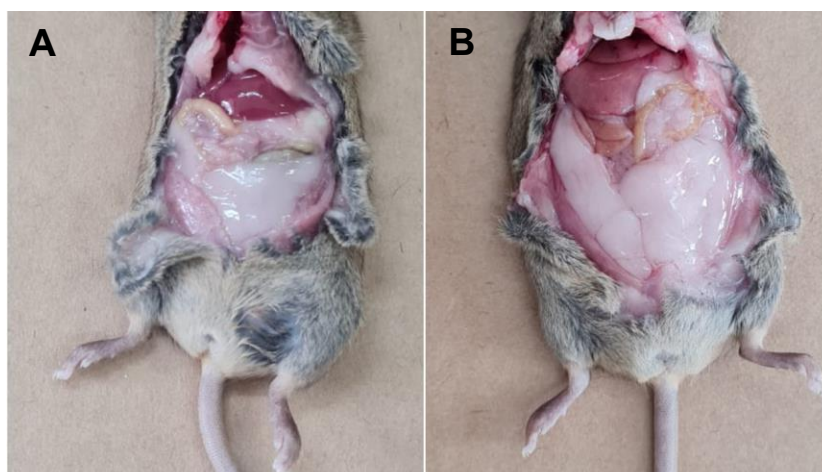
A: ingestão em gramas. B: ingestão em calorias. SD: grupo ração padrão, HFD: grupo ração hipercalórica e hiperlipídica. *: $p < 0,05$.

Figura 13 - Peso corporal dos animais dos grupos ração padrão e ração hipercalórica e hiperlipídica.



A: evolução do peso durante por semana de experimento. B: ganho de peso ao final do experimento. SD: grupo ração padrão, HFD: grupo ração hipercalórica e hiperlipídica. *: $p < 0,05$.

Figura 14 - Quantidade de tecido adiposo abdominal.

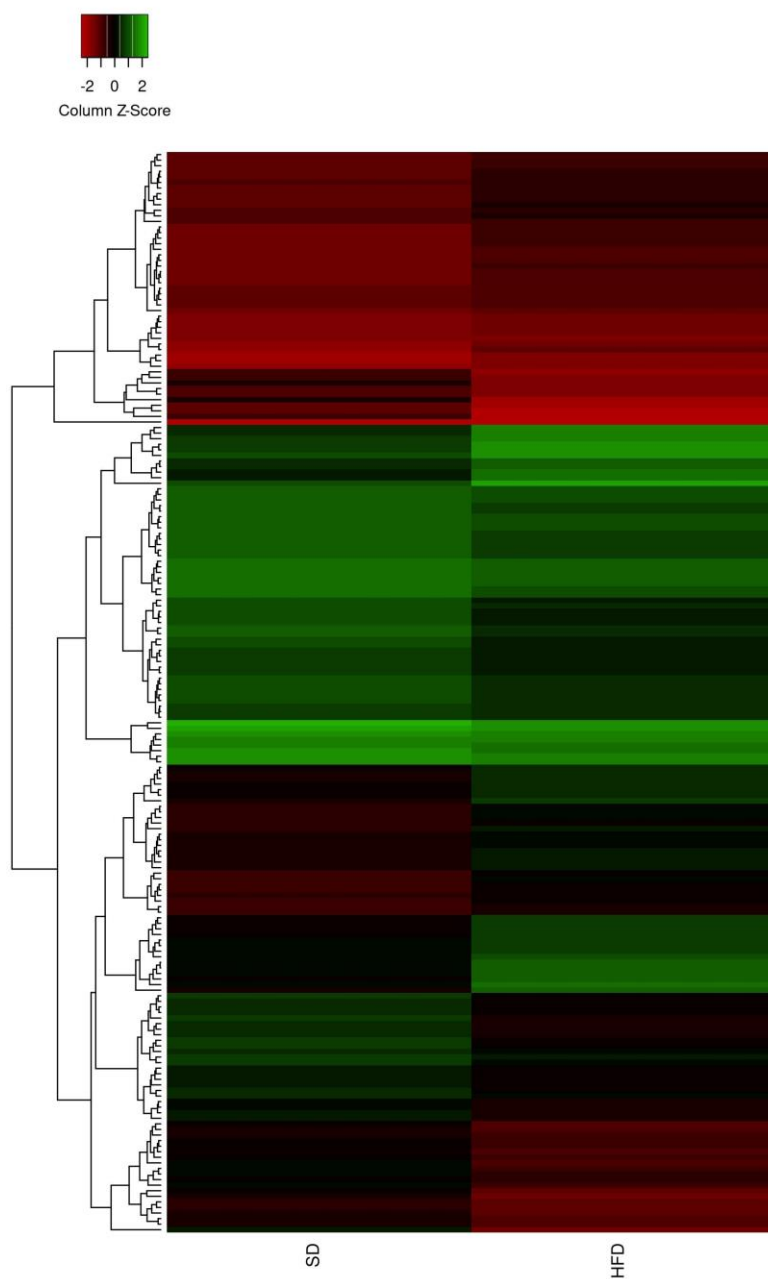


A: camundongo do grupos ração padrão. B: camundongo do grupo ração hipercalórica e hiperlipídica.

A comparação entre o perfil de metilação dos grupos SD e HFD revelou 193 sítios CpGs válidos que exibiram metilação diferencial do DNA igual ou superior a 5% ($p < 0,01$; $FDR < 0,05$) (Figura 15). Os sítios diferencialmente metilados (DMCpGs) foram relacionados a 143 genes.

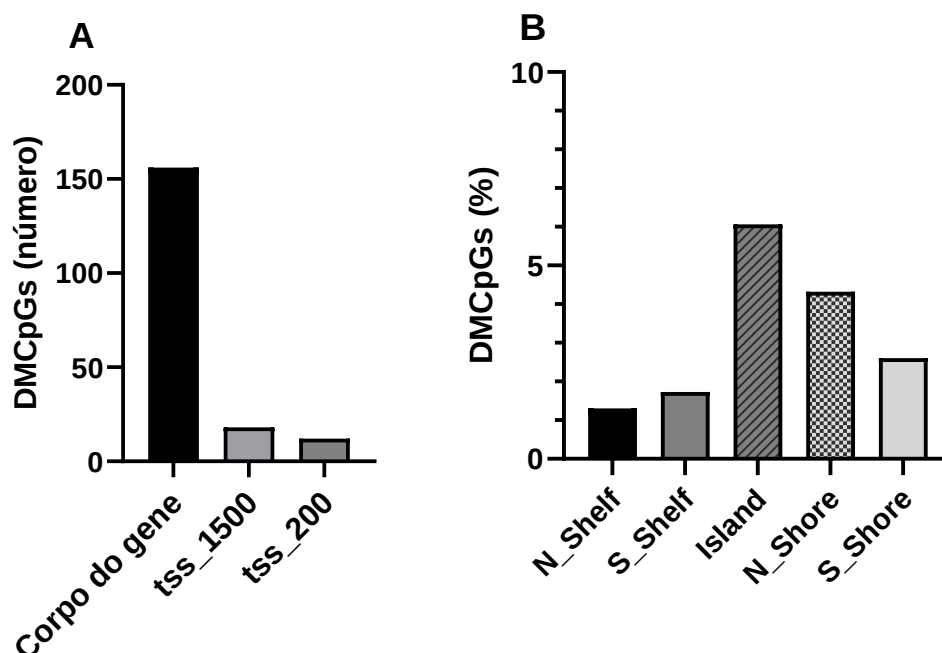
A Figura 16 mostra as regiões gênicas e a distribuição genômica e cromossômica de DMCpGs entre animais dos grupos SD e HFD. O maior número de DMCpGs encontrado foi no *opensea* (84%) e no corpo dos genes (67,5%).

Figura 15 - *Heatmap* dos sítios CpGs diferentemente metilados entre animais submetidos do grupo ração padrão e grupo ração hipercalórica e hiperlipídica.



SD: grupo ração padrão, HFD: grupo ração hipercalórica e hiperlipídica.

Figura 16 - Caracterização das regiões gênicas e a distribuição genômica e cromossômica dos sítios diferencialmente metilados entre os animais dos grupos SD e HFD.



A: Regiões gênicas dos DMCpGs. B: Distribuição genômica dos DMCpGs em relação a ilha CpG.

Do total, 102 CpGs estavam hipometiladas nos animais do grupo HFD quando comparado àqueles do grupo SD. A variação entre os grupos foi de 5 a 27%. Tais sítios CpGs foram relacionados a 75 genes conhecidos. Por outro lado, observou-se 91 CpGs hipermetiladas nos animais do grupo HFD quando comparado àqueles do grupo SD (relacionadas a 68 genes conhecidos). A variação entre os grupos foi de 5 a 19%. A Tabela 1 mostra os 20 principais DMCpGs.

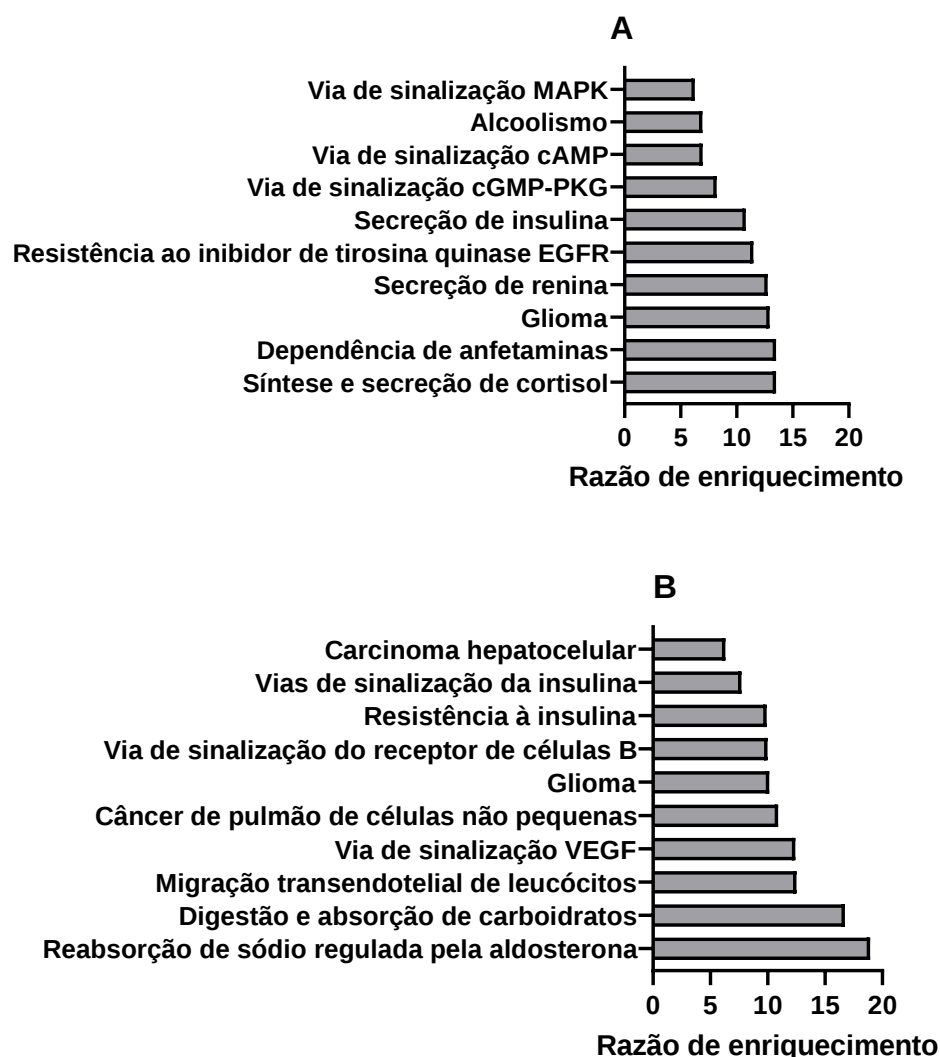
Tabela 1 - Top 20 sítios CpGs diferencialmente metilados nos animais que receberam ração padrão quando comparados àqueles que receberam ração hipercalórica e hiperlipídica.

Sítio CpG	Gene	CHR	Região gênica	Posição em relação a ilha	Níveis de metilação		Δ
					Grupo SD	Grupo HFD	
Sítios CpGs hipometilados no grupo HFD							
cg32350587	3425401B19Rik; Gm28651	14	tss_body; tss1500;tss200	OpenSea	0,32 ± 0,03	0,60 ± 0,1	0,26
cg39121173	H13; Mcts2	2	tss_body	S_Shore	0,49 ± 0,06	0,72 ± 0,03	0,22
cg47123322		9		OpenSea	0,26 ± 0,04	0,48 ± 0,07	0,22
cg39783060	Nbea; Mab2111	3	tss_body	Island	0,31 ± 0,06	0,50 ± 0,06	0,19
cg32577761	Wdfy2	14	tss_body	OpenSea	0,29 ± 0,02	0,41 ± 0,04	0,18
cg30243429	Sept9	11	tss_body	OpenSea	0,48 ± 0,02	0,65 ± 0,06	0,17
cg35100315	Fbxl17	17	tss_body	OpenSea	0,33 ± 0,04	0,49 ± 0,05	0,16
cg28141499		10		OpenSea	0,46 ± 0,04	0,62 ± 0,05	0,16
cg43180931	Asz1	6	tss_200	OpenSea	0,56 ± 0,04	0,71 ± 0,04	0,15
cg39284121	Znfx1	2	tss_body	OpenSea	0,31 ± 0,02	0,46 ± 0,05	0,15
Sítios CpGs hipermetilados no grupo HFD							
cg34520748	Cldn14; Gm31012	16	tss_body	OpenSea	0,41 ± 0,09	0,53 ± 0,11	0,18
cg41380519	Pabpc4	4	tss_body	OpenSea	0,50 ± 0,09	0,62 ± 0,10	0,16
cg41541610	1700029M20Rik	4	tss_body	OpenSea	0,35 ± 0,07	0,48 ± 0,09	0,15
cg45240817	Tcerg1l	7	tss_body	OpenSea	0,44 ± 0,10	0,57 ± 0,10	0,15
cg39297839	Ptpn1	2	tss_body	OpenSea	0,52 ± 0,23	0,65 ± 0,15	0,15
cg41225281	Dab1	4	tss_body	OpenSea	0,52 ± 0,02	0,65 ± 0,03	0,14
cg31609726		13		OpenSea	0,64 ± 0,07	0,79 ± 0,06	0,14
cg43997613	Gm38901	6	tss_body	OpenSea	0,22 ± 0,19	0,37 ± 0,23	0,13
cg34520748	Cldn14; Gm31012	16	tss_body	OpenSea	0,41 ± 0,09	0,53 ± 0,11	0,18
cg41380519	Pabpc4	4	tss_body	OpenSea	0,50 ± 0,09	0,62 ± 0,10	0,16

CHR: cromossomo, Δ : variação entre os grupos, TSS: *transcription start site*

Dentre os sítios CpGs hipometilados e hipermetilados, nos animais do grupo HFD, 18 e 23 genes foram anotados, respectivamente, para as categorias funcionais selecionadas e na lista de referências, sendo assim utilizados para a análise de enriquecimento (Figura 17). Destaca-se as vias metabólicas relacionadas a secreção e sinalização de insulina, resistência à insulina, migração transendotelial de leucócitos e vias de sinalização do receptor de células B.

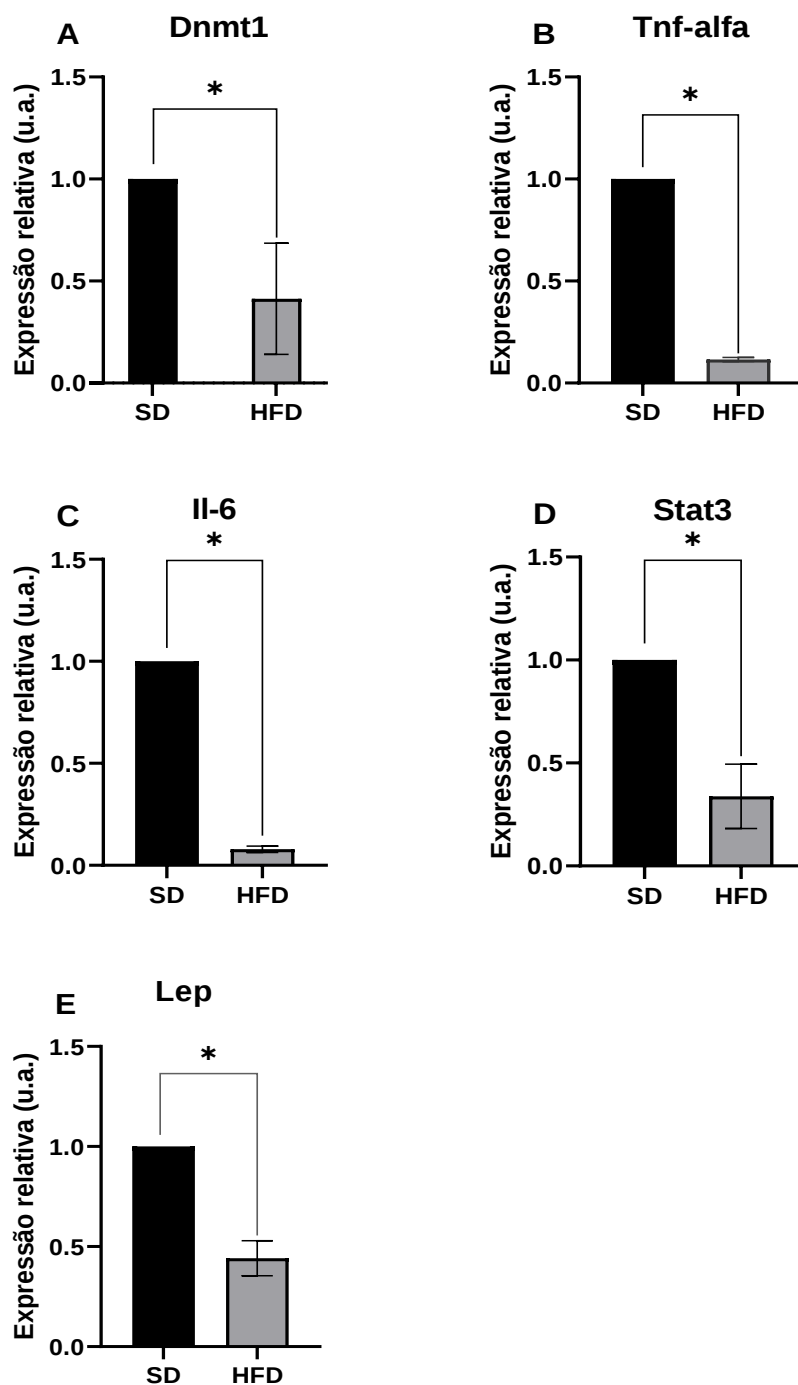
Figura 17 - Análise de enriquecimentos das CpGs diferentemente metiladas entre animais que receberam ração padrão e ração hipercalórica e hiperlipídica.



A: Vias relacionadas aos genes hipometilados; B: Vias relacionadas aos genes hipermetilados.

A análise da expressão gênica mostrou uma menor expressão dos genes *Dnmt1*, *Il-6*, *Tnf-alfa*, *Stat3* ($U = 0,000$; $p < 0,001$) e *Lep* ($U = 0,000$; $p < 0,030$) no tecido adiposo de animais do grupo HFD quando comparados ao grupo SD (Figura 18).

Figura 18 - Expressão gênica relativa no tecido adiposo de animais alimentados com ração padrão e ração hipercalórica e hiperlipídica.

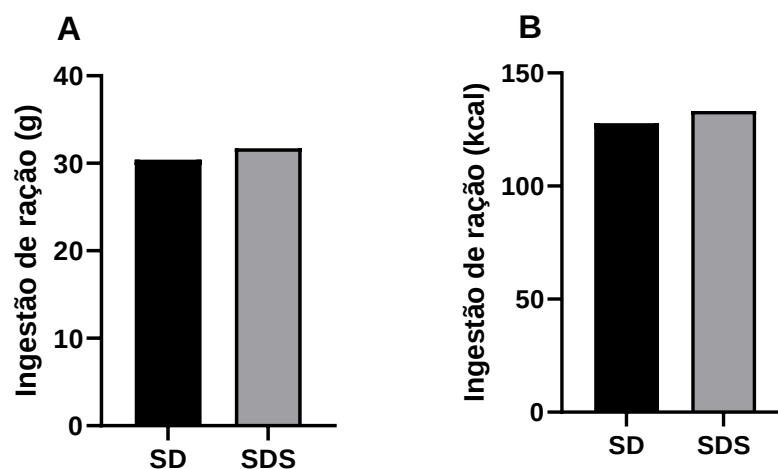


SD: grupo ração padrão, HFD: grupo ração hipercalórica e hiperlipídica. *: $p < 0,05$.

5.3. Efeito da suplementação nos animais com peso normal (SD versus SDS)

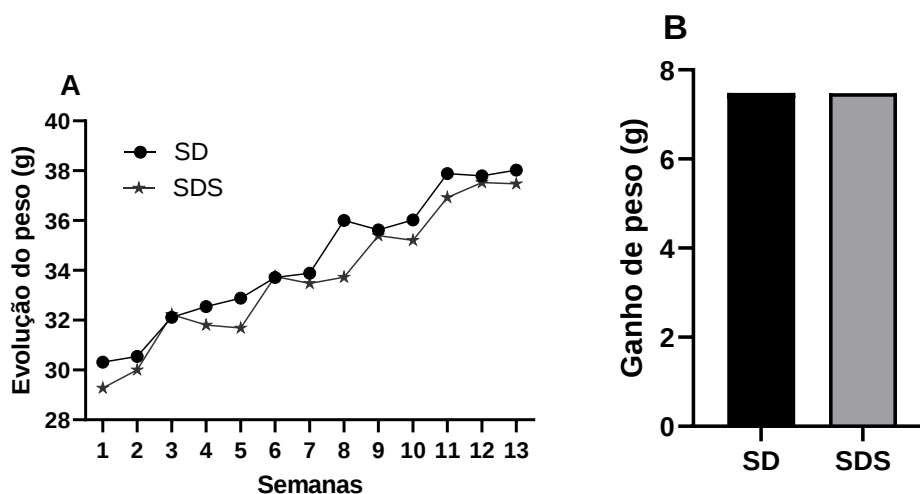
Não foi observada diferença no consumo de ração (gramas e calorias) entre os animais que receberam a ração padrão e a ração padrão suplementada (Figura 19). Da mesma maneira, não foi observada diferença na evolução e ganho de peso entre os animais do grupo SD e SDS (Figura 20).

Figura 19 - Ingestão de ração pelos animais dos grupos ração padrão e ração padrão suplementada.



A: ingestão em gramas. B: ingestão em calorias. SD: grupo ração padrão, SDS: grupo ração padrão suplementada.

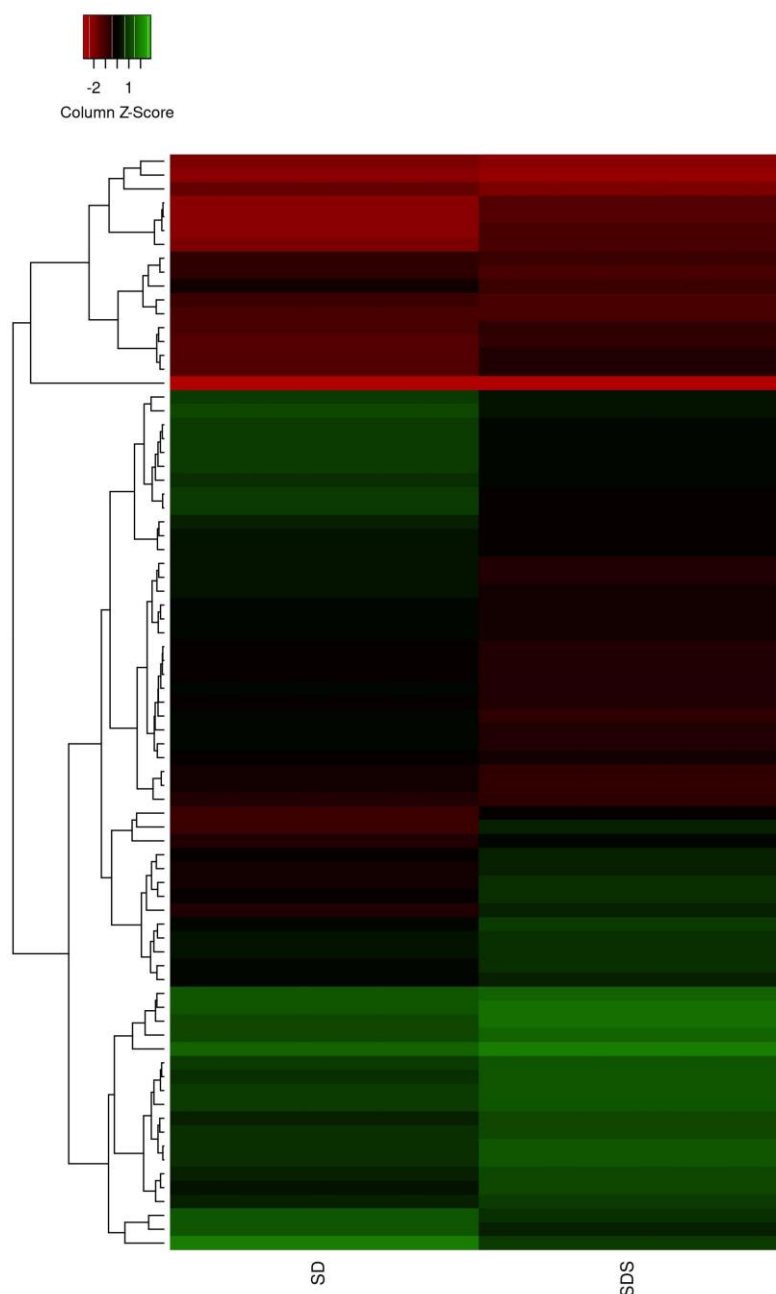
Figura 20 - Peso corporal dos animais dos grupos ração padrão e ração padrão suplementada.



A: evolução do peso durante por semana de experimento. B: ganho de peso ao final do experimento. SD: grupo ração padrão, SDS: grupo ração padrão suplementada.

A comparação entre o perfil de metilação dos grupos SD e SDS revelou 79 sítios CpGs válidos que exibiram metilação diferencial do DNA igual ou superior a 5% ($p < 0,01$; $FDR < 0,05$) (Figura 21). Os sítios CpGs identificados foram relacionados a 64 genes.

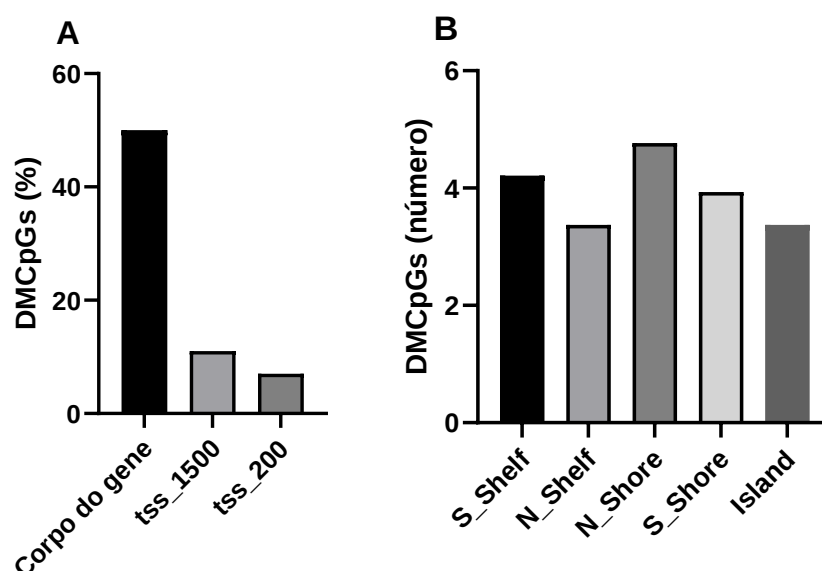
Figura 21 - *Heatmap* dos sítios CpGs diferentemente metilados entre animais submetidos do grupo ração padrão e grupo ração padrão suplementada.



SD: grupo ração padrão, SDS: grupo ração padrão suplementada.

A Figura 22 mostra as regiões gênicas e a distribuição genômica e cromossômica dos DMCpGs entre animais dos grupos SD e SDS. O maior número de DMCpGs encontrado foi no *opensea* (88,6%) e no corpo dos genes (52%).

Figura 22 - Caracterização das regiões gênicas e a distribuição genômica e cromossômica dos sítios diferencialmente metilados (DMCpGs) entre os animais dos grupos SD e SDS.



A: Regiões gênicas dos DMCpGs. B: Distribuição genômica dos DMCpGs em relação a ilha CpG.

Do total, 42 CpGs estavam hipometiladas nos animais do grupo SDS quando comparado àqueles do grupo SD. A variação entre os grupos foi de 6 a 15%. Tais sítios CpGs foram relacionados a 33 genes conhecidos. Por outro lado, observou-se 37 CpGs hipermetiladas nos animais do grupo SDS quando comparado àqueles do grupo SD (relacionadas a 30 genes conhecidos). A variação entre os grupos foi de 6 a 20%. A Tabela 2 mostra os 20 principais DMCpGs.

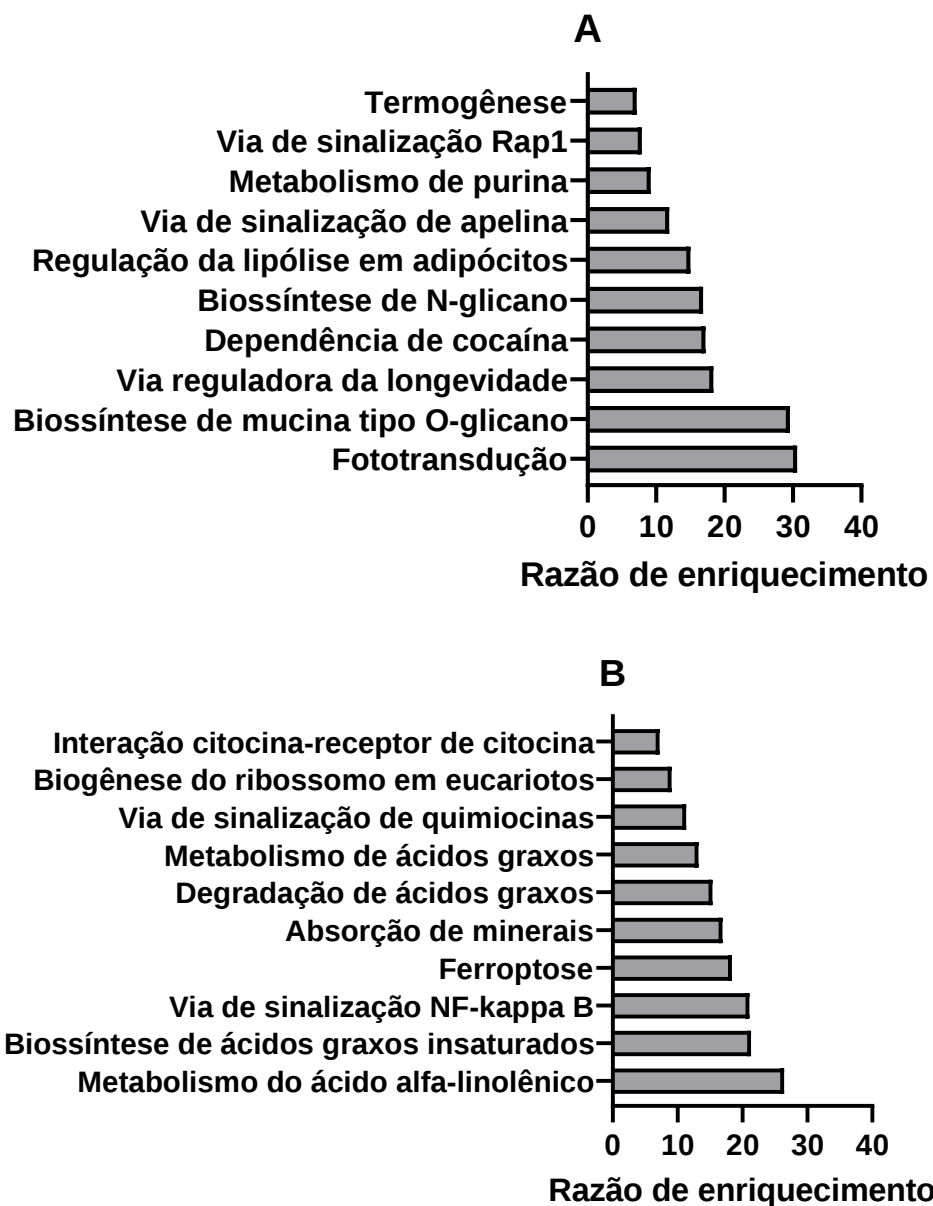
Dentre os sítios CpGs hipometilados e hipermetilados nos animais do grupo SDS, 10 e 11 genes foram anotados, respectivamente, para as categorias funcionais selecionadas e na lista de referências, sendo assim utilizados para a análise de enriquecimento (Figura 23). Destaca-se as vias metabólicas relacionadas a termogênese, regulação de longevidade, regulação da lipólise em adipócitos, metabolismo de ácidos graxos e interação citocina e receptor de citocina.

Tabela 2 - Top 20 sítios CpGs diferencialmente metilados nos animais que receberam ração padrão quando comparados àqueles que receberam ração padrão suplementada.

Sítio CpG	Gene	CHR	Região gênica	Posição em relação a ilha	Níveis de metilação		Δ
					Grupo SD	Grupo SDS	
<i>Sítios CpGs hipometilados no grupo SDS</i>							
cg42740533	Ccdc63	5	tss_body	OpenSea	0,50 ±0,03	0,65 ± 0,04	0,15
cg35480534		18		OpenSea	0,51 ± 0,05	0,65 ± 0,03	0,14
cg38381583	Neb	2	tss_body	OpenSea	0,45 ± 0,05	0,58 ± 0,04	0,14
cg30295268	Aspscr1	11	tss_body	OpenSea	0,53 ± 0,05	0,66 ± 0,01	0,13
cg29509992	Mgat4b; Mir6919	11	tss_body; tss1500	Island	0,60 ± 0,03	0,72 ± 0,03	0,12
cg38561285		2		OpenSea	0,45 ± 0,02	0,57± 0,05	0,12
cg43728662	Lrig1	6	tss_body	OpenSea	0,37 ± 0,02	0,48 ± 0,03	0,12
cg37204150	Sh3bp4	1	tss_body	OpenSea	0,54 ± 0,05	0,65 ±0,02	0,11
cg42136205	Ppargc1a	5	tss_body	OpenSea	0,47± 0,02	0,58 ± 0,04	0,11
cg41663592	Vps13d	4	tss_body	OpenSea	0,21± 0,03	0,33 ± 0,04	0,11
<i>Sítios CpGs hipermetilados no grupo SDS</i>							
cg33682122		15		OpenSea	0,60 ± 0,07	0,40 ± 0,04	0,18
cg45322071		8		OpenSea	0,62 ± 0,03	0,47 ± 0,07	0,16
cg44233034	Vmn1r73	7	tss_body	OpenSea	0,64 ± 0,03	0,50 ± 0,03	0,15
cg34134220	Fbxo40	16	tss_body; tss_200	OpenSea	0,71 ± 0,03	0,59 ± 0,02	0,15
cg29324188	Xpo1	11	tss_body	OpenSea	0,64 ± 0,04	0,52 ± 0,01	0,15
cg35909552		18		OpenSea	0,71 ± 0,03	0,60 ± 0,03	0,14
cg42678046	Ksr2	5	tss_body	OpenSea	0,74 ± 0,04	0,62 ± 0,09	0,14
cg33202932		15		OpenSea	0,81 ± 0,04	0,70 ± 0,02	0,13
cg43075312	N4bp211	5	tss_body	OpenSea	0,67 ± 0,03	0,56 ± 0,03	0,13
cg33682122	Gm21541; LOC108169009; Gm13304; Gm2163; Ccl21b; Fam205a2; Gm10591	4	tss_1500; tss_body	OpenSea	0,73 ± 0,02	0,62 ± 0,03	0,13

CHR: cromossomo, Δ : variação entre os grupos, TSS: *transcription start site*

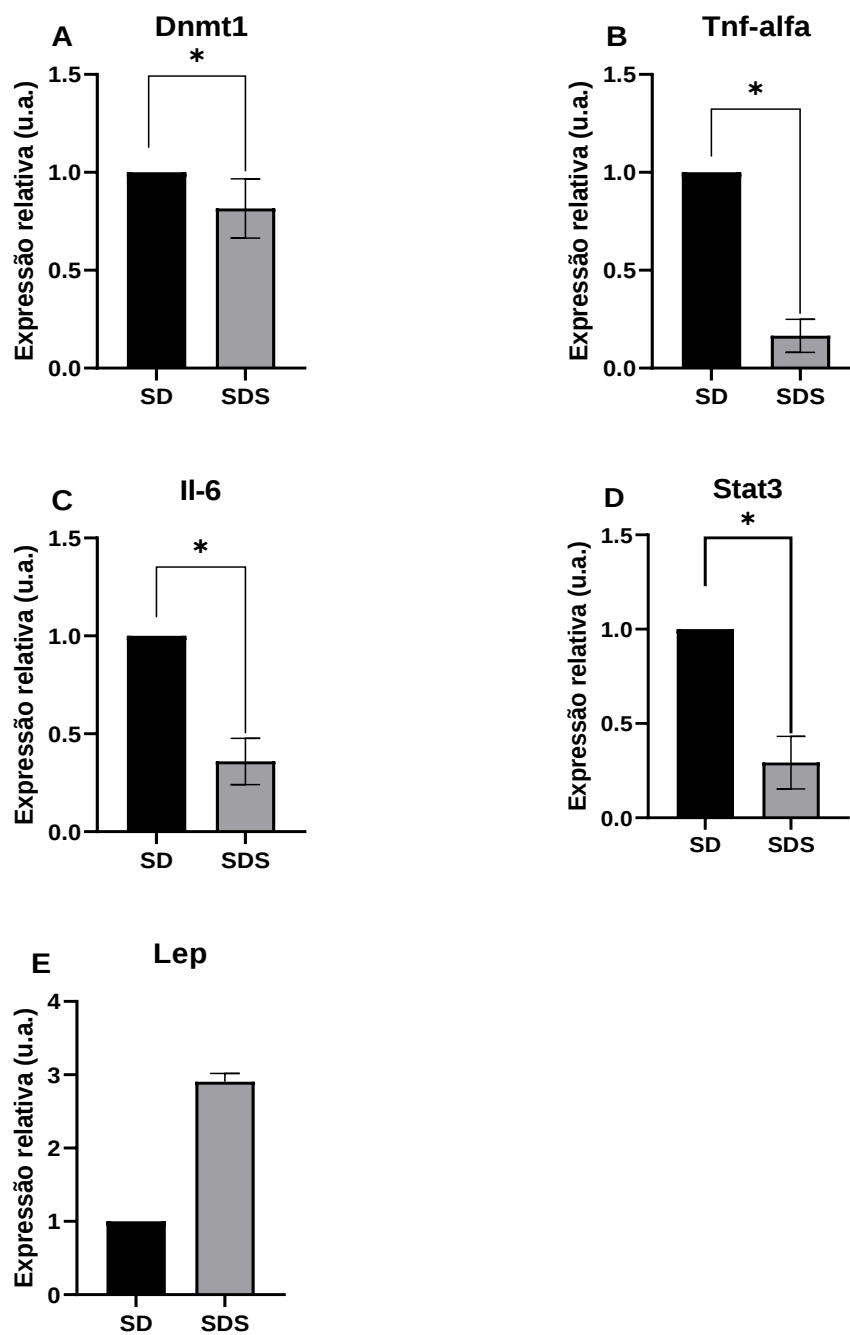
Figura 23 - Análise de enriquecimentos das CpGs diferentemente metiladas entre animais que receberam ração padrão e ração padrão suplementada.



A: Vias relacionadas aos genes hipometilados; B: Vias relacionadas aos genes hipermetilados.

A análise da expressão gênica mostrou uma menor expressão dos genes Tnf-alfa, Stat3 ($U = 0,000$; $p < 0,001$), Dnmt1 ($U = 7,000$; $p < 0,001$) e Il-6 ($U = 3,500$; $p < 0,001$) no tecido adiposo de animais do grupo SDS quando comparados ao grupo SD (Figura 24). Não foi observada diferença na expressão de Lep entre os grupos.

Figura 24 - Expressão gênica relativa no tecido adiposo de animais alimentados com ração padrão e ração padrão suplementada.

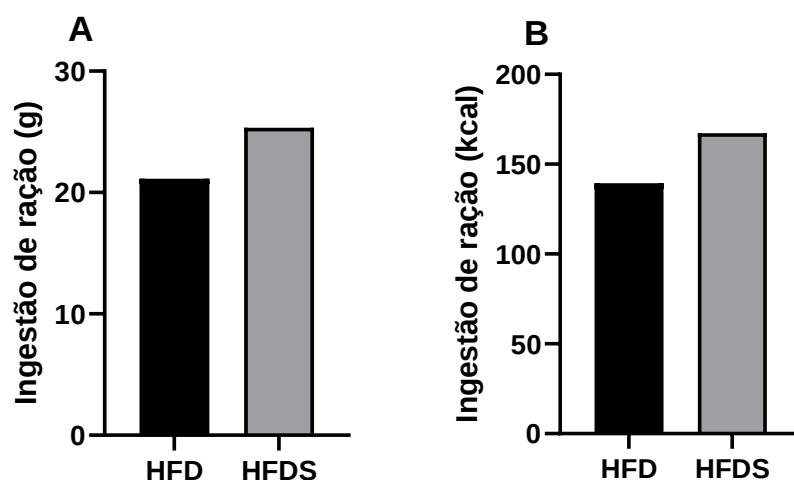


SD: grupo ração padrão, SDS: grupo ração padrão suplementada. *: $p < 0,05$.

5.4 Efeito da suplementação nos animais com obesidade (HFD versus HFDS)

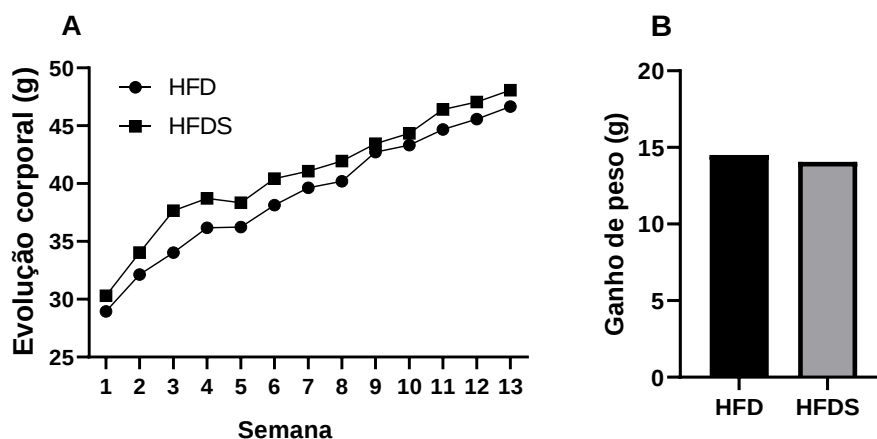
Não foi observada diferença no consumo de ração (gramas e calorias) (Figura 25), evolução e ganho de peso (Figura 26) entre os animais que receberam a ração hipercalórica e hiperlipídica e a ração hipercalórica e hiperlipídica suplementada.

Figura 25 - Ingestão de ração pelos animais dos grupos ração hipercalórica e hiperlipídica e ração hipercalórica e hiperlipídica suplementada.



A: ingestão em gramas. B: ingestão em calorias. HFD: grupo ração hipercalórica e hiperlipídica, HFDS: grupo ração hipercalórica e hiperlipídica suplementada.

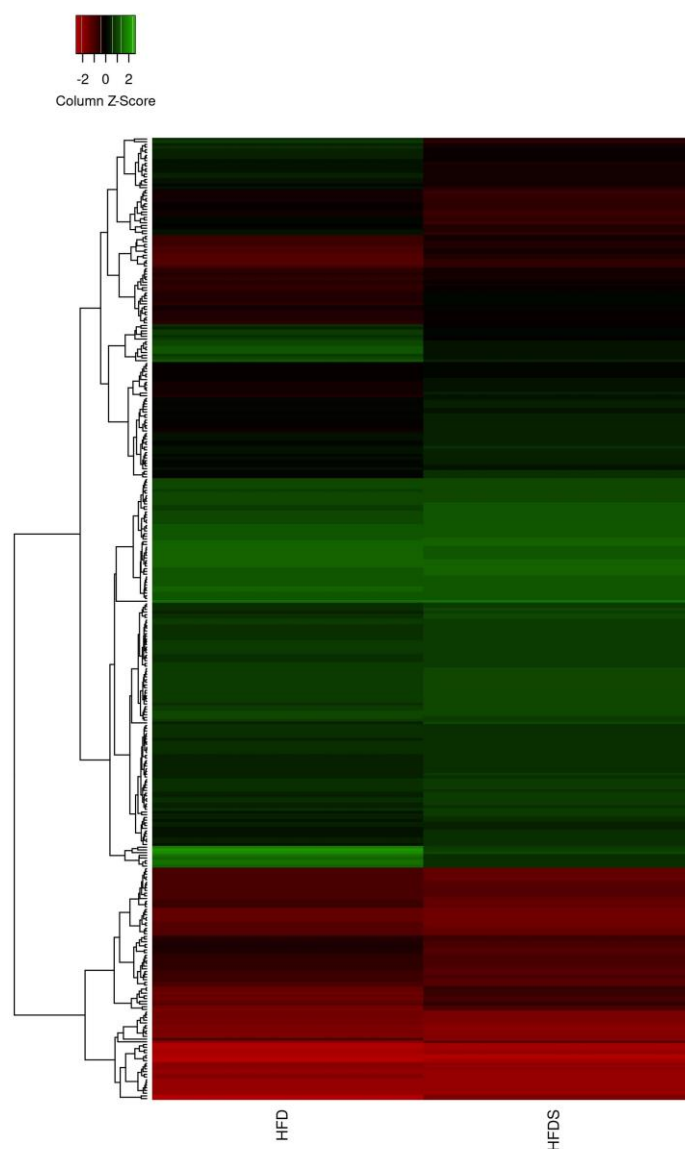
Figura 26 - Peso corporal dos animais dos grupos ração hipercalórica e hiperlipídica e ração hipercalórica e hiperlipídica suplementada.



A: evolução do peso durante por semana de experimento. B: ganho de peso ao final do experimento. HFD: grupo ração hipercalórica e hiperlipídica, HFDS: grupo ração hipercalórica e hiperlipídica suplementada.

A comparação entre o perfil de metilação dos grupos HFD e HFDS revelou 356 sítios CpGs válidos que exibiram metilação diferencial do DNA igual ou superior a 5% ($p < 0,01$; $FDR < 0,05$) (Figura 27). Os sítios CpGs identificados foram relacionados a 299 genes.

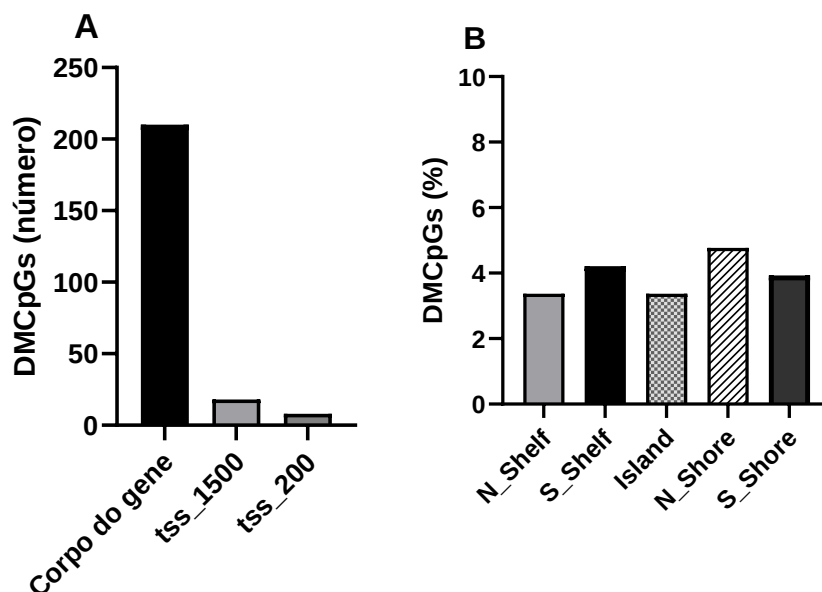
Figura 27 - *Heatmap* dos sítios CpGs diferentemente metilados entre animais submetidos do grupo ração hipercalórica e hiperlipídica e grupo ração hipercalórica e hiperlipídica suplementada.



HFD: grupo ração hipercalórica e hiperlipídica, HFDS: grupo ração hipercalórica e hiperlipídica suplementada.

A Figura 28 mostra as regiões gênicas e a distribuição genômica e cromossômica dos DMCPGs entre animais dos grupos HFD e HFDS. O maior número de DMCPGs encontrado foi no *opensea* (82%) e no corpo dos genes (59%).

Figura 28 - Caracterização das regiões gênicas e a distribuição genômica e cromossômica dos sítios diferencialmente metilados (DMCPGs) entre os animais dos grupos HFD e HFDS.



A: Regiões gênicas dos DMCPGs. B: Distribuição genômica dos DMCPGs em relação a ilha CpG.

Do total, 132 CpGs estavam hipometiladas nos animais do grupo HFDS quando comparado àqueles do grupo HFD. A variação entre os grupos foi de 5 a 24%. Tais sítios CpGs foram relacionados a 99 genes conhecidos. Por outro lado, observou-se 223 CpGs hipermetiladas nos animais do grupo SDS quando comparado àqueles do grupo SD (relacionadas a 195 genes conhecidos). A variação entre os grupos foi de 5 a 17%. A Tabela 3 mostra os 20 principais DMCPGs.

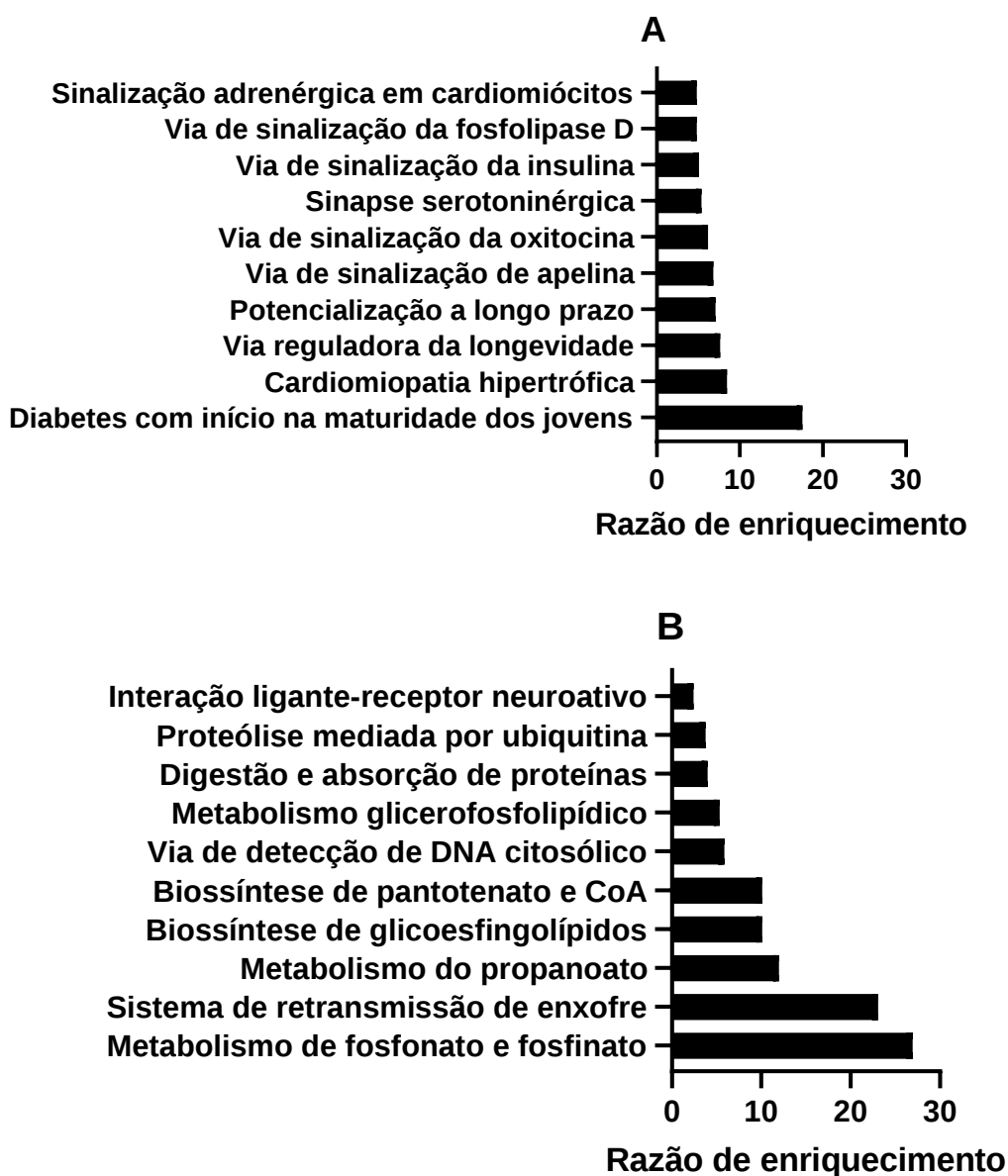
Tabela 3 - Top 20 sítios CpGs diferencialmente metilados nos animais que receberam ração hipercalórica e hiperlipídica quando comparados aqueles que receberam ração hipercalórica e hiperlipídica suplementada.

Sítio CpG	Gene	CHR	Região gênica	Posição em relação a ilha	Níveis de metilação		Δ
					Grupo HFD	Grupo HFDS	
<i>Sítios CpGs hipometilados no grupo HFDS</i>							
cg37717876	Tiprl	1	tss_body	OpenSea	0,41 $\pm$ 0,05	0,66 $\pm$ 0,07	0,24
cg46881155	Rasl12	9	tss_body	OpenSea	0,16 $\pm$ 0,01	0,36 $\pm$ 0,06	0,20
cg45010453	Spdya	7		OpenSea	0,46 $\pm$ 0,07	0,64 $\pm$ 0,03	0,18
cg35181529		17	tss_body	S_Shelf	0,40 $\pm$ 0,05	0,56 $\pm$ 0,05	0,16
cg31655135		13		S_Shelf	0,72 $\pm$ 0,06	0,88 $\pm$ 0,03	0,15
cg33019333		15	tss_body; tss_1500	N_Shore	0,32 $\pm$ 0,03	0,46 $\pm$ 0,05	0,15
cg30216241	BC037032; Oxct1	11		OpenSea	0,60 $\pm$ 0,04	0,74 $\pm$ 0,04	0,14
cg46503959		9		N_Shelf	0,52 $\pm$ 0,05	0,66 $\pm$ 0,03	0,14
cg28254294		10		OpenSea	0,31 $\pm$ 0,04	0,45 $\pm$ 0,01	0,14
cg28990759		10		OpenSea	0,44 $\pm$ 0,04	0,57 $\pm$ 0,01	0,13
<i>Sítios CpGs hipermetilados no grupo HFDS</i>							
cg37664339	Gm39686	15	tss_body	OpenSea	0,60 $\pm$ 0,07	0,40 $\pm$ 0,04	0,18
cg47742163	Tktl1	8	tss_200; tss_body	OpenSea	0,62 $\pm$ 0,03	0,47 $\pm$ 0,07	0,16
cg36528034	Adra2a	7	tss_1500	N_Shore	0,64 $\pm$ 0,03	0,50 $\pm$ 0,03	0,15
cg47790587	Dmd	16	tss_body	OpenSea	0,71 $\pm$ 0,03	0,59 $\pm$ 0,02	0,15
cg28141499	Ptpf	11		OpenSea	0,64 $\pm$ 0,04	0,52 $\pm$ 0,01	0,15
cg48165706		18		OpenSea	0,71 $\pm$ 0,03	0,60 $\pm$ 0,03	0,14
cg41337122		5	tss_body	Island	0,74 $\pm$ 0,04	0,62 $\pm$ 0,09	0,14
cg35616698		15	tss_body	N_Shore	0,81 $\pm$ 0,04	0,70 $\pm$ 0,02	0,13
cg31342093		Gm37013; Gm38666; Gm38667; Pcdhga1-11; Pcdhgb1-8	5	tss_1500	OpenSea	0,67 $\pm$ 0,03	0,56 $\pm$ 0,03
cg28857322	Vmn1r216	5	tss_1500	OpenSea	0,67 $\pm$ 0,03	0,56 $\pm$ 0,03	0,13
	Metap2	4	tss_body	OpenSea	0,73 $\pm$ 0,02	0,62 $\pm$ 0,03	0,13

CHR: cromossomo, Δ : variação entre os grupos, TSS: *transcription start site*

Dentre os sítios CpGs hipometilados e hipermetilados nos animais do grupo HFDS, 32 e 45 genes foram anotados, respectivamente, para as categorias funcionais selecionadas e na lista de referências, sendo assim utilizados para a análise de enriquecimento (Figura 29). Destaca-se as vias metabólicas relacionadas a via de sinalização da fosfolipase D e da sinalização da insulina.

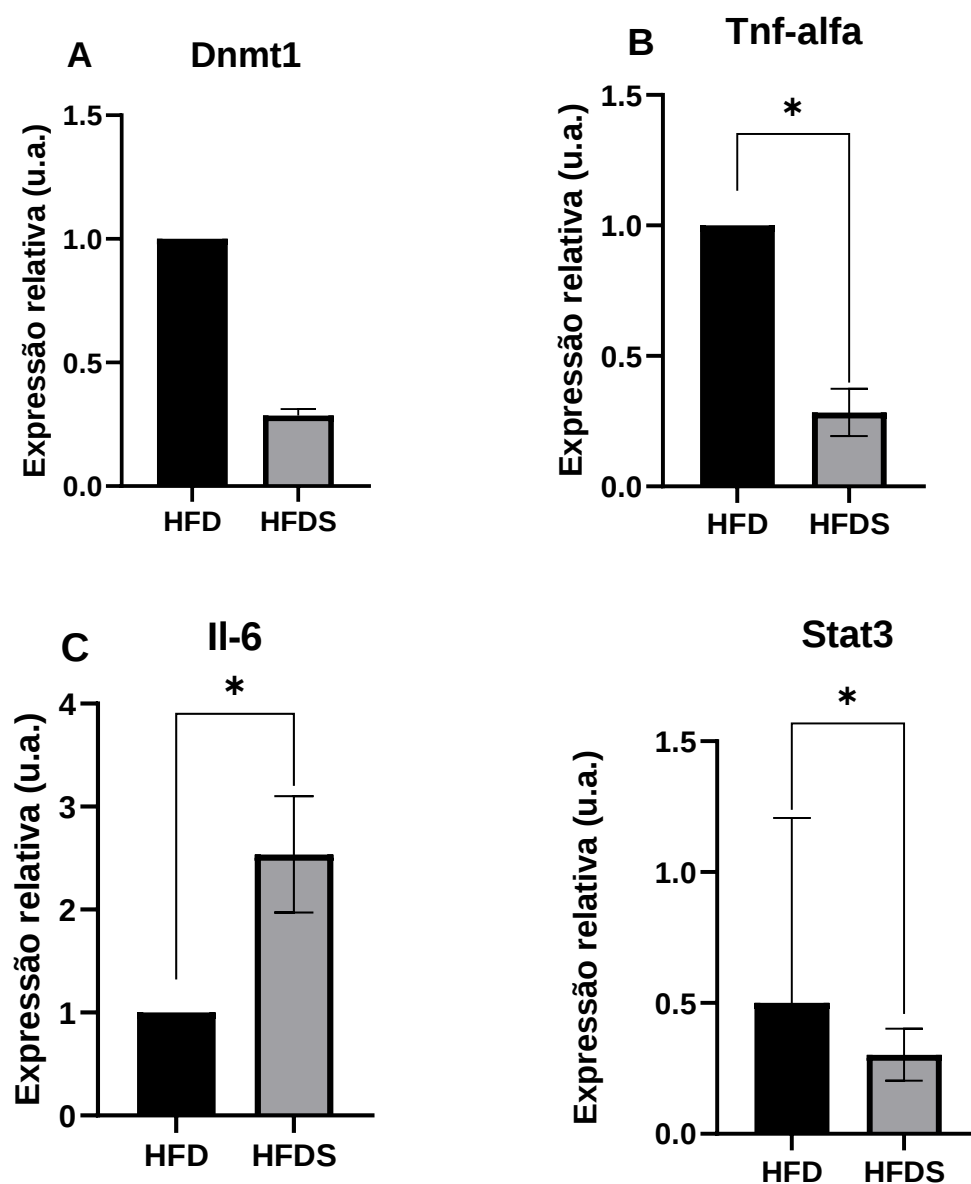
Figura 29 - Análise de enriquecimentos das CpGs diferentemente metiladas entre animais que receberam ração hipercalórica e hiperlipídica e ração hipercalórica e hiperlipídica suplementada.



A: Vias relacionadas aos genes hipometilados; B: Vias relacionadas aos genes hipermetilados.

A análise da expressão gênica mostrou uma menor expressão dos genes *Tnf-alfa* e *Stat3* ($U = 3,500$, $U = 3,000$; $p < 0,001$) e maior expressão de *Il-6* ($U = 2,000$; $p < 0,001$) no tecido adiposo de animais do grupo HFDS quando comparados ao grupo HFD (Figura 30). Não foi possível obter resultados do gene *Lep*.

Figura 30 - Expressão gênica relativa no tecido adiposo de animais alimentados com ração hipercalórica e hiperlipídica e ração hipercalórica e hiperlipídica suplementada.

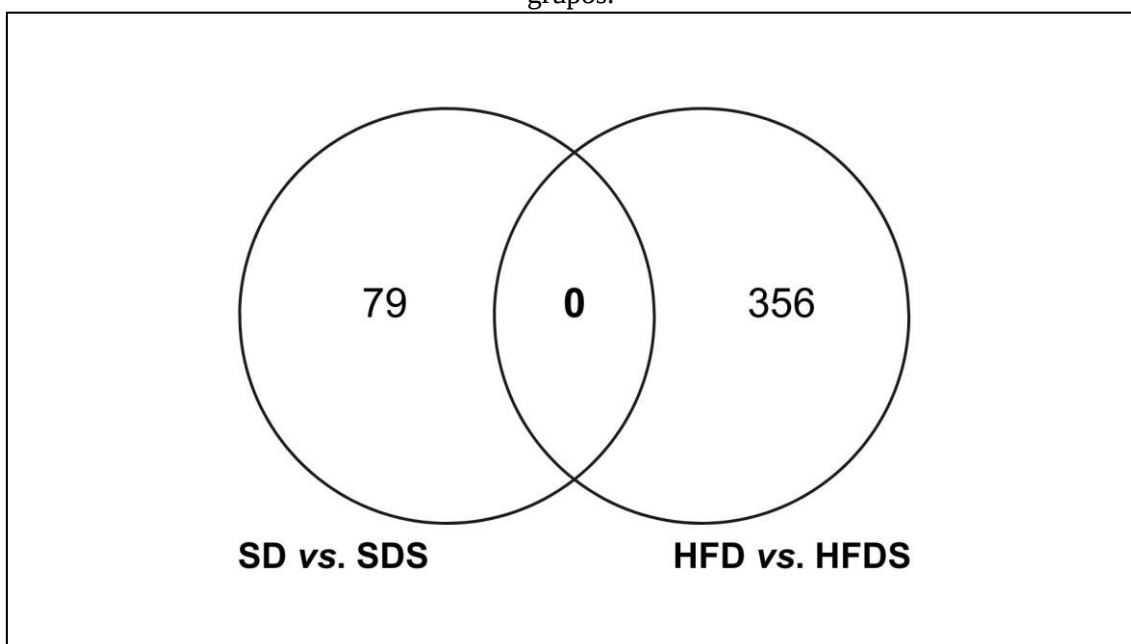


HFD: SD: grupo hipercalórica e hiperlipídica, HFDS: hipercalórica e hiperlipídica suplementada.
*: $p < 0,05$.

5.5 Comparação do efeito da suplementação entre os grupos

A Figura 31 mostra o diagrama de Venn entre as DMCPGs encontradas quando comparado os grupos SD e SDS e quando comparado os grupos HFD e HFDS. Não foram observados sítios CpGs em comum em ambas as comparações.

Figura 31 - Diagrama de Venn entre as CpGs diferentemente metiladas na comparação dos grupos.



SD: dieta padrão, SDS: dieta padrão suplementada, HFD: dieta hipercalórica e hiperlipídica, HFDS: dieta hipercalórica e hiperlipídica suplementada.

Discussão

6. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a exposição a uma ração hipercalórica e hiperlipídica, quando comparada a uma ração padrão, promove aumento do peso corporal e tecido adiposo, assim como modificações do perfil de metilação do DNA e de expressão gênica em animais com LES induzido. Ainda, a exposição as mesmas rações suplementadas com ácido fólico e vitamina B12, apesar de não modificar o peso, também ocasiona mudanças nos níveis de metilação do DNA e expressão gênica; entretanto, o efeito da suplementação é diferente entre os animais alimentados com uma ração padrão ou ração hipercalórica e hiperlipídica.

Camundongos NZBWF1/J desenvolvem uma doença autoimune semelhante ao LES humano. Tais camundongos são provenientes do cruzamento híbrido entre camundongos F1 pretos da Nova Zelândia (NZB/F1) e brancos da Nova Zelândia (NZB/W) o qual promove a produção de autoanticorpos de imunoglobulina G, glomerulonefrite grave progressiva e sobrevivência de linfócitos autorreativos, predispondo, assim, ao desenvolvimento da doença autoimune (139). No presente estudo, apesar de não ter sido avaliado marcadores séricos de LES, observou-se que todos os animais desenvolveram *rash* malar, um dos sinais clínicos mais predominantes da doença.

Camundongos alimentados com ração hipercalórica e hiperlipídica apresentaram maior ganho de peso corporal (duas vezes mais) em comparação com os camundongos alimentados com ração padrão. Em modelos murinos, a obesidade pode ser definida pelo aumento do peso corporal e acúmulo de lipídios no tecido adiposo (140). De fato, diversos estudos utilizaram ração hipercalórica e hiperlipídica como modelo indutor da obesidade em camundongos (141–144). Habiby, Mehrdad et al., 2024 (141) após submeter camundongos da linhagem C57BL/6 à uma ração rica em gordura durante 14 semanas observou um ganho de peso total significativamente maior nesses animais quando comparados aos que receberam ração padrão. É digno de nota que o ganho de peso encontrado no presente estudo não foi devido a diferenças na quantidade de ração consumida, uma vez que animais do grupo HFD ingeriram uma menor quantidade de ração do que aqueles do grupo SD; contudo, a densidade calórica da ração hipercalórica e hiperlipídica era 57% maior que a ração padrão, propiciando, assim, o aumento do peso e da quantidade de gordura.

Interessantemente, identificamos 193 DMCPGs entre animais com LES submetidos a ração hipercalórica e hiperlipídica (com obesidade) quando comparados a animais com peso normal submetidos a ração regular, sendo que 52,8% dessas DMCPGs encontravam-se hipometiladas, enquanto 47,2% encontravam-se hipermetiladas nos camundongos do grupo HFD(145). Já está bem estabelecido que uma dieta rica em gordura estimula a proliferação de pré-adipócitos no tecido adiposo subcutâneo, e os mecanismos associados a esse processo incluem modificações epigenéticas(146). Assim, mudanças nos padrões epigenéticos decorrentes da dieta hipercalórica e hiperlipídica podem alterar as funções do tecido adiposo, levando à obesidade (146).

As análises de enriquecimento mostraram que as CpGs hipometiladas estavam localizadas em genes relacionados a via de sinalização de MAPK, isto é, CpGs em importantes genes dessa via apresentaram menores níveis de metilação do DNA no tecido adiposo de camundongos alimentados com HFD em comparação com o grupo controle. As MAPKs consistem em uma subfamília de proteínas-quinase específicas de serina/treonina as quais estão implicadas em vários processos celulares, incluindo proliferação e diferenciação, apoptose, resposta ao estresse e inflamação (147) e vem sendo intimamente relacionada à patogênese do LES(148). A ativação da MAPK está presente na sinalização da resposta imune inata, e sua supressão pode reduzir os níveis de inflamação (149). Nesse cenário, alguns autores demonstraram que o bloqueio da ativação da p38 MAPK reduz a produção de citocinas inflamatórias como IFN-gama e IL-6 em amostras de pacientes com LES (150). Assim, sugere-se uma forte correlação de sinalização MAPK à inflamação em animais com LES após consumo de ração hipercalórica e hiperlipídica. Assim, acredita-se que a hipometilação do DNA de genes associados a essa via poderia levar a maior expressão e maior produção de citocinas inflamatórias em animais com obesidade.

Em adição, CpGs em genes relacionados à via de AMPc (monofosfato de adenosina cíclico) também estavam hipometilados em animais do grupo HFD quando comparados aqueles que receberam ração padrão. O AMPc atua como segundo mensageiro e regula uma infinidade de processos biológicos importantes sob condições fisiológicas e patológicas (151), como por exemplo a diferenciação de adipócitos (152) e processos de apoptose celular (153). Além disso, o AMPc é produzido durante a fagocitose, atuando na facilitação da produção de mediadores pró-inflamatórios. No LES, a disponibilidade de autoantígeno ocasiona as respostas imunes autorreativas. As células

apoptóticas representam uma importante fonte de autoantígenos, e um comprometimento da remoção de material apoptótico pode contribuir para o desenvolvimento de autoimunidade. Estudo em modelo animal com LES mostrou que a leptina promove a fagocitose do material apoptótico por macrófagos e a subsequente disponibilidade de antígeno derivado do apoptose para células T (154). O aumento do tecido adiposo decorrente da ingestão de ração hipercalórica e hiperlipídica pode levar ao aumento das concentrações de leptina, com consequente aumento da apresentação de antígenos e piora da autoimunidade no LES. A hipometilação do DNA de genes dessa via poderia levar a maior expressão e maior produção de células autorreativas e maior autoimunidade.

Por outro lado, as análises de enriquecimento mostraram que as CpGs hipermetiladas no grupo HFD em comparação ao grupo SD estavam localizadas em genes relacionados a via do metabolismo da insulina e migração de leucócitos. Já está bem descrito na literatura que a obesidade e acúmulo de tecido adiposo promovem resistência à insulina (155). Entre as moléculas de sinalização da via da insulina, a PI3K, composta por uma subunidade catalítica e uma subunidade reguladora (p85) que é codificada pelo gene PIK3R1, é um mediador chave das ações metabólicas da insulina (156). A associação do PI3K com o receptor de insulina resulta em uma cascata de sinalização que culmina na ativação de Akt e na translocação do transportador de glicose (GLUT), aumentando a captação de glicose para o interior das células (156). Por outro lado, o gene Ácido graxo sintase (Fasn) codifica uma enzima relacionada a síntese *de novo* de ácidos graxos. Autores demonstraram previamente que um aumento da atividade de Fasn no tecido adiposo visceral acarretou aumento da concentração de ácidos graxos na veia porta, alterando o metabolismo hepático e promovendo resistência à insulina (157). Ainda, o aumento da expressão gênica de Fasn no tecido adiposo visceral foi associada a menor sensibilidade à insulina e aumento da secreção de citocinas, como Il-6 (157). Assim, a hipermetilação do DNA de genes dessa via como PIK3r1 e Fasn poderia levar a menor expressão e consequentemente menor sensibilidade a insulina e resistência insulina nos animais alimentados com a ração hipercalórica e hiperlipídica.

A via de migração de leucócitos é importante mecanismo de resposta imune agindo no processo de migração de células T para o local de inflamação (158). A via PIK3R1-Akt também apresenta papel importante no crescimento, proliferação, sobrevivência, motilidade e migração celular (159). De maneira contrária aos achados no presente estudo, esperava-se uma hipometilação do DNA de genes relacionados a via de

migração de leucócitos no grupo HFD visto que a obesidade aumenta a inflamação no tecido adiposo, promovendo uma transformação na composição dos leucócitos residentes nesse tecido, caracterizada por um influxo de leucócitos pró-inflamatórios (160). Estudos (161,162) em modelos murinos de obesidade sugerem que existe um recrutamento de células T CD8⁺ anteriormente a infiltração de macrófagos M1 no tecido adiposo. Entretanto, outros autores evidenciaram que regulação do recrutamento de leucócitos é diferente a depender da localização do tecido adiposo (visceral vs. subcutâneo) (162).

Além disso, os níveis de expressão gênica de Tnf-alfa, Il-6, Stat3, Dnmt1 e Lep foram menores nos animais que receberam ração hiperlipídica e hipercalórica quando comparadas as que receberam ração padrão. Alguns desses achados foram contrários aos esperados. O tecido adiposo produz de 100 a 1.000 vezes mais citocinas pró-inflamatórias, como Il-6 e Tnf-alfa quando comparado com os demais tecidos (e.g. rins e fígado), em resposta a algumas alterações metabólicas, como a obesidade (163). Assim, esperava-se que os animais do grupo HFD que se tornaram obesos após 12 semanas do experimento apresentassem uma maior expressão de ambos os genes. Em contraste aos nossos resultados alguns estudos demonstram maior expressão gênica de IL-6 e TNF-alfa no tecido adiposo de indivíduos com obesidade quando comparados a indivíduos com peso adequado (164,165). Considerando a expressão dos genes Lep e Stat3, sabe-se que a expressão da leptina é regulada, principalmente, pela ingestão alimentar, hormônios e por mediadores inflamatórios e que seus níveis circulantes são diretamente correlacionados com a massa de tecido adiposo (166). Assim, a leptina é superexpressa no tecido adiposo de indivíduos com obesidade (167). Entretanto, apesar dos resultados da literatura, nossos achados mostraram menor expressão de Lep em animais do grupo HFD. Ainda, em resposta à leptina, o seu receptor quando ativado por JAK2 se liga ao STAT3, que é então fosforilado (168). O STAT3 fosforilado é então translocado do citoplasma para o núcleo, onde atua como um fator de transcrição para regular a expressão de seus genes alvo(169). Considerando esse processo, a menor expressão do Stat3 pode estar associada a menor expressão de leptina, com consequente menor ativação da referida cascata de sinalização.

Como esperado, não foram observadas diferenças entre o consumo alimentar e o ganho de peso dos animais alimentados com as rações suplementadas quando comparados com aqueles alimentados com as respectivas rações padrão (sem suplemento). Entretanto, observou-se uma diferença entre os perfis de metilação do DNA dos animais do grupo

SDS quando comparados ao do grupo SD e do grupo HFDS quando comparados aos do grupo HFD. A literatura mostra que alguns micronutrientes, como os estudados no presente estudo (ácido fólico e vitamina B12) são capazes de fornecer grupos metil para as reações de metilação do DNA e de outras moléculas (170–172). Assim, a suplementação com os chamados nutrientes doadores de grupo metil pode influenciar os níveis de metilação de regiões promotoras de determinados genes, modulando a expressão gênica (173,174).

Ao comparar de maneira exploratória o perfil de metilação do DNA dos grupos SDS e SD, foram identificados 79 DMCPGs, sendo que 53,2% das DMCPGs estavam hipometiladas, enquanto 46,8% estavam hipermetiladas nos camundongos que receberam a ração padrão suplementada. As CpGs hipometiladas estavam localizadas em genes relacionados a vias metabólicas de termogênese e regulação da lipólise nos adipócitos.

A adenilato ciclase, enzima codificada por gene do mesmo nome (*Adcy5*) é responsável por catalisar a conversão de trifosfato de adenosina (ATP) em cAMP e pirofosfato, participando de reações metabólicas como termogênese e lipólise. Ainda, os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (*Ppars*) são fatores de transcrição envolvidos na regulação da homeostase metabólica, metabolismo de lipídios, adipogênese e inflamação. Nesse contexto, ambos os genes estão envolvidos na patogênese de doenças metabólicas, como diabetes mellitus tipo 2, síndrome metabólica e doenças cardiovasculares(174). Considerando que o LES aumenta o risco de doenças metabólicas principalmente devido ao seu estado pró-inflamatório permanente, junto com os efeitos secundários de medicações e estilo de vida a modulação epigenética desses genes e consequentemente dessas vias pela suplementação de nutrientes doadores de grupo metil poderia ser uma estratégia interessante. Acredita-se que a hipometilação do DNA encontrada nos genes acima citados após dieta padrão suplementada levaria a uma maior expressão gênica, com consequente maior controle metabólico, com melhora do metabolismo energético e da lipólise no tecido adiposo (174) . Esses dados corroboram com estudo prévio em modelo animal que mostrou menores níveis de metilação do gene *Ppar-gama* no tecido adiposo de filhotes alimentados com dieta suplementada com ácido fólico quando comparado àqueles alimentados com dieta controle(175).

Por outro lado, as análises de enriquecimento mostraram que as CpGs hipermetiladas nos animais do grupo SDS se relacionavam a genes importantes das vias de interação citocina-receptor de citocina, regulação de quimiocinas e via de sinalização

do nf-kb. As quimiocinas são proteínas extracelulares solúveis que são partes integrantes da rede de sinalização entre as células e podem influenciar o processo de crescimento, desenvolvimento (176) e, principalmente, o tráfego de leucócitos na resposta imune à inflamação. Participam das respostas inflamatórias e da regulação imunológica proteínas do eixo CCL21/CCR7, as quais são altamente expressas em doenças autoimunes (177). Em ambas as vias de interação citocina-receptor de citocina e regulação de quimiocinas, o gene *Ccl21b* teve destaque. O ligante de quimiocina 21 (CCL21) é o conhecido ligante de alta afinidade que se liga ao CCR7, um receptor acoplado à proteína G que é expresso em várias células do sistema imune (e.g. células T reguladoras, células dendríticas, células *natural killers*), impulsionando a migração celular nos tecidos (177). Em estudo prévio, aumentos nos níveis de CCL2 foram associados a pacientes com LES que entram em um estado de exacerbação da atividade (178). De maneira interessante, evidências recentes mostram que a interrupção da interação CCL21/CCR7 evita a migração de células imunes que expressam CCR7 no local da inflamação e reduz a gravidade das doenças autoimunes. Assim, o bloqueio da sinalização CCL21-CCR7 pode aliviar a progressão da doença, sendo considerado um potencial alvo terapêutico (177). Nesse sentido, a hipermetilação do gene *Ccl21b* e um possível silenciamento gênico após a suplementação com ácido fólico e vitamina B12 pode gerar consequências positivas na atenuação da resposta imune.

O fator de transcrição NF- κ B regula múltiplos aspectos das funções imunes inatas e adaptativas, agindo como um importante mediador da resposta inflamatória (179). Além disso, crescente número de estudos vem demonstrando o envolvimento da via do NF- κ B na sinalização pró-inflamatória que medeia o dano glomerular e túbulo-intersticial em pacientes com nefrite decorrente do LES (180,181). O IFN tipo I em conjunto com outras citocinas pró-inflamatórias, provoca uma hiperativação de NF- κ B, que amplifica a explosão de citocinas e regula negativamente a expressão de uma proteína transmembrana (182) a qual é produzida pelas células renais e tem antienvelhecimento, anti-inflamatório, antifibrótico e protetor em diversos órgãos e tecidos, como o rim (183). Portanto, essa relação negativa relaciona-se ao dano renal associado ao LES. Nesse sentido, a hipermetilação de genes relacionados via do NF- κ B em animais alimentados com ração padrão suplementada pode acarretar uma reduzida expressão de NF- κ B, com menor prejuízo da função renal.

A comparação do perfil de metilação do DNA dos grupos HFDS e HFD identificou 356 DMCPGs, sendo que 37,1 % das DMCPGs estavam hipometiladas, enquanto 62,6 % estavam hipermetiladas nos camundongos que receberam a ração hipercalórica e hiperlipídica suplementada. As análises de enriquecimento mostraram que as CpGs hipometiladas estavam localizadas em genes relacionados a via de sinalização da insulina. Já está bem descrito na literatura que os níveis de insulina e o índice de resistência à insulina estimada pelo modelo de homeostase (HOMA-IR) estão aumentados em pacientes com LES(184,185). Juntamente com outros componentes da síndrome metabólica, a resistência à insulina acarreta maior risco de doenças cardiovasculares (184). A hipometilação de genes que favorecem a sensibilidade e o metabolismo da insulina após suplementação de nutrientes doadores de grupo metil é resultado satisfatório, ainda mais em animais com obesidade induzida por dieta hipercalórica e hiperlipídica. De maneira interessante, um ensaio clínico randomizado no qual pacientes com diabetes tipo 2 e em uso de antidiabéticos orais receberam suplementação de ácido fólico (5mg/dia), metilcobalamina (500 mcg/dia) ou ambos durante oito semanas, observaram que a suplementação complementar com vitamina B12 melhorou o controle glicêmico e a resistência à insulina (186) . Entretanto, estudo com camundongos C57BL/6J grávidas alimentados com dieta padrão contendo 2 ou 40 mg de ácido fólico (por kg de ração) mostrou que a suplementação materna excessiva de ácido fólico em camundongos leva a uma menor síntese de insulina na prole (186).

As análises de enriquecimento mostraram que as CpGs hipermetiladas se relacionavam a genes importantes da via de detecção de DNA citosólico. Essa via é um componente importante do sistema imunológico inato que funciona para detectar a presença de DNA citosólico e, em resposta, desencadear a expressão de genes inflamatórios, induzindo resposta imune (187). Ainda, a ativação crônica dessa via também pode ser responsável pelo início de certas doenças inflamatórias manifestadas pelo próprio DNA (188). De maneira geral, a via de detecção de DNA citosólico culminam na produção aumentada mediadores imunológicos e inflamatórios, incluindo interferons tipo I e III, aumentando as respostas autoimunes (189,190). Assim, a hipermetilação de genes associados a essa via de sinalização após suplementação com ácido fólico e vitamina B12 levaria a uma atenuação da resposta imune do LES.

Destaca-se que não foram observados sítios CpGs em comum em ambas as comparações em relação a suplementação de nutrientes doadores de grupo metil, ou seja,

os sítios CpGs diferentemente metilados entre os grupos SDS vs. SD e HFDS vs. HFD foram diferentes. Tais achados mostram que a suplementação teve um efeito no perfil de metilação do DNA de ambos os grupos, porém de maneira diferente. Existem diversos estudos na literatura avaliando o efeito da suplementação de nutrientes doadores de metil nos níveis de metilação do DNA, entretanto nenhum deles utilizou modelo murino de LES, tampouco tecido adiposo. Estudo com camundongos C57BL/6J no qual as mães foram alimentadas com dieta padrão ou rica em gordura, com ou sem suplementação de colina (cloreto de colina - 25mM) e os respectivos filhotes alimentados com dieta rica em gordura por seis semanas demonstrou que suplementação materna de colina durante o período pré-natal alterou o perfil de metilação do DNA do tecido adiposo da prole, principalmente do gene *Lep* (191). De maneira interessante, outro estudo *in vivo* no qual animais receberam ração padrão ou rica em gordura e suplementação de ácido fólico na água (20µg/mL) durante 10 semanas evidenciou que suplementação alterou o perfil de metilação do DNA em camundongos expostos a ração rica em gordura (192). Além disso, aumento dos níveis de metilação global do DNA no tecido adiposo foram observados após a exposição a rações com diferentes concentrações de ácido fólico (2, 5 ou 40 mg/kg de dieta) antes e durante a gravidez (193). Por fim, uma meta-análise conduzida por nosso grupo de pesquisa com 18 estudos clínicos, 35 em modelo animal e 4 estudos *in vitro* avaliando o efeito da suplementação de nutrientes doadores de grupo metil nos níveis de metilação do DNA evidenciou que, em modelos animais, a suplementação de ácido fólico afetou significativamente a metilação do DNA e que altas e superdoses mostraram aumentos na metilação do DNA quando comparada a doses baixas. No entanto, os resultados dos estudos com humanos mostraram que a suplementação de ácido fólico não promoveu alterações significativas(194).

Ainda, é possível encontrar na literatura estudos avaliando a relação entre nutrientes doadores de grupo metil e o estado inflamatório consequente de diversas doenças. Em modelos murinos, a depleção de doadores de metila foi associada ao desenvolvimento aberrante de células B(195), sugerindo um papel essencial dos nutrientes doadores de grupo metil na sobrevivência e função das células imunológicas, modulando a inflamação quando há uma quantidade adequada desses nutrientes(196). Recente revisão mostrou que poucos são os estudos avaliando aspectos nutricionais e metilação do DNA no âmbito do LES (197). Dos cinco estudos abordados na revisão, apenas três englobavam nutrientes doadores de grupo metil. Um estudo em modelo de

camundongo transgênico com LES alimentado com dietas com concentrações variadas de micronutrientes doadores de metil (betaina, metionina, colina, ácido fólico, vitamina B2, B6, B12) mostrou que uma dieta enriquecida em doadores de metila e cofatores preveniu a desmetilação do DNA e melhorou a resposta de autoanticorpos e a doença renal associada (197). Já um estudo *in vitro* com células T CD4⁺ isoladas de pacientes com LES examinou o efeito de um tratamento com diferentes níveis de metionina tratamento e observou que baixos níveis de metionina no meio celular podem inibir a metilação do DNA em células T CD4⁺, ativando a expressão de receptores semelhantes a imunoglobulinas de células *natural killers* (198). Por fim, estudo clínico evidenciou associação entre a ingestão de metionina, colina e cisteína a níveis mais elevados de metilação do gene CD40L em pacientes com LES (199).

Em relação a expressão gênica, observou-se que animais do grupo SDS apresentaram menor expressão de Tnf-alfa, Il-6, Dnmt1 e Stat3 quando comparados aos camundongos do grupo SD; contudo, não foi observada diferença na expressão de Lep. Considerando que Tnf-alfa e Il-6 estão fortemente ligados a via da inflamação, os achados foram considerados satisfatórios. Estudos anteriores evidenciaram associação positiva entre níveis aumentados de TNF-alfa e gravidade da doença em pacientes com LES (200,201). Ainda, enfatiza-se que níveis elevados de TNF-alfa em pacientes com LES, bem como a possível dislipoproteinemia pode relacionar-se com o risco aumentado de doença cardiovascular em pacientes com LES (201). Em relação a expressão de Dnmt1, os resultados foram contrários ao esperado.

Por outro lado, observou-se que animais do grupo HFDS apresentaram menor expressão de Tnf-alfa e Stat3, e maior expressão de Il-6 quando comparados aos camundongos do grupo HFD; contudo, não foi observada diferença na expressão de Dnmt1. Como dito anteriormente, tanto a Il-6 como o Tnf-alfa são importantes citocinas presentes no tecido adiposo no processo de inflamação. Na obesidade estes genes apresentam-se mais expressos como um mecanismo de resposta a inflamação neste tecido. No entanto, nossos resultados demonstraram que animais que consumiram ração hipercalórica e hiperlipídica, suplementada com ácido fólico e vitamina B12 apresentaram maior expressão gênica quando comparados ao grupo não suplementado, o que não corrobora com outros estudos que destacam que baixas concentrações de vitamina B12 (sérica e nos adipócitos) estimula uma maior expressão gênica e secreção

de citocinas pró-inflamatórias, podendo levar à disfunção dos adipócitos, mostrando que a suplementação desse nutriente possui efeito anti-inflamatório (202,203).

Considerando que uma expressão reduzida de DNMT1 vem sendo relacionada a hipometilação do DNA encontrado no LES (204–206) e que os níveis de nutrientes como ácido fólico e vitaminas do complexo estão relacionados aos níveis de metilação do DNA (207), esperava-se que a suplementação promovesse um aumento da expressão de Dnmt1, fato esse que também poderia explicar as modificações no perfil de metilação do DNA. Entretanto, estudo com ratos machos F344 alimentados com uma dieta deficiente em L-metionina e desprovida de ácido fólico e colina encontrou elevado nível de Dnmt1 nesses animais. De acordo com os autores, a correlação entre a expressão gênica e proteica de Dnmt1 indicou que a deficiência de ácido fólico e outros nutrientes doadores de grupo metil induziu a expressão do gene Dnmt1 em nível transcricional ou pós-transcricional (208). Por outro lado, estudos com camundongos fêmeas C57BL/6 alimentadas com dietas com 9 combinações de folato e B12 por quatro semanas mostrou a deficiência de B12 em combinação com a deficiência de folato, bem como a suplementação excessiva de folato levaram ao aumento dos níveis de RNAm de DNMT1 no cérebro e no fígado, e diminuição nos rins de filhotes nascidos e alimentados com a mesma dieta materna. A suplementação de B12 combinada com folato normal resultou na regulação negativa do DNMT1 (209).

Esse estudo foi o pioneiro em avaliar a interação da obesidade induzida por dieta hipercalórica e hiperlipídica com o LES no perfil de metilação do DNA do tecido adiposo, assim como em avaliar os efeitos da suplementação de ácido fólico e vitamina B12 no perfil de metilação do DNA, assim como na expressão de genes alvos no tecido adiposo de modelo murino de LES. Estudos anteriores já haviam identificado o papel da obesidade na exacerbação da sintomatologia do LES, principalmente devido ao aumento de adipocinas (210,211). O presente estudo reforça que mecanismos epigenéticos, principalmente relacionados a metilação do DNA estão envolvidos na piora metabólica e da inflamação em modelos de LES e obesidade.

Ainda, considerando que os eventos epigenéticos são potencialmente reversíveis, a modulação dos níveis de metilação do DNA pode atuar como estratégia promissora na prevenção, assim como no tratamento de diversas doenças, entre elas o LES. Nesse cenário, a nutrição desempenha um papel crucial na modulação do perfil dinâmico de metilação do DNA (212). A suplementação de micronutrientes doadores de grupo metil

como o ácido fólico e vitamina B12 pode ser uma estratégia importante para que ocorra mudanças nos níveis de metilação do DNA, fornecendo a possibilidade de projetar intervenções epigenéticas individualizadas. Apesar dos achados importantes, o conhecimento sobre tipo de nutrientes, dosagens apropriadas e momento adequado para suplementação ainda é limitado (213).

Além disso, ressalta-se que a suplementação promoveu tanto a hipo quanto a hipermetilação do DNA e que os efeitos nos camundongos que receberam ração padrão ou ração hipercalórica e hiperlipídica foram distintos. Tais achados reforçam o fato de que ainda é uma lacuna na literatura de como os agrupamentos metil interagem com o DNA de maneira global ou gene específica, não sendo possível direcionar um gene para regulação epigenética por meio da suplementação de micronutrientes (212).

Assim, o tecido adiposo foi significativamente impactado por alterações epigenéticas em resposta à exposição a diferentes tipos de rações, especialmente aquelas com alto teor de gordura, as quais exercem efeitos marcantes sobre o perfil de metilação do DNA e expressão gênica. Especula-se que essas mudanças podem contribuir para a exacerbada inflamação associada a obesidade, fatores que, por sua vez, podem estar associados a um prognóstico desfavorável no LES. Dada a natureza exploratória deste estudo, sugere-se que pesquisas futuras explorem o potencial terapêutico da suplementação de vitamina B12 e ácido fólico no tratamento da inflamação associada ao LES e à obesidade.

Conclusão

7. CONCLUSÃO

Concluiu-se que o perfil de metilação do DNA de modelo animal de LES alimentado com ração hipercalórica e hiperlipídica é diferente daqueles alimentados com ração padrão. Ainda, a expressão de Dnmt1, Il-6, Tnf-alfa, Stat3 e Lep foram menores em animais alimentados com ração hipercalórica e hiperlipídica do que com a ração padrão.

O perfil de metilação do DNA de modelo animal de LES alimentado com ração padrão suplementada é diferente daqueles alimentados com ração padrão. Ainda, a expressão de Dnmt1, Il-6, Tnf-alfa e Stat3 foram menores em animais alimentados com ração padrão suplementada.

O perfil de metilação do DNA de modelo animal de LES alimentado com ração hipercalórica e hiperlipídica suplementada é diferente daqueles alimentados com ração hipercalórica e hiperlipídica. Ainda, a expressão de Tnf-alfa e Stat3 foram menores e de Il-6 maior em animais alimentados com ração hiperlipídica e hipercalórica suplementada.

Referências Bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zhan Y, Guo Y, Lu Q. Aberrant Epigenetic Regulation in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus and Its Implication in Precision Medicine. *Cytogenet Genome Res.* 1º de novembro de 2016;149(3):141–55.
2. Skare TL, Dagostini JS, Zanardi PI, Nisihara RM. Infections and systemic lupus erythematosus. *einstein (São Paulo)* [Internet]. 1º de janeiro de 2016 [citado 22 de maio de 2023];14(1):47–51. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/eins/a/ZfSNhJxKLRWr4LLzgx5dvVp/?lang=en>
3. Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) - Sociedade Brasileira de Reumatologia [Internet]. [citado 23 de maio de 2023]. Disponível em: <https://www.reumatologia.org.br/doencas-reumaticas/lupus-eritematoso-sistemico-les/>
4. Goulielmos GN, Zervou MI, Vazgiourakis VM, Ghodke-Puranik Y, Garyfallos A, Niewold TB. The genetics and molecular pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE) in populations of different ancestry. *Gene.* 20 de agosto de 2018;668:59–72.
5. Catharine Cunha DB, Mira R, Guanais Soriano L, Bittencourt Cunha C, Campos Nascimento R. Lupus Eritematoso Sistêmico: Novos Paradigmas e Manejo no Atendimento Emergencial – Revisão de Literatura: Systemic Lupus Erythematosus: New Paradigms and Management in the Emergency Care – Literature Review. *Revista Científica Hospital Santa Izabel* [Internet]. 11 de maio de 2020 [citado 22 de maio de 2023];4(1):57–62. Disponível em: <https://revistacientifica.hospitalsantaizabel.org.br/index.php/RCHSI/article/view/73>
6. Taylor EB. The complex role of adipokines in obesity, inflammation, and autoimmunity. *Clin Sci.* 2021;135(6):731–52.
7. Teh P, Zakhary B, Sandhu VK. The impact of obesity on SLE disease activity: findings from the Southern California Lupus Registry (SCOLR). *Clin Rheumatol.* 14 de fevereiro de 2019;38(2):597–600.
8. Borges MC, dos Santos F de MM, Telles RW, Lanna CCD, Correia MITD. Nutritional status and food intake in patients with systemic lupus erythematosus.

- Nutrition [Internet]. novembro de 2012 [citado 22 de maio de 2023];28(11–12):1098–103. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22898268/>
9. de Medeiros MCS, Medeiros JCA, de Medeiros HJ, Leitão JCG de C, Knackfuss MI. Dietary intervention and health in patients with systemic lupus erythematosus: A systematic review of the evidence. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 8 de setembro de 2019;59(16):2666–73.
 10. Liu Y, Yu Y, Matarese G, La Cava A. Cutting edge: fasting-induced hypoleptinemia expands functional regulatory T cells in systemic lupus erythematosus. *J Immunol*. 1º de março de 2012;188(5):2070–3.
 11. Lau DCW, Dhillon B, Yan H, Szmitko PE, Verma S. Adipokines: Molecular links between obesity and atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. maio de 2005;288(5 57-5).
 12. Caballero AE. Endothelial dysfunction in obesity and insulin resistance: a road to diabetes and heart disease. *Obes Res* [Internet]. 2003 [citado 22 de maio de 2023];11(11):1278–89. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14627747/>
 13. Berg AH, Scherer PE. Adipose Tissue, Inflammation, and Cardiovascular Disease. *Circ Res* [Internet]. 13 de maio de 2005 [citado 16 de maio de 2023];96(9):939–49. Disponível em: <https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/01.RES.0000163635.62927.34>
 14. Pi-Sunyer FX. The obesity epidemic: pathophysiology and consequences of obesity. *Obes Res* [Internet]. 2002 [citado 16 de maio de 2023];10 Suppl 2(SUPPL. 2). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12490658/>
 15. 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. *Nutrients* [Internet]. 4 de fevereiro de 2021 [citado 23 de maio de 2023];13(2):504. Disponível em: [/pmc/articles/PMC7913625/](https://pmc/articles/PMC7913625/)
 16. 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. *Nutrients* [Internet]. 1º de fevereiro de 2021 [citado 23 de maio de 2023];13(2):1–12. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33557015/>
 17. Rauen T, Hedrich CM, Juang YT, Tenbrock K, Tsokos GC. cAMP-responsive element modulator (CREM) α protein induces interleukin 17A expression and

- mediates epigenetic alterations at the interleukin-17A gene locus in patients with systemic lupus erythematosus. *Journal of Biological Chemistry*. 16 de dezembro de 2011;286(50):43437–46.
18. Mahajan A, Sapehia D, Bagga R, Kaur J. Different dietary combinations of folic acid and vitamin B12 in parental diet results in epigenetic reprogramming of IGF2R and KCNQ1OT1 in placenta and fetal tissues in mice. *Mol Reprod Dev*. 2021;88(6):437–58.
 19. Chango A, Pogribny IP. Considering maternal dietary modulators for epigenetic regulation and programming of the fetal epigenome. *Nutrients*. 14 de abril de 2015;7(4):2748–70.
 20. Barua S, Kuizon S, Brown WT, Junaid MA. DNA methylation profiling at single-base resolution reveals gestational folic acid supplementation influences the epigenome of mouse offspring cerebellum. *Front Neurosci*. 2016;10(MAY).
 21. Waterland RA, Jirtle RL. Transposable Elements: Targets for Early Nutritional Effects on Epigenetic Gene Regulation. *Mol Cell Biol*. 1º de agosto de 2003;23(15):5293.
 22. Waterland RA, Travisano M, Tahiliani KG, Rached MT, Mirza S. Methyl donor supplementation prevents transgenerational amplification of obesity. *Int J Obes (Lond)*. setembro de 2008;32(9):1373–9.
 23. Cropley JE, Suter CM, Beckman KB, Martin DIK. Germ-line epigenetic modification of the murine A_{vy} allele by nutritional supplementation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 14 de novembro de 2006;103(46):17308–12.
 24. Guo Q, Wang Y, Xu D, Nossent J, Pavlos NJ, Xu J. Rheumatoid arthritis: pathological mechanisms and modern pharmacologic therapies. *Bone Research* 2018 6:1. 27 de abril de 2018;6(1):1–14.
 25. Marder W, Vinet É, Somers EC. Rheumatic autoimmune diseases in women and midlife health. *Womens Midlife Health*. dezembro de 2015;1(1).
 26. Zufferey F, Williams FMK, Spector TD. Epigenetics and methylation in the rheumatic diseases. Vol. 43, *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. W.B. Saunders; 2014. p. 692–700.
 27. Radu AF, Bungau SG. Management of Rheumatoid Arthritis: An Overview. *Cells*. 1º de novembro de 2021;10(11).

28. Li X, Gu L, Yang L, Zhang D, Shen J. Aconitine: A potential novel treatment for systemic lupus erythematosus. *J Pharmacol Sci.* 1º de março de 2017;133(3):115–21.
29. Losada-García A, Cortés-Ramírez SA, Cruz-Burgos M, Morales-Pacheco M, Cruz-Hernández CD, Gonzalez-Covarrubias V, et al. Hormone-Related Cancer and Autoimmune Diseases: A Complex Interplay to be Discovered. *Front Genet.* 17 de janeiro de 2021;12.
30. Sternhagen E, Bettendorf B, Lenert A, Lenert PS. The Role of Clinical Features and Serum Biomarkers in Identifying Patients with Incomplete Lupus Erythematosus at Higher Risk of Transitioning to Systemic Lupus Erythematosus: Current Perspectives. *J Inflamm Res.* 2022;15:1133–45.
31. Barber MRW, Drenkard C, Falasinnu T, Hoi A, Mak A, Kow NY, et al. Global epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol* [Internet]. 2021;17(9):515–32. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41584-021-00668-1>
32. Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation.* 2019;139(10):e56–528.
33. McMurray RW, May W. Sex hormones and systemic lupus erythematosus: review and meta-analysis. *Arthritis Rheum.* 1º de agosto de 2003;48(8):2100–10.
34. Fatoye F, Gebrye T, Mbada C. Global and regional prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in low-and-middle income countries: a systematic review and meta-analysis. *Rheumatol Int.* 1º de dezembro de 2022;42(12):2097–107.
35. Aringer M, Costenbader K, Daikh D, Brinks R, Mosca M, Ramsey-Goldman R, et al. 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 1º de setembro de 2019 [citado 22 de maio de 2023];78(9):1151–9. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31383717>
36. Silva HA de M e, Oliveira AD de, Oliveira CF de, Miranda GM, Oliveira MM de, Novacki RAL, et al. Lúpus Eritematoso Sistêmico: uma revisão atualizada da fisiopatologia ao tratamento / Systemic Lupus Erythematosus: An Up-to-Date

- Review of Pathophysiology of Treatment. *Brazilian Journal of Health Review*. 2021;4(6):24074–84.
37. Vista do Manifestações cutâneas no lúpus eritematoso [Internet]. [citado 6 de abril de 2024]. Disponível em: <https://periodicosapm.emnuvens.com.br/rdt/article/view/187/180>
 38. Moulton VR, Suarez-Fueyo A, Meidan E, Li H, Mizui M, Tsokos GC. Pathogenesis of Human Systemic Lupus Erythematosus: A Cellular Perspective. *Trends Mol Med*. 1º de julho de 2017;23(7):615–35.
 39. Accapezzato D, Caccavale R, Paroli MP, Gioia C, Nguyen BL, Spadea L, et al. Advances in the Pathogenesis and Treatment of Systemic Lupus Erythematosus. *Int J Mol Sci* [Internet]. 1º de abril de 2023 [citado 6 de abril de 2024];24(7). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37047548/>
 40. 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. *Nutrients*. 4 de fevereiro de 2021;13(2):504.
 41. Tsokos GC, Lo MS, Reis PC, Sullivan KE. New insights into the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol*. 1º de dezembro de 2016;12(12):716–30.
 42. Sekigawa I, Kawasaki M, Ogasawara H, Kaneda K, Kaneko H, Takasaki Y, et al. DNA methylation: its contribution to systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Med*. outubro de 2006;6(3):99–106.
 43. Van Vollenhoven RF, Mosca M, Bertsias G, Isenberg D, Kuhn A, Lerstrøm K, et al. Treat-to-target in systemic lupus erythematosus: recommendations from an international task force. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(6):958–67.
 44. Xibillé-Friedmann D, Pérez-Rodríguez M, Carrillo-Vázquez S, Álvarez-Hernández E, Aceves FJ, Ocampo-Torres MC, et al. Clinical practice guidelines for the treatment of systemic lupus erythematosus by the Mexican College of Rheumatology. *Reumatol Clin*. 1º de janeiro de 2019;15(1):3–20.
 45. POPA R, LAUTARU LA, LUCRETIU R, RUIU DC, CARAGEA D, OLTEANU M, et al. Therapy Side Effects in Systemic Lupus Erythematosus. *Curr Health Sci J*. 2018;44(3):316.

46. Longo M, Zatterale F, Naderi J, Parrillo L, Formisano P, Raciti GA, et al. Adipose tissue dysfunction as determinant of obesity-associated metabolic complications. *Int J Mol Sci*. 2019;20(9).
47. Hausman DB, DiGirolamo M, Bartness TJ, Hausman GJ, Martin RJ. The biology of white adipocyte proliferation. *Obes Rev* [Internet]. 2001 [citado 4 de abril de 2024];2(4):239–54. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12119995/>
48. Vista do TECIDO ADIPOSEO, UMA NOVA VISÃO: AS ADIPOCINAS E SEU PAPEL ENDÓCRINO. [Internet]. [citado 4 de abril de 2024]. Disponível em: <https://revista.fmc.br/ojs/index.php/RCFMC/article/view/6/5>
49. Luo L, Liu M. Adipose tissue in control of metabolism. *J Endocrinol* [Internet]. 2016 [citado 4 de abril de 2024];231(3):R77–99. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27935822/>
50. Sakers A, De Siqueira MK, Seale P, Villanueva CJ. Adipose-tissue plasticity in health and disease. *Cell* [Internet]. 3 de fevereiro de 2022 [citado 4 de abril de 2024];185(3):419–46. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35120662/>
51. Wang Q, Wang Y, Xu D. The roles of T cells in obese adipose tissue inflammation. *Adipocyte* [Internet]. 2021 [citado 4 de abril de 2024];10(1):435–45. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34515616/>
52. Ahmed B, Sultana R, Greene MW. Adipose tissue and insulin resistance in obese. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 1º de maio de 2021 [citado 4 de abril de 2024];137. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33561645/>
53. Cildir G, Akincilar SC, Tergaonkar V. Chronic adipose tissue inflammation: all immune cells on the stage. *Trends Mol Med* [Internet]. agosto de 2013 [citado 4 de abril de 2024];19(8):487–500. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23746697/>
54. Chavakis T, Alexaki VI, Ferrante AW. Macrophage function in adipose tissue homeostasis and metabolic inflammation. *Nat Immunol* [Internet]. 1º de maio de 2023 [citado 4 de abril de 2024];24(5):757–66. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37012544/>
55. Bulló M, Casas-Agustench P, Amigó-Correig P, Aranceta J, Salas-Salvadó J. Inflammation, obesity and comorbidities: the role of diet. *Public Health Nutr* [Internet]. outubro de 2007 [citado 4 de abril de 2024];10(10A):1164–72.

- Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/public-health-nutrition/article/inflammation-obesity-and-comorbidities-the-role-of-diet/B0EC848A7E7D1007CFED5EEB223B80C5>
56. Trayhurn P. Adipocyte biology. *Obesity Reviews* [Internet]. março de 2007 [citado 4 de abril de 2024];8(SUPPL. 1):41–4. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1467-789X.2007.00316.x>
 57. Goralski KB, McCarthy TC, Hanniman EA, Zabel BA, Butcher EC, Parlee SD, et al. Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism. *J Biol Chem* [Internet]. 21 de setembro de 2007 [citado 4 de abril de 2024];282(38):28175–88. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17635925/>
 58. Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [Internet]. 2005 [citado 4 de abril de 2024];115(5):911–9. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15867843/>
 59. Dornbush S, Aeddula NR. Physiology, Leptin. *StatPearls* [Internet]. 7 de fevereiro de 2019 [citado 6 de abril de 2024]; Disponível em: <http://europepmc.org/books/NBK537038>
 60. Fong TM, Huang RRC, Tota MR, Mao C, Smith T, Varnerin J, et al. Localization of Leptin Binding Domain in the Leptin Receptor. *Mol Pharmacol* [Internet]. 1º de fevereiro de 1998 [citado 6 de abril de 2024];53(2):234–40. Disponível em: <https://molpharm.aspetjournals.org/content/53/2/234>
 61. Hegyi K, Fülöp K, Kovács K, Tóth S, Falus A. Leptin-induced signal transduction pathways. *Cell Biol Int* [Internet]. 1º de março de 2004 [citado 6 de abril de 2024];28(3):159–69. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1016/j.cellbi.2003.12.003>
 62. Obradovic M, Sudar-Milovanovic E, Soskic S, Essack M, Arya S, Stewart AJ, et al. Leptin and Obesity: Role and Clinical Implication. *Front Endocrinol (Lausanne)* [Internet]. 18 de maio de 2021 [citado 6 de abril de 2024];12:585887. Disponível em: www.frontiersin.org
 63. Zhao S, Kusminski CM, Scherer PE. Adiponectin, Leptin and Cardiovascular Disorders. *Circ Res* [Internet]. 1º de janeiro de 2021 [citado 6 de abril de 2024];128(1):136. Disponível em: [/pmc/articles/PMC7799441/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7799441/)

64. Achari AE, Jain SK. Adiponectin, a Therapeutic Target for Obesity, Diabetes, and Endothelial Dysfunction. *Int J Mol Sci* [Internet]. 21 de junho de 2017 [citado 6 de abril de 2024];18(6). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28635626/>
65. Choi HM, Doss HM, Kim KS. Multifaceted Physiological Roles of Adiponectin in Inflammation and Diseases. *Int J Mol Sci* [Internet]. 1º de fevereiro de 2020 [citado 6 de abril de 2024];21(4). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32059381/>
66. Grossmann ME, Ray A, Nkhata KJ, Malakhov DA, Rogozina OP, Dogan S, et al. Obesity and breast cancer: status of leptin and adiponectin in pathological processes. *Cancer and Metastasis Reviews* 2010 29:4 [Internet]. 7 de setembro de 2010 [citado 6 de abril de 2024];29(4):641–53. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10555-010-9252-1>
67. Koerner A, Kratzsch J, Kiess W. Adipocytokines: leptin—the classical, resistin—the controversial, adiponectin—the promising, and more to come. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 1º de dezembro de 2005;19(4):525–46.
68. Fasshauer M, Paschke R. Regulation of adipocytokines and insulin resistance. *Diabetologia* [Internet]. 6 de dezembro de 2003 [citado 6 de abril de 2024];46(12):1594–603. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00125-003-1228-z>
69. Fasshauer M, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R, Klein J. Hormonal Regulation of Adiponectin Gene Expression in 3T3-L1 Adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 25 de janeiro de 2002;290(3):1084–9.
70. Negrão MR, Monteiro R, Calhau C, Soares R, Azevedo I. Comment on: Hosogai et al. (2007) Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes* 56:901-911, 2007. *Diabetes* [Internet]. novembro de 2008 [citado 6 de abril de 2024];57(11). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18971432/>
71. Park SW, Zhou Y, Lee J, Lee J, Ozcan U. Sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 2b is a major regulator of endoplasmic reticulum stress and glucose homeostasis in obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [Internet]. 9 de novembro de 2010 [citado 6 de abril de 2024];107(45):19320–5. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.1012044107>

72. Tzanavari T, Giannogonas P, Karalis KP. TNF- α and obesity. *Curr Dir Autoimmun* [Internet]. 2010 [citado 6 de abril de 2024];11:145–56. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/41510134_TNF-alpha_and_obesity
73. Edição N, Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular*.
74. Sethi JK, Hotamisligil GS. Metabolic Messengers: tumour necrosis factor. *Nat Metab* [Internet]. 1º de outubro de 2021 [citado 6 de abril de 2024];3(10):1302–12. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34650277/>
75. Ilmiawati C, Fitri F, Rofinda Z, notes MRB research, 2020 undefined. Green coffee extract modifies body weight, serum lipids and TNF- α in high-fat diet-induced obese rats. *Springer* [Internet]. 10 de abril de 2020 [citado 6 de abril de 2024];13(1). Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/s13104-020-05052-y>
76. Rość D, Adamczyk P, Boinska J, Szafkowski R, Ponikowska I, Stankowska K, et al. CRP, but not TNF- α or IL-6, decreases after weight loss in patients with morbid obesity exposed to intensive weight reduction and balneological treatment. *J Zhejiang Univ Sci B* [Internet]. 1º de maio de 2015 [citado 6 de abril de 2024];16(5):404. Disponível em: [/pmc/articles/PMC4432993/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/264432993/)
77. Cohen E, Margalit I, Shochat T, Goldberg E, Krause I. Markers of Chronic Inflammation in Overweight and Obese Individuals and the Role of Gender: A Cross-Sectional Study of a Large Cohort. *J Inflamm Res* [Internet]. 2021 [citado 6 de abril de 2024];14:567–73. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33658829/>
78. Alzamil H, Meo SA. Medical students' readiness and perceptions about interprofessional education: A cross sectional study. *Pak J Med Sci*. 1º de maio de 2020;36(4):693–8.
79. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 1º de outubro de 2014 [citado 6 de abril de 2024];6(10). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25190079/>
80. Zegeye MM, Andersson JSO, Wennberg P, Repsilber D, Sirsjö A, Ljungberg LU. IL-6 as a Mediator of the Association Between Traditional Risk Factors and Future Myocardial Infarction: A Nested Case-Control Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1º de abril de 2021;41(4):1570–9.

81. Pal M, Febbraio MA, Whitham M. From cytokine to myokine: the emerging role of interleukin-6 in metabolic regulation. *Immunol Cell Biol* [Internet]. 2014 [citado 6 de abril de 2024];92(4):331–9. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24751614/>
82. Nikiphorou E, Fragoulis GE. Inflammation, obesity and rheumatic disease: common mechanistic links. A narrative review. *Ther Adv Musculoskelet Dis* [Internet]. 1º de agosto de 2018 [citado 23 de maio de 2023];10(8):157. Disponível em: [/pmc/articles/PMC6116766/](https://pmc/articles/PMC6116766/)
83. Vaillant A, Vashisht R, [Internet] PZS, 2023 undefined. Immediate hypersensitivity reactions. *ncbi.nlm.nih.gov* [Internet]. [citado 6 de abril de 2024]; Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513315/>
84. Lu B, Hiraki LT, Sparks JA, Malspeis S, Chen CY, Awosogba JA, et al. Being overweight or obese and risk of developing rheumatoid arthritis among women: a prospective cohort study. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 1º de novembro de 2014 [citado 6 de abril de 2024];73(11):1914–22. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25057178/>
85. Harpsøe MC, Basit S, Andersson M, Nielsen NM, Frisch M, Wohlfahrt J, et al. Body mass index and risk of autoimmune diseases: a study within the Danish National Birth Cohort. *Int J Epidemiol* [Internet]. 2014 [citado 23 de maio de 2023];43(3):843–55. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24609069/>
86. Cozier YC, Barbhaiya M, Castro-Webb N, Conte C, Tedeschi S, Leatherwood C, et al. A prospective study of obesity and risk of systemic lupus erythematosus (SLE) among Black women. *Semin Arthritis Rheum* [Internet]. 1º de junho de 2019 [citado 6 de abril de 2024];48(6):1030–4. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30424973/>
87. George MD, Baker JF. The Obesity Epidemic and Consequences for Rheumatoid Arthritis Care. *Curr Rheumatol Rep* [Internet]. 1º de janeiro de 2016 [citado 6 de abril de 2024];18(1):1–9. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11926-015-0550-z>
88. Jung UJ, Choi MS. Obesity and Its Metabolic Complications: The Role of Adipokines and the Relationship between Obesity, Inflammation, Insulin Resistance, Dyslipidemia and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci*

- [Internet]. 11 de abril de 2014 [citado 22 de maio de 2023];15(4):6184. Disponível em: [/pmc/articles/PMC4013623/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24811111/)
89. Meza-Meza MR, Vizmanos-Lamotte B, Muñoz-Valle JF, Parra-Rojas I, Garaulet M, Campos-López B, et al. Relationship of Excess Weight with Clinical Activity and Dietary Intake Deficiencies in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Nutrients* [Internet]. 1º de novembro de 2019 [citado 6 de abril de 2024];11(11). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31698711/>
 90. Nikolajczyk BS, Jagannathan-Bogdan M, Shin H, Gyurko R. State of the union between metabolism and the immune system in type 2 diabetes. *Genes Immun* [Internet]. junho de 2011 [citado 6 de abril de 2024];12(4):239–50. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21390053/>
 91. Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, Hauner H. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2007;92(3):1023–33.
 92. Hanna Kazazian N, Wang Y, Roussel-Queval A, Marcadet L, Chasson L, Laprie C, et al. Lupus Autoimmunity and Metabolic Parameters Are Exacerbated Upon High Fat Diet-Induced Obesity Due to TLR7 Signaling. *Front Immunol* [Internet]. 4 de setembro de 2019 [citado 9 de abril de 2024];10:2015–2015. Disponível em: <https://europepmc.org/articles/PMC6738575>
 93. Sinicato NA, Postal M, Peres FA, Peliçari KDO, Marini R, Dos Santos ADO, et al. Obesity and Cytokines in Childhood-Onset Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol Res*. 2014;2014:979–84.
 94. Nikiphorou E, Fragoulis GE. Inflammation, obesity and rheumatic disease: common mechanistic links. A narrative review. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 1º de agosto de 2018;10(8):157.
 95. Genchi VA, Rossi E, Lauriola C, D’Oria R, Palma G, Borrelli A, et al. Adipose Tissue Dysfunction and Obesity-Related Male Hypogonadism. *Int J Mol Sci*. 1º de agosto de 2022;23(15).
 96. Zoghbi HY, Beaudet AL. Epigenetics and Human Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 1º de fevereiro de 2016;8(2):1–28.
 97. Feng L, Lou J. DNA Methylation Analysis. *Methods Mol Biol*. 2019;1894:181–227.

98. Li Y. Modern epigenetics methods in biological research. *Methods*. 1º de março de 2021;187:104–13.
99. Metere A, Graves CE. Factors Influencing Epigenetic Mechanisms: Is There A Role for Bariatric Surgery? *High Throughput*. 1º de março de 2020;9(1).
100. Halabian R, Valizadeh Arshad, Ahmadi A, Saeedi P, Azimzadeh Jamalkandi S, Alivand MR. Laboratory methods to decipher epigenetic signatures: a comparative review. *Cell Mol Biol Lett*. 1º de dezembro de 2021;26(1):1–30.
101. Wolff GL, Kodell RL, Moore SR, Cooney CA. Maternal epigenetics and methyl supplements affect agouti gene expression in Avy/a mice. *The FASEB Journal*. 1º de agosto de 1998;12(11):949–57.
102. Richardson B. Epigenetically Altered T Cells Contribute to Lupus Flares. *Cells*. 1º de fevereiro de 2019;8(2).
103. Kong Y, Rastogi D, Seoighe C, Greally JM, Suzuki M. Insights from deconvolution of cell subtype proportions enhance the interpretation of functional genomic data. *PLoS One*. 1º de abril de 2019;14(4):e0215987.
104. Jin B, Li Y, Robertson KD. DNA methylation: superior or subordinate in the epigenetic hierarchy? *Genes Cancer*. junho de 2011;2(6):607–17.
105. Hiramatsu S, Watanabe KS, Zeggar S, Asano Y, Miyawaki Y, Yamamura Y, et al. Regulation of Cathepsin E gene expression by the transcription factor Kaiso in MRL/lpr mice derived CD4⁺ T cells. *Sci Rep*. 1º de dezembro de 2019;9(1).
106. Ballestar E, Esteller M, Richardson BC. The epigenetic face of systemic lupus erythematosus. *J Immunol*. 15 de junho de 2006;176(12):7143–7.
107. Froese DS, Fowler B, Baumgartner MR. Vitamin B12 , folate, and the methionine remethylation cycle-biochemistry, pathways, and regulation. *J Inherit Metab Dis* [Internet]. 1º de julho de 2019 [citado 6 de abril de 2024];42(4):673–85. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30693532/>
108. Richardson B. Epigenetically Altered T Cells Contribute to Lupus Flares. *Cells* [Internet]. 1º de fevereiro de 2019 [citado 23 de maio de 2023];8(2). Disponível em: [/pmc/articles/PMC6406295/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31137916/)
109. la Cava A. The Influence of Diet and Obesity on Gene Expression in SLE. *Genes (Basel)* [Internet]. 1º de maio de 2019 [citado 23 de maio de 2023];10(5). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31137916/>

110. Zhan Y, Guo Y, Lu Q. Aberrant Epigenetic Regulation in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus and Its Implication in Precision Medicine. *Cytogenet Genome Res.* 2016;149(3):141–55.
111. Hedrich CM. Epigenetics in SLE. Vol. 19, *Current Rheumatology Reports*. Current Medicine Group LLC 1; 2017.
112. Meroni PL, Penatti AE. Epigenetics and Systemic Lupus Erythematosus: Unmet Needs. Vol. 50, *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*. Humana Press Inc.; 2016. p. 367–76.
113. Pyfrom S, Paneru B, Knox JJ, Cancro MP, Posso S, Buckner JH, et al. The dynamic epigenetic regulation of the inactive X chromosome in healthy human B cells is dysregulated in lupus patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 15 de junho de 2021 [citado 23 de maio de 2023];118(24). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34103397/>
114. Hedrich CM, Smith EMD, Beresford MW. Juvenile-onset systemic lupus erythematosus (jSLE) - Pathophysiological concepts and treatment options. *Best Pract Res Clin Rheumatol* [Internet]. 1º de agosto de 2017 [citado 6 de abril de 2024];31(4):488–504. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29773269/>
115. Tao B, Xiang W, Li X, He C, Chen L, Xia X, et al. Regulation of Toll-like receptor-mediated inflammatory response by microRNA-152-3p-mediated demethylation of MyD88 in systemic lupus erythematosus. *Inflamm Res.* 1º de março de 2021;70(3):285–96.
116. Pyfrom S, Paneru B, Knox JJ, Cancro MP, Posso S, Buckner JH, et al. The dynamic epigenetic regulation of the inactive X chromosome in healthy human B cells is dysregulated in lupus patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15 de junho de 2021;118(24).
117. Surace AEA, Hedrich CM. The role of epigenetics in autoimmune/inflammatory disease. Vol. 10, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2019.
118. Hedrich CM, Mäbert K, Rauen T, Tsokos GC. DNA methylation in systemic lupus erythematosus. *Epigenomics*. 2017;9(4):505–25.
119. Chen SY, Liu MF, Kuo PY, Wang CR. Upregulated expression of STAT3/IL-17 in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol*. 1º de maio de 2019;38(5):1361–6.

120. Goropevšek A, Holcar M, Avčin T. The Role of STAT Signaling Pathways in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. *Clin Rev Allergy Immunol* [Internet]. 1º de abril de 2017 [citado 6 de abril de 2024];52(2):164–81. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27216430/>
121. Wołowiec A, Wołowiec Ł, Grzešk G, Jaśniak A, Osiak J, Husejko J, et al. The Role of Selected Epigenetic Pathways in Cardiovascular Diseases as a Potential Therapeutic Target. *Int J Mol Sci* [Internet]. 1º de setembro de 2023 [citado 6 de abril de 2024];24(18). Disponível em: [/pmc/articles/PMC10531432/](https://pmc/articles/PMC10531432/)
122. Kong Z, Qin P, Xiao S, Zhou H, Li H, Yang R, et al. A novel recombinant human thrombopoietin therapy for the management of immune thrombocytopenia in pregnancy. *Blood* [Internet]. 31 de agosto de 2017 [citado 6 de abril de 2024];130(9):1097–103. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28630121/>
123. You D, Nilsson E, Tenen DE, Lyubetskaya A, Lo JC, Jiang R, et al. Dnmt3a is an epigenetic mediator of adipose insulin resistance. *Elife* [Internet]. 1º de novembro de 2017 [citado 6 de abril de 2024];6. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29091029/>
124. Choe SS, Huh JY, Hwang IJ, Kim JI, Kim JB. Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Front Endocrinol (Lausanne)* [Internet]. 13 de abril de 2016 [citado 22 de maio de 2023];7(APR). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27148161/>
125. 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* [Internet]. 23 de junho de 2020 [citado 6 de abril de 2024]; Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/32573524>
126. Pesqueda-Cendejas K, Campos-López B, Mora-García PE, Moreno-Ortiz JM, De la Cruz-Mosso U. Methyl Donor Micronutrients: A Potential Dietary Epigenetic Target in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Int J Mol Sci*. 1º de fevereiro de 2023;24(4).
127. Jacob RA, Gretz DM, Taylor PC, James SJ, Pogribny IP, Miller BJ, et al. Moderate folate depletion increases plasma homocysteine and decreases lymphocyte DNA methylation in postmenopausal women. *J Nutr*. julho de 1998;128(7):1204–12.

128. Lyon P, Strippoli V, Fang B, Cimmino L. B Vitamins and One-Carbon Metabolism: Implications in Human Health and Disease. *Nutrients* [Internet]. 1º de setembro de 2020 [citado 9 de abril de 2024];12(9):1–24. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32961717/>
129. Rainka M, Aladeen T, Westphal E, Meaney J, Gengo F, Greger J, et al. L-Methylfolate Calcium Supplementation in Adolescents and Children: A Retrospective Analysis. *J Psychiatr Pract* [Internet]. 1º de julho de 2019 [citado 9 de abril de 2024];25(4):258–67. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/334414801_L-Methylfolate_Calcium_Supplementation_in_Adolescents_and_Children_A_Retr ospective_Analysis
130. Łoboś P, Regulska-Iłow B. LINK BETWEEN METHYL NUTRIENTS AND THE DNA METHYLATION PROCESS IN THE COURSE OF SELECTED DISEASES IN ADULTS. *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny / Annals of the National Institute of Hygiene*. 2021;72(2):123–36.
131. Wolffenbuttel BHR, Wouters HJCM, Heiner-Fokkema MR, van der Klauw MM. The Many Faces of Cobalamin (Vitamin B12) Deficiency. *Mayo Clin Proc Innov Qual Outcomes* [Internet]. junho de 2019 [citado 6 de abril de 2024];3(2):200–14. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31193945/>
132. la Cava A. The Influence of Diet and Obesity on Gene Expression in SLE. *Genes* (Basel). 1º de maio de 2019;10(5).
133. 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. *Lifestyle Genom*. 7 de novembro de 2023;16(1):192–213.
134. Vordenbäumen S, Sokolowski A, Rosenbaum A, Gebhard C, Raithel J, Düsing C, et al. Methyl donor micronutrients, CD40-ligand methylation and disease activity in systemic lupus erythematosus: A cross-sectional association study. *Lupus* [Internet]. 1º de outubro de 2021 [citado 6 de abril de 2024];30(11):1773. Disponível em: [/pmc/articles/PMC8564257/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/348564257/)
135. Pesqueda-Cendejas K, Campos-López B, Mora-García PE, Moreno-Ortiz JM, De la Cruz-Mosso U. Methyl Donor Micronutrients: A Potential Dietary Epigenetic

- Target in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Int J Mol Sci* [Internet]. 1º de fevereiro de 2023 [citado 23 de maio de 2023];24(4). Disponível em: </pmc/articles/PMC9961281/>
136. Ribeiro AA, Carvalho LM, da Mota JCNL, Nonino CB, Gualano B, Nunes JAV, et al. Diet, DNA methylation and systemic lupus erythematosus: evidence and perspectives focused on personalized nutrition. *Lifestyle Genom.* 19 de fevereiro de 2024;
 137. Morel L, Perry D, Sang A, Yin Y, Zheng YY. Murine models of systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011.
 138. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* [Internet]. 2001 [citado 9 de abril de 2024];25(4):402–8. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11846609/>
 139. Sharma RP, He Q, Riley RT. Lupus-prone NZBWF1/J mice, defective in cytokine signaling, are resistant to fumonisin hepatotoxicity despite accumulation of liver sphinganine. *Toxicology* [Internet]. 1º de dezembro de 2005 [citado 6 de abril de 2024];216(1):59–71. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16159691/>
 140. White PAS, Cercato LM, Araújo JMD, Souza LA, Soares AF, Barbosa APO, et al. Modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica e associada à resistência à ação da insulina e intolerância à glicose. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* [Internet]. julho de 2013 [citado 6 de abril de 2024];57(5):339–45. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abem/a/SbQ8SyBJK3fz5nNmyRN8fWw/>
 141. Habiby M, Ezati P, Soltanian D, Rahehagh R, Hosseini F. Comparison of three methods of intermittent fasting in high-fat-diet-induced obese mice ☆. *Heliyon* [Internet]. 2024 [citado 6 de abril de 2024];10:e25708. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e25708>
 142. Yang Y, Smith DL, Keating KD, Allison DB, Nagy TR. Variations in body weight, food intake and body composition after long-term high-fat diet feeding in C57BL/6J mice. *Obesity* [Internet]. 1º de outubro de 2014 [citado 6 de abril de 2024];22(10):2147–55. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/oby.20811>
 143. Kim AY, Park YJ, Pan X, Shin KC, Kwak SH, Bassas AF, et al. Obesity-induced DNA hypermethylation of the adiponectin gene mediates insulin resistance. *Nature*

- Communications 2015 6:1 [Internet]. 3 de julho de 2015 [citado 6 de abril de 2024];6(1):1–11. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ncomms8585>
144. Lin S, Thomas TC, Storlien LH, Huang XF. Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl/6J mice. *Int J Obes Relat Metab Disord* [Internet]. 2000 [citado 6 de abril de 2024];24(5):639–46. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10849588/>
 145. Joe AWB, Lin Y, Even Y, Vogl AW, Rossi FMV. Depot-Specific Differences in Adipogenic Progenitor Abundance and Proliferative Response to High-Fat Diet. *Stem Cells* [Internet]. 1º de outubro de 2009 [citado 6 de abril de 2024];27(10):2563–70. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1002/stem.190>
 146. Wang Z, Zhu M, Wang M, Gao Y, Zhang C, Liu S, et al. Integrated Multiomic Analysis Reveals the High-Fat Diet Induced Activation of the MAPK Signaling and Inflammation Associated Metabolic Cascades via Histone Modification in Adipose Tissues. *Front Genet* [Internet]. 28 de junho de 2021 [citado 6 de abril de 2024];12. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34262592/>
 147. Moens U, Kostenko S, Sveinbjörnsson B. The Role of Mitogen-Activated Protein Kinase-Activated Protein Kinases (MAPKAPKs) in Inflammation. *Genes (Basel)* [Internet]. junho de 2013 [citado 6 de abril de 2024];4(2):101–33. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24705157/>
 148. Gang C, Jiahui Y, Huaizhou W, Qing C, Dongbao Z, Qian S. Defects of mitogen-activated protein kinase in ICOS signaling pathway lead to CD4(+) and CD8(+) T-cell dysfunction in patients with active SLE. *Cell Immunol* [Internet]. 2009 [citado 6 de abril de 2024];258(1):83–9. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19376499/>
 149. Arthur JSC, Ley SC. Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nat Rev Immunol* [Internet]. agosto de 2013 [citado 6 de abril de 2024];13(9):679–92. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23954936/>
 150. Liu Y, Deng W, Meng Q, Qiu X, Sun D, Dai C. CD8+iTregs attenuate glomerular endothelial cell injury in lupus-prone mice through blocking the activation of p38 MAPK and NF-κB. *Mol Immunol* [Internet]. 1º de novembro de 2018 [citado 6 de abril de 2024];103:133–43. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30268079/>

151. Madsen L, Kristiansen K. The importance of dietary modulation of cAMP and insulin signaling in adipose tissue and the development of obesity. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2010 [citado 6 de abril de 2024];1190:1–14. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20388132/>
152. Petersen RK, Madsen L, Pedersen LM, Hallenborg P, Hagland H, Viste K, et al. Cyclic AMP (cAMP)-mediated stimulation of adipocyte differentiation requires the synergistic action of Epac- and cAMP-dependent protein kinase-dependent processes. *Mol Cell Biol* [Internet]. 1º de junho de 2008 [citado 6 de abril de 2024];28(11):3804–16. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18391018/>
153. Insel PA, Zhang L, Murray F, Yokouchi H, Zambon AC. Cyclic AMP is both a pro-apoptotic and anti-apoptotic second messenger. *Acta Physiol (Oxf)* [Internet]. fevereiro de 2012 [citado 6 de abril de 2024];204(2):277. Disponível em: </pmc/articles/PMC3125423/>
154. Amarilyo G, Iikuni N, Liu A, Matarese G, La Cava A. Leptin Enhances Availability of Apoptotic Cell-Derived Self-Antigen in Systemic Lupus Erythematosus. *PLoS One* [Internet]. 17 de novembro de 2014 [citado 6 de abril de 2024];9(11):e112826. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0112826>
155. Wondmkun YT. Obesity, Insulin Resistance, and Type 2 Diabetes: Associations and Therapeutic Implications. *Diabetes Metab Syndr Obes* [Internet]. 2020 [citado 6 de abril de 2024];13:3611. Disponível em: </pmc/articles/PMC7553667/>
156. Petersen MC, Shulman GI. Mechanisms of insulin action and insulin resistance. *Physiol Rev* [Internet]. 1º de outubro de 2018 [citado 6 de abril de 2024];98(4):2133–223. Disponível em: <https://journals.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00063.2017>
157. Semenkovich CF. Regulation of fatty acid synthase (FAS). *Prog Lipid Res*. 1º de março de 1997;36(1):43–53.
158. Prieto Martín A, Barbarroja Escudero J, García Torrijos C, Monserrat Sanz J. Linfocitos B. *Medicine (Spain)* [Internet]. março de 2013 [citado 6 de abril de 2024];11(28):1710–9. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/257150724_Linfocitos_B

159. Sun P, Meng L hua. Emerging roles of class I PI3K inhibitors in modulating tumor microenvironment and immunity. *Acta Pharmacologica Sinica* 2020 41:11 [Internet]. 16 de setembro de 2020 [citado 6 de abril de 2024];41(11):1395–402. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41401-020-00500-8>
160. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, et al. CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nature Medicine* 2009 15:8 [Internet]. 26 de julho de 2009 [citado 6 de abril de 2024];15(8):914–20. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nm.1964>
161. Kintscher U, Hartge M, Hess K, Foryst-Ludwig A, Clemenz M, Wabitsch M, et al. T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 1º de julho de 2008 [citado 6 de abril de 2024];28(7):1304–10. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18420999/>
162. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, et al. CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nature Medicine* 2009 15:8 [Internet]. 26 de julho de 2009 [citado 6 de abril de 2024];15(8):914–20. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nm.1964>
163. Boulouvar S, Michelet X, Duquette D, Alvarez D, Hogan AE, Dold C, et al. Adipose Type One Innate Lymphoid Cells Regulate Macrophage Homeostasis through Targeted Cytotoxicity. *Immunity* [Internet]. 21 de fevereiro de 2017 [citado 6 de abril de 2024];46(2):273–86. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28228283/>
164. Sindhu S, Thomas R, Kochumon S, Wilson A, Abu-Farha M, Bennakhi A, et al. Increased Adipose Tissue Expression of Interferon Regulatory Factor (IRF)-5 in Obesity: Association with Metabolic Inflammation. *Cells* 2019, Vol 8, Page 1418 [Internet]. 11 de novembro de 2019 [citado 6 de abril de 2024];8(11):1418. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/8/11/1418/htm>
165. Brunelli DT, Boldrini VO, Bonfante ILP, Duft RG, Mateus K, Costa L, et al. Obesity Increases Gene Expression of Markers Associated With Immunosenescence in Obese Middle-Aged Individuals. *Front Immunol* [Internet].

- 5 de janeiro de 2022 [citado 6 de abril de 2024];12:806400. Disponível em: www.frontiersin.org
166. Martínez-Sánchez N. There and Back Again: Leptin Actions in White Adipose Tissue. *Int J Mol Sci* [Internet]. 1º de setembro de 2020 [citado 6 de abril de 2024];21(17):1–26. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32839413/>
 167. Lönnqvist F, Arner P, Nordfors L, Schalling M. Overexpression of the obese (ob) gene in adipose tissue of human obese subjects. *Nat Med* [Internet]. 1995 [citado 6 de abril de 2024];1(9):950–3. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7585223/>
 168. Vaisse C, Halaas JL, Horvath CM, Darnell J, Stoffel M, Friedman JM. Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. *Nature Genetics* 1996 14:1 [Internet]. 1996 [citado 6 de abril de 2024];14(1):95–7. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ng0996-95>
 169. Banks AS, Davis SM, Bates SH, Myers MG. Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. *J Biol Chem* [Internet]. 12 de maio de 2000 [citado 6 de abril de 2024];275(19):14563–72. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10799542/>
 170. Crouse MS, Caton JS, Claycombe-Larson KJ, Diniz WJS, Lindholm-Perry AK, Reynolds LP, et al. Epigenetic Modifier Supplementation Improves Mitochondrial Respiration and Growth Rates and Alters DNA Methylation of Bovine Embryonic Fibroblast Cells Cultured in Divergent Energy Supply. *Front Genet* [Internet]. 24 de fevereiro de 2022 [citado 6 de abril de 2024];13:812764. Disponível em: www.frontiersin.org
 171. Hou H, Zhao H. Epigenetic factors in atherosclerosis: DNA methylation, folic acid metabolism, and intestinal microbiota. *Clin Chim Acta* [Internet]. 1º de janeiro de 2021 [citado 6 de abril de 2024];512:7–11. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33232735/>
 172. Angeletti A, Zappulo F, Donadei C, Cappuccilli M, Di Certo G, Conte D, et al. Immunological Effects of a Single Hemodialysis Treatment. *Medicina (Kaunas)* [Internet]. 1º de fevereiro de 2020 [citado 6 de abril de 2024];56(2). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32059426/>
 173. Bokor S, Vass RA, Funke S, Ertl T, Molnár D. Epigenetic Effect of Maternal Methyl-Group Donor Intake on Offspring's Health and Disease. *Life (Basel)*

- [Internet]. 1º de maio de 2022 [citado 6 de abril de 2024];12(5). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35629277/>
174. Lin JP, Mironova YA, Shrager P, Giger RJ. LRP1 regulates peroxisome biogenesis and cholesterol homeostasis in oligodendrocytes and is required for proper CNS myelin development and repair. *Elife* [Internet]. 18 de dezembro de 2017 [citado 6 de abril de 2024];6. Disponível em: [/pmc/articles/PMC5752207/](https://pmc/articles/PMC5752207/)
 175. de Paula BMF, de Souza Pinhel MA, Nicoletti CF, Nonino CB, Siqueira F, Vannucchi H. Folic acid supplementation modulates offspring genes involved in energy metabolism: In vivo study. *Clinical Nutrition Open Science*. 1º de agosto de 2022;44:15–27.
 176. Signore A, Chianelli M, Bei R, Oyen W, Modesti A. Targeting cytokine/chemokine receptors: A challenge for molecular nuclear medicine. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* [Internet]. 1º de janeiro de 2003 [citado 6 de abril de 2024];30(1):149–56. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00259-002-0941-z>
 177. Han L, Zhang L. CCL21/CCR7 axis as a therapeutic target for autoimmune diseases. *Int Immunopharmacol* [Internet]. 1º de agosto de 2023 [citado 6 de abril de 2024];121. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37331295/>
 178. Bauer JW, Petri M, Batliwalla FM, Koeuth T, Wilson J, Slattery C, et al. Interferon-regulated chemokines as biomarkers of systemic lupus erythematosus disease activity: A validation study. *Arthritis Rheum*. 2009;60(10):3098–107.
 179. Barnabei L, Laplantine E, Mbongo W, Rieux-Laucat F, Weil R. NF- κ B: At the Borders of Autoimmunity and Inflammation. *Front Immunol* [Internet]. 9 de agosto de 2021 [citado 6 de abril de 2024];12. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34434197/>
 180. Zhang H, Sun SC. NF- κ B in inflammation and renal diseases. *Cell & Bioscience* 2015 5:1 [Internet]. 16 de novembro de 2015 [citado 6 de abril de 2024];5(1):1–12. Disponível em: <https://cellandbioscience.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13578-015-0056-4>
 181. Zheng L, Sinniah R, Hsu SIH. Pathogenic role of NF- κ B activation in tubulointerstitial inflammatory lesions in human lupus nephritis. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. maio de 2008;56(5):517–29.

182. Izquierdo MC, Perez-Gomez M V., Sanchez-Niño MD, Sanz AB, Ruiz-Andres O, Poveda J, et al. Klotho, phosphate and inflammation/ageing in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* [Internet]. dezembro de 2012 [citado 6 de abril de 2024];27 Suppl 4(SUPPL.4). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23258814/>
183. Sugiura H, Yoshida T, Shiohira S, Kohei J, Mitobe M, Kurosu H, et al. Reduced Klotho expression level in kidney aggravates renal interstitial fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* [Internet]. 2012 [citado 6 de abril de 2024];302(10). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22338084/>
184. Mercado VD, Anda RD, Isadora Corona-Meraz F, Vázquez-Del Mercado M, Sandoval-García F, Robles-De Anda JA, et al. Biomarkers in Systemic Lupus Erythematosus along with Metabolic Syndrome. *Journal of Clinical Medicine* 2024, Vol 13, Page 1988 [Internet]. 29 de março de 2024 [citado 6 de abril de 2024];13(7):1988. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2077-0383/13/7/1988/htm>
185. García-Carrasco M, Mendoza-Pinto C, Munguía-Realpozo P, Etchegaray-Morales I, Vélez-Pelcastre SK, Méndez-Martínez S, et al. Insulin Resistance and Diabetes Mellitus in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* [Internet]. 12 de setembro de 2023 [citado 6 de abril de 2024];23(4):503–14. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36089781/>
186. Satapathy S, Bandyopadhyay D, Patro BK, Khan S, Naik S. Folic acid and vitamin B12 supplementation in subjects with type 2 diabetes mellitus: A multi-arm randomized controlled clinical trial. *Complement Ther Med* [Internet]. 1º de setembro de 2020 [citado 6 de abril de 2024];53. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33066869/>
187. Yang H, Wang H, Ren U, Chen Q, Chena ZJ. cGAS is essential for cellular senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 6 de junho de 2017 [citado 6 de abril de 2024];114(23):E4612–20. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28533362/>
188. Bronte V, Pittet MJ. The spleen in local and systemic regulation of immunity. *Immunity* [Internet]. 14 de novembro de 2013 [citado 6 de abril de 2024];39(5):806–18. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24238338/>

189. Roers A, Hiller B, Hornung V. Recognition of Endogenous Nucleic Acids by the Innate Immune System. *Immunity* [Internet]. 19 de abril de 2016 [citado 6 de abril de 2024];44(4):739–54. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27096317/>
190. MacLauchlan S, Fitzgerald KA, Gravallese EM. Intracellular Sensing of DNA in Autoinflammation and Autoimmunity. *Arthritis & Rheumatology* [Internet]. 1º de outubro de 2022 [citado 6 de abril de 2024];74(10):1615–24. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/art.42256>
191. Korsmo HW, Kadam I, Reaz A, Bretter R, Saxena A, Johnson CH, et al. Prenatal Choline Supplement in a Maternal Obesity Model Modulates Offspring Hepatic Lipidomes. *Nutrients* [Internet]. 1º de fevereiro de 2023 [citado 6 de abril de 2024];15(4):965. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6643/15/4/965/htm>
192. Li M, van Esch BCAM, Henricks PAJ, Folkerts G, Garssen J. The anti-inflammatory effects of short chain fatty acids on lipopolysaccharide- or tumor necrosis factor α -stimulated endothelial cells via activation of GPR41/43 and inhibition of HDACs. *Front Pharmacol* [Internet]. 23 de maio de 2018 [citado 6 de abril de 2024];9(MAY):373720. Disponível em: www.frontiersin.org
193. Ge ZJ, Luo SM, Lin F, Liang QX, Huang L, Wei YC, et al. DNA methylation in oocytes and liver of female mice and their offspring: Effects of high-fat-diet-induced obesity. *Environ Health Perspect* [Internet]. 6 de dezembro de 2014 [citado 6 de abril de 2024];122(2):159–64. Disponível em: <https://ehp.niehs.nih.gov/doi/10.1289/ehp.1307047>
194. 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. *Lifestyle Genom* [Internet]. 20 de dezembro de 2023 [citado 6 de abril de 2024];16(1):192–213. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1159/000533193>
195. Kurogi T, Inoue H, Guo Y, Nobukiyo A, Nohara K, Kanno M. A methyl-deficient diet modifies early B cell development. *Pathobiology* [Internet]. maio de 2012 [citado 6 de abril de 2024];79(4):209–18. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22508441/>

196. Idborg H, Eketjäll S, Pettersson S, Gustafsson JT, Zickert A, Kvarnström M, et al. Original research article: TNF- α and plasma albumin as biomarkers of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Lupus Sci Med* [Internet]. 2018 [citado 6 de abril de 2024];5(1):260. Disponível em: [/pmc/articles/PMC6018889/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23576011/)
197. Strickland FM, Hewagama A, Wu A, Sawalha AH, Delaney C, Hoeltzel MF, et al. Diet influences expression of autoimmune-associated genes and disease severity by epigenetic mechanisms in a transgenic mouse model of lupus. *Arthritis Rheum* [Internet]. julho de 2013 [citado 6 de abril de 2024];65(7):1872–81. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23576011/>
198. Ray D, Strickland FM, Richardson BC. Oxidative stress and dietary micronutrient deficiencies contribute to overexpression of epigenetically regulated genes by lupus T cells. *Clin Immunol* [Internet]. 1º de novembro de 2018 [citado 6 de abril de 2024];196:97–102. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29654844/>
199. Vordenbäumen S, Sokolowski A, Rosenbaum A, Gebhard C, Raithel J, Düsing C, et al. Methyl donor micronutrients, CD40-ligand methylation and disease activity in systemic lupus erythematosus: A cross-sectional association study. *Lupus* [Internet]. 1º de outubro de 2021 [citado 6 de abril de 2024];30(11):1773–80. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/09612033211034559>
200. Idborg H, Eketjäll S, Pettersson S, Gustafsson JT, Zickert A, Kvarnström M, et al. Original research article: TNF- α and plasma albumin as biomarkers of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Lupus Sci Med* [Internet]. 2018 [citado 6 de abril de 2024];5(1):260. Disponível em: [/pmc/articles/PMC6018889/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23576011/)
201. Svenungsson E, Gunnarsson I, Fei GZ, Lundberg IE, Klareskog L, Frostegård J. Elevated triglycerides and low levels of high-density lipoprotein as markers of disease activity in association with up-regulation of the tumor necrosis factor alpha/tumor necrosis factor receptor system in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* [Internet]. 1º de setembro de 2003 [citado 6 de abril de 2024];48(9):2533–40. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13130473/>
202. Samavat J, Adaikalakoteswari A, Boachie J, Saravanan P. Increased pro-inflammatory cytokine production in vitamin B12 deficient adipocytes. *Endocrine*

- Abstracts [Internet]. 2 de novembro de 2018 [citado 6 de abril de 2024]; Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/328788276_Increased_pro-inflammatory_cytokine_production_in_vitamin_B12_deficient_adipocytes
203. Siddiqua TJ, Akhtar E, Haq MA, Shahab-Ferdows S, Hampel D, Islam S, et al. Effects of vitamin B12 supplementation on oxidative stress markers and pro-inflammatory cytokines during pregnancy and postpartum among Bangladeshi mother–child pairs. *BMC Nutr* [Internet]. 1º de dezembro de 2024 [citado 6 de abril de 2024];10(1):1–10. Disponível em: <https://bmcnutr.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40795-023-00785-y>
 204. Sawalha AH, Jeffries M. Defective DNA methylation and CD70 overexpression in CD4⁺ T cells in MRL/lpr lupus-prone mice. *Eur J Immunol* [Internet]. 1º de maio de 2007 [citado 6 de abril de 2024];37(5):1407–13. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/eji.200636872>
 205. 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. *J Biol Chem* [Internet]. 26 de julho de 2013 [citado 6 de abril de 2024];288(30):21936–44. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23775084/>
 206. Zhu X, Liang J, Li F, Yang Y, Xiang L, Xu J. Analysis of associations between the patterns of global DNA hypomethylation and expression of DNA methyltransferase in patients with systemic lupus erythematosus. *Int J Dermatol* [Internet]. junho de 2011 [citado 6 de abril de 2024];50(6):697–704. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21595664/>
 207. Jin-tao W, Ling D, Shi-Wen J, Junxia H, Wei-min Z, Qin Z, et al. Folate deficiency and aberrant expression of DNA methyltransferase 1 were associated with cervical cancerization. *Curr Pharm Des* [Internet]. 5 de abril de 2014 [citado 6 de abril de 2024];20(11):1639–46. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23888945/>
 208. Ghoshal K, Li X, Datta J, Bai S, Pogribny I, Pogribny M, et al. A folate- and methyl-deficient diet alters the expression of DNA methyltransferases and methyl

- CpG binding proteins involved in epigenetic gene silencing in livers of F344 rats. *J Nutr* [Internet]. 2006 [citado 6 de abril de 2024];136(6):1522–7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16702315/>
209. Mahajan A, Sapehia D, Thakur S, Mohanraj PS, Bagga R, Kaur J. Effect of imbalance in folate and vitamin B12 in maternal/parental diet on global methylation and regulatory miRNAs. *Scientific Reports* 2019 9:1 [Internet]. 26 de novembro de 2019 [citado 6 de abril de 2024];9(1):1–21. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-54070-9>
 210. Versini M, Jeandel PY, Rosenthal E, Shoenfeld Y. Obesity in autoimmune diseases: not a passive bystander. *Autoimmun Rev* [Internet]. 2014 [citado 6 de abril de 2024];13(9):981–1000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25092612/>
 211. 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. *Nutrients* [Internet]. 1º de fevereiro de 2021 [citado 6 de abril de 2024];13(2):1–12. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33811111/>
 212. Pesqueda-Cendejas K, Campos-López B, Mora-García PE, Moreno-Ortiz JM, De la Cruz-Mosso U. Methyl Donor Micronutrients: A Potential Dietary Epigenetic Target in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *International Journal of Molecular Sciences* 2023, Vol 24, Page 3171 [Internet]. 6 de fevereiro de 2023 [citado 6 de abril de 2024];24(4):3171. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/4/3171/htm>
 213. 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. *Lifestyle Genom* [Internet]. 7 de novembro de 2023 [citado 6 de abril de 2024];16(1):192–213. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37935134/>

Anexo

ANEXO A

Aprovação do Comitê de Ética



Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada **“Efeito da suplementação ácido fólico e vitamina b12 no perfil epigenético de animais com lupus e obesidade”**, registrada com o nº **1695/2021**, sob a responsabilidade de **Carolina Nicoletti Ferreira Fino**, apresentada pelo Departamento de Clínica Médica - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em 16/09/2021

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 01-03-2022 Término: 31-03-2023
Espécie/linhagem/raça	Camundongo NZBWF1/J
Nº de animais	40
Peso/Idade	8 semanas
Sexo	fêmeas
Origem	The Jackson Laboratory®

A CEUA FMUSP solicita que ao final da pesquisa seja enviado Relatório com todas as atividades.

CEUA-FMUSP, 16 de setembro de 2021

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais