

Jhulia Caroline Nunes Leal da Mota

Efeitos da suplementação de nutrientes doadores de metil no perfil de metilação do DNA em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e peso adequado ou excesso de peso: estudo clínico randomizado

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

São Paulo

2024

Jhulia Caroline Nunes Leal da Mota

Efeitos da suplementação de nutrientes doadores de metil no perfil de metilação do DNA em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e peso adequado ou excesso de peso: estudo clínico randomizado

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Mota, Jhulia Caroline Nunes Leal da

Efeitos da suplementação de nutrientes doadores de metil no perfil de metilação do DNA em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e peso adequado ou excesso de peso : estudo clínico randomizado / Jhulia Caroline Nunes Leal da Mota; 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. Epigenética 2. Lúpus 3. Obesidade 4. Tecido adiposo 5. Metilação do DNA 6. Suplementação I. Fino, Carolina Nicoletti Ferreira, orient. II. Título

USP/FM/DBD-178/24

Nome: MOTA, Jhulia Caroline Nunes Leal da

Título: Efeitos da suplementação de nutrientes doadores de metil no perfil de metilação do DNA em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e peso adequado ou excesso de peso: estudo clínico randomizado.

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha gratidão a todas as pessoas que contribuíram para a conclusão deste trabalho. Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha orientadora, Carolina Nicoletti, pela excelente orientação, apoio e incentivo ao longo do projeto. Seu profissionalismo e dedicação foram fundamentais para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Igualmente agradeço à equipe médica do Ambulatório de Lúpus Adulto do Hospital das Clínicas junto à toda Divisão de Reumatologia pelo suporte, sobretudo durante a fase de recrutamento das pacientes. Agradeço especialmente aos doutores(as) Eloisa Bonfá, Eduardo Borba, Emily Yuki, Danieli Andrade e Luciana Seguro.

Expresso também gratidão à minha família por todo apoio moral e incentivo ao longo de toda jornada acadêmica. Da mesma forma, agradeço à todas as amigadas formadas durante a pós-graduação que tornaram essa fase muito mais leve, especialmente aos colegas Lucas Carvalho, Amanda Ribeiro, Letícia Lobato e Beatriz Carvalho.

Por fim, gostaria de agradecer à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro concedido através do processo nº 2021/09745-5.

Este trabalho é dedicado a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a sua realização.

RESUMO

DA MOTA JCNL: Efeitos da suplementação de nutrientes doadores de metil no perfil de metilação do DNA em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e peso adequado ou excesso de peso: estudo clínico randomizado [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2024.

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença crônica autoimune complexa cuja fisiopatologia envolve fatores genéticos, epigenéticos, imunológicos e ambientais. A alteração nos padrões epigenéticos tem sido proposta como um fator contribuinte no desenvolvimento da autoimunidade e nas manifestações fenotípicas específicas do LES. Nutrientes como o ácido fólico (AF) e a vitamina B12 (B12) desempenham papel como cofatores ou doadores de grupo metil e o perfil de metilação do DNA se relaciona com o estado nutricional destes micronutrientes. Este ensaio clínico controlado duplo-cego teve como objetivo avaliar se a suplementação com ácido fólico e vitamina B12 foi capaz de modular o perfil de metilação do DNA no tecido adiposo de pacientes com LES e peso adequado ou excesso de peso e se essa modulação é diferente de acordo com o estado nutricional. Para isso, 51 mulheres com idade entre 18 e 45 anos, no período pré-menopausa, em remissão da doença e em tratamento com prednisona em dosagem <10 mg/dia e hidroxicloroquina em dose estável foram divididas em dois grupos de acordo com a classificação do estado nutricional segundo o IMC. O grupo eutrofia (EUT) incluiu pacientes com LES e peso adequado (idade: $33,7 \pm 7,1$ anos; IMC: $22,1 \pm 2,4$ kg/m²) e o grupo excesso de peso (EP) incluiu pacientes com LES e excesso de peso (idade: $36,3 \pm 5,5$ anos; IMC: $30,4 \pm 3,6$ kg/m²). As pacientes de cada grupo foram randomizadas para receberem suplementação com AF (400 mcg) e B12 (2.000 mcg) ou placebo. Antes e após 3 meses da intervenção, avaliou-se parâmetros clínicos, antropométricos, metabólicos e de consumo alimentar e foram coletadas amostras de sangue periférico e tecido adiposo subcutâneo (TAS). A análise de metilação do DNA foi conduzida pela plataforma *Infinium Human Methylation EPIC Beadchip* e a análise da expressão gênica foi realizada em duplicata por reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Ambas foram realizadas com amostras de TAS. Os testes de Shapiro-Wilk, teste t para amostras independentes e teste qui-quadrado foram utilizados nas análises basais, enquanto a Equação de Estimativa Generalizada (*post hoc* de Bonferroni) foi utilizada para análise do efeito da intervenção ($p < 0,05$). As mudanças no nível de metilação de cada CpG ($\Delta\beta$) foram calculadas considerando um valor mínimo de 5%, $p < 0,001$ e taxa de falsa descoberta $< 0,05$. Observou-se aumento das concentrações séricas de AF e B12 após a suplementação em ambos os grupos, entretanto não foram observadas outras alterações nas características fenotípicas. A análise de metilação do DNA evidenciou 418 CpGs diferencialmente metilados (CpGDMs) após suplementação no grupo EUT, associadas ao metabolismo de sinalização dos receptores do tipo NOD (NLRs), metabolismo de xenobióticos pelo citocromo P450 e via da carcinogênese. Por outro lado, observou-se 657 CpGDMs após suplementação no grupo EP, relacionadas à via do fator de necrose tumoral (TNF)- α , regulação da insulina e fosforilação oxidativa. Não foram observadas alterações na expressão dos genes *TNF- α* , *IL-6*, *MTHFR*, *DNMT1*, *STAT3*, *ADIPOQ* e *LEP* após suplementação em ambos os grupos. Nossos achados sugerem que os micronutrientes doadores de metil modulam o perfil de metilação do DNA no tecido adiposo de mulheres com LES e esse efeito é diferente a depender do estado nutricional. Este estudo foi registrado em *clinicaltrials.gov* (nº.: NCT05097365).

Palavras-chave: Epigenética. Lúpus. Obesidade. Tecido Adiposo. Metilação do DNA. Suplementação.

ABSTRACT

DA MOTA JCNL: Effects of methyl donor nutrient supplementation on DNA methylation profile in patients with lupus and normal weight or excess body weight: a randomized clinical study. [dissertation]. São Paulo: Faculty of Medicine, University of São Paulo; 2024.

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a multifaceted chronic autoimmune condition characterized by a complex interplay of genetic, epigenetic, immunological, and environmental factors. Alterations in epigenetic patterns have been implicated in the development of autoimmunity and specific SLE's phenotypic characteristics. Nutrients such as folic acid and vitamin B12 act as cofactors or methyl group donors, influencing DNA methylation profiles. In this double-blind controlled clinical trial, we aimed to investigate whether supplementation with folic acid and vitamin B12 could modulate the DNA methylation profile in the adipose tissue of SLE patients with either normal weight or excess body weight, and whether this modulation differed according to nutritional status. Fifty-one premenopausal women aged 18 to 45 years, in disease remission, receiving prednisone <10 mg/day and stable hydroxychloroquine dose, were divided into two groups based on BMI. The normal weight group comprised patients with adequate weight (age: 33.7 ± 7.1 years; BMI: 22.1 ± 2.4 kg/m²), while the excess body weight group included those with excess weight (age: 36.3 ± 5.5 years; BMI: 30.4 ± 3.6 kg/m²). Each group was randomized to receive either vitamin mix supplementation (2,000 mcg of vitamin B12 with 400 mcg of folic acid) or placebo. Clinical, anthropometric, metabolic, and dietary parameters were evaluated before and after 3 months of intervention, with samples of peripheral blood and subcutaneous adipose tissue collected. DNA methylation analysis was conducted using the Infinium Human Methylation EPIC Beadchip platform, and gene expression analysis was performed using real-time quantitative polymerase chain reaction by $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. Both were performed with subcutaneous adipose tissue samples. Shapiro-Wilk, t-test for independent samples and chi-square test were used for baseline analyses, while the Generalized Estimating Equation (with Bonferroni *post hoc*) was used to analyze the effect of the intervention ($p < 0.05$). Changes in methylation levels of CpGs were assessed, considering a minimum $\Delta\beta$ of 5%, $p < 0.001$, and false discovery rate < 0.05 . While serum concentrations of folic acid and vitamin B12 increased post-supplementation in both groups, no significant alterations in phenotypic characteristics were noted. In patients with normal weight, 418 differentially methylated CpGs were identified post-supplementation, associated with metabolic pathways regulating NOD-type receptors (NLRs) signaling, xenobiotic metabolism via cytochrome P450, and carcinogenesis pathways. Conversely, patients with excess body weight showed 657 differentially methylated CpGs, linked to tumor necrosis factor (TNF)- α signaling, insulin regulation, and oxidative phosphorylation. Notably, there were no changes in gene expression of *TNF- α* , *IL-6*, *MTHFR*, *DNMT1*, *STAT3*, *ADIPOQ*, and *LEP* following supplementation in either group. These findings suggest that methyl group donor micronutrients modulate adipose tissue DNA methylation profiles in women with SLE, and this effect of supplementation is different depending on the nutritional status. This study was registered at *clinicaltrials.gov* (n^o.: NCT05097365).

Keywords: Epigenetic. Lupus. Obesity. Adipose Tissue. DNA Methylation. Supplementation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mecanismo fisiopatológico do LES.....	24
Figura 2 - Mecanismo inflamatório do tecido adiposo e citocinas presentes no excesso de peso e obesidade.....	34
Figura 3 – Ação da leptina e adiponectina no indivíduo com ou sem excesso de peso/obesidade.....	35
Figura 4 - Processo de metilação do DNA.....	36
Figura 5 - Metabolismo de 1 carbono (1C).....	42
Figura 6 - Desenho experimental.....	49
Figura 7 - Frascos contendo suplementação ou placebo.....	50
Figura 8 - Aferição das medidas antropométricas.....	51
Figura 9 - Coleta de sangue periférico.....	53
Figura 10 - Procedimento de biópsia do tecido adiposo subcutâneo.....	54
Figura 11 – Ensaio de metilação do DNA.....	56
Figura 12 – Protocolo simplificado do processo de análise de metilação do DNA.....	56
Figura 13 - Fluxograma de recrutamento.....	63
Figura 14 - Dados do nível de atividade física das pacientes com peso adequado e excesso de peso antes e após a suplementação com vitamina B12 e ácido fólico ou placebo.....	69
Figura 15 - <i>Heatmap</i> das CpGs diferentemente metiladas após uso de placebo entre pacientes com LES e peso adequado.....	73
Figura 16 – Distribuição das CpGs diferentemente metiladas após uso de placebo entre pacientes com LES e peso adequado ao longo do gene.....	73
Figura 17 - <i>Heatmap</i> das CpGs diferentemente metiladas após suplementação com vitamina B12 e ácido fólico entre pacientes com LES e peso adequado.....	77
Figura 18 - Distribuição das CpGs diferentemente metiladas após suplementação com vitamina B12 e ácido fólico entre pacientes com LES e peso adequado ao longo do gene.....	77
Figura 19 - Diagrama de Venn das CpGs diferentemente metiladas após uso de placebo ou suplementação com vitamina B12 e ácido fólico entre pacientes com LES e peso adequado.....	81
Figura 20 - <i>Heatmap</i> das CpGs diferentemente metiladas após uso de placebo entre pacientes com LES e excesso de peso.....	82

Figura 21 - Distribuição das CpGs diferentemente metiladas após uso de placebo entre pacientes com LES e excesso de peso ao longo do gene.....	82
Figura 22 - <i>Heatmap</i> das CpGs diferentemente metiladas após suplementação com vitamina B12 e ácido fólico entre pacientes com LES e excesso de peso.....	86
Figura 23 - Distribuição das CpGs diferentemente metiladas após suplementação com vitamina B12 e ácido fólico entre pacientes com LES e excesso de peso ao longo do gene.....	87
Figura 24 - Diagrama de Venn das CpGs diferentemente metiladas após uso de placebo ou suplementação com vitamina B12 e ácido fólico entre pacientes com LES e excesso de peso.....	90
Figura 25 – Diagrama de Venn das CpGs diferentemente metiladas após suplementação com vitamina B12 e ácido fólico entre pacientes com LES e peso adequado ou excesso de peso.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados basais socioeconômicos e clínicos das pacientes com LES incluídas no estudo.....	64
Tabela 2 - Dados basais de medicação e atividade da doença das pacientes com LES incluídas no estudo.....	65
Tabela 3 - Dados antropométricos e de composição corporal basais das pacientes com LES incluídas no estudo.....	65
Tabela 4 - Dados antropométricos e de composição corporal das pacientes com LES antes e após a suplementação com vitamina B12 e ácido fólico ou placebo.....	66
Tabela 5 - Dados basais do consumo alimentar das pacientes com LES incluídas no estudo.....	67
Tabela 6 - Dados do consumo alimentar das pacientes com LES antes e após a suplementação com vitamina B12 e ácido fólico ou placebo.....	68
Tabela 7 - Dados metabólicos basais das pacientes com LES incluídas no estudo.....	70
Tabela 8 - Dados metabólicos das pacientes com LES antes e após a suplementação com vitamina B12 e ácido fólico ou placebo.....	71
Tabela 9 – Top 20 principais CpGs em regiões promotoras diferentemente metiladas em pacientes com LES e peso adequado após uso de placebo.....	75
Tabela 10 - Vias metabólicas relacionadas aos genes hipermetilados em pacientes com LES e peso adequado após uso de placebo.....	76
Tabela 11 - Vias metabólicas relacionadas aos genes hipometilados em pacientes com LES e peso adequado após uso de placebo.....	76
Tabela 12 - Top 20 principais CpGs em regiões promotoras diferentemente metiladas em pacientes com LES e peso adequado após suplementação com vitamina B12 e ácido fólico.....	79
Tabela 13 - Vias metabólicas relacionadas aos genes hipermetilados em pacientes com LES e peso adequado após suplementação com vitamina B12 e ácido fólico.....	80
Tabela 14 - Vias metabólicas relacionadas aos genes hipometilados em pacientes com LES e peso adequado após suplementação com vitamina B12 e ácido fólico.....	80
Tabela 15 - Top 20 principais CpGs em regiões promotoras diferentemente metiladas em pacientes com LES e excesso de peso após uso de placebo.....	84

Tabela 16 - Vias metabólicas relacionadas aos genes hipermetilados em pacientes com LES e excesso de peso adequado após uso de placebo.....	85
Tabela 17 - Vias metabólicas relacionadas aos genes hipometilados em pacientes com LES e excesso de peso adequado após uso de placebo.....	85
Tabela 18 - Top 20 principais CpGs em regiões promotoras diferentemente metiladas em pacientes com LES e excesso de peso após suplementação com vitamina B12 e ácido fólico.....	88
Tabela 19 - Vias metabólicas relacionadas aos genes hipermetilados em pacientes com LES e excesso de peso após suplementação com vitamina B12 e ácido fólico.....	89
Tabela 20 - Vias metabólicas relacionadas aos genes hipometilados em pacientes com LES e excesso de peso após suplementação com vitamina B12 e ácido fólico.....	89
Tabela 21 – Expressão de genes alvos após uso de placebo ou suplementação com vitamina B12 e ácido fólico nas pacientes com LES e peso adequado ou excesso de peso.....	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1C	1 carbono
5,10-metileno THF	5,10-metileno tetrahidrofolato
5-metil THF	5-metil tetrahidrofolato
ACR	Colégio Americano de Reumatologia
ACTB	Beta-actina
ADIPOQ	Adiponectina
ANA	Anticorpo antinuclear
Anti- β 2GP1	Anti-beta2 glicoproteína 1
Anti-dsDNA	anti-DNA dupla hélice
Anti-La	Autoanticorpo Anti-La
Anti-Ro	Autoanticorpo Anti-Ro
Anti-Smith	Autoanticorpo Anti-Smith
B12	Vitamina B12
B2	Vitamina B2
B6	Vitamina B6
BHMT	Betaína-homocisteína metiltransferase
C3	Proteína do Sistema Complemento 3
C4	Proteína do Sistema Complemento 4
CA	Circunferência Abdominal
CAAE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética.
Camp	Adenosina Monofosfato Cíclico
CB-caps	Células de Ativação do Complemento
CBS	Cistationina-beta-sintetase
Cm	Centímetros
CONSORT	Grupo de Testes de Padrões Consolidados de Relatórios
CpG	Sítios 5-C-Fosfato G-3
CpGDMs	CpGs Diferentemente Metiladas
CREM	Modulador de Elemento Responsivo a CAMP
Ct	Linha de detecção mínima
DM2	Diabetes Mellitus do Tipo 2
DMG	Dimetilglicina
DNMT	DNA Metiltransferase
EDTA	Etilenodiamina tetra acética ácida

EEG	Equação de Estimativa Generalizada
EP	Excesso de peso
ERK-MAP quinase	Quinase Regulada por Sinal Extracelular
ESR1	Receptor de Estrogênio Alfa 1
EULAR	Liga Europeia Contra o Reumatismo
EUT	Eutrofia
EZH2	Intensificador de Zeste Homólogo 2
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FDR	Taxa de descoberta falsa
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FXD2	Regulador de Transporte de Íons 2
g	Gramas
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
h	Horas
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HCQ	Hidroxicloroquina
HDL-c	Lipoproteína de Alta Densidade
HIF3A	Fator 3 Induzível por Hipóxia A
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IMC	Índice de Massa Corporal
INT	Intervenção
IPAQ	Questionário Internacional de Atividade Física
JNK	c-Jun N-terminal quinase
Kb	Kilobyte
Kcal	Calorias
KCNN2	Canal Ativado por Potássio e Cálcio Subfamília N Membro 2
KEEG	Enciclopédia de Kyoto de Genes e Genomas
Kg	Quilograma
Kg/m ²	Quilograma por metro quadrado
LACRE	Laboratório de Avaliação e Condicionamento em Reumatologia
LDL-c	Lipoproteína de Baixa Densidade
LEP	Leptina
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico

LIM	Laboratório de Investigações Médicas
LINE-1	Elemento Nuclear Intercalado Longo
m	Metros
M1	Macrófagos do tipo 1
M2	Macrófagos do tipo 2
MAT	Metionina-adenosiltransferase
Mcg	Microgramas
MCP-1	Proteína Quimiotática Monocitária-1
MET	Nível de Intensidade Equivalente Metabólico
Mg	Miligramas
Mg/dL	Miligramas por decilitro
miRNA	micro RNA
mL	Mililitro
MLH1	Homólogo de MutL 1
mm	Milímetro
MMP9	Metaloproteinase de Matriz 9
mRNA	RNA mensageiro
MTHFR	Metilenotetrahidrofolato redutase
N	Número
Não-HDL-c	Lipoproteína de Densidade Não Alta
NF-κB	Fator Nuclear Kappa B
Ng	Nanograma
Ng/mL	Nanograma por mililitro
NLR	<i>NOD-like receptors</i>
Nm	Nanômetro
NOD	Receptores do tipo domínio de oligomerização e ligação a nucleotídeos
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMP	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PCR	Proteína C Reativa
PCR-us	Proteína C Reativa de Alta Sensibilidade
Pg/mL	Picograma por mililitro
PKCδ	Proteína Quinase C Delta
PLA	Placebo
PPAR	Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissomos

RT-qPCR	Reação em cadeia de polimerase quantitativo em tempo real
R24h	Recordatório Alimentar de 24 horas
RDA	Ingestão Diária Recomendada
RFX1	Fator de regulação para a família de proteínas X-Box
Rpm	Rotações por minuto
SAH	S-adenosil-homocisteína
SAM	S-adenosil-metionina
SHMT	Serina hidroximetil transferase
SLEDAI	Índice de Atividade da Doença do Lúpus Eritematoso Sistêmico
SLICC	Clínica Colaboradora Internacional de Lúpus Eritematoso Sistêmico
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
SPSS	Pacote Estatístico para Ciências Sociais
STAT	Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição
TAB	Tecido Adiposo Branco
TAM	Tecido Adiposo Marrom
TAS	Tecido Adiposo Subcutâneo
TCD4+	Células/linfócitos T CD4 positivos
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TG	Triglicerídeos
TGF- β	Fator de Crescimento β
Th	Células T auxiliares
THF	Tetrahydrofolato
TLR	Receptor <i>toll-like</i>
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TRP	Canais de Receptores Transientes de Potencial
UGT1A9	UDP Glucuronosiltransferase 1 Membro A9
UGT1A10	UDP Glucuronosiltransferase 1 Membro A10
UL	Limite Máximo Tolerável
U.V.	Raios ultravioleta
VET	Valor Energético Total
VIGITEL	Sistema de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico
Vit.	Vitamina
ZFP57	Fator de Transcrição com Dedos de Zinco 57

LISTA DE SÍMBOLOS

Δ	Delta
δ	Delta
α	Alfa
β	Beta
κ	Kappa
γ	Gama
μ	Micro
$>$	Maior
$<$	Menor
$\leq$	Menor igual
$\geq$	Maior igual
$=$	Igual
$\pm$	Mais ou menos
$\%$	Porcentagem
$\uparrow$	Maior/mais
$\downarrow$	Menor/menos
®	Marca registrada
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
$+$	Positivo(a)
$-$	Negativo(a)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	23
2.1 Lúpus eritematoso sistêmico.....	23
2.2 Implicações da obesidade no LES.....	30
2.3 Tecido adiposo como órgão endócrino.....	32
2.4 Mecanismos epigenéticos e metilação do DNA.....	36
2.5 Metilação do DNA no LES e obesidade.....	37
2.6 Papel dos nutrientes doadores de grupo metil na metilação do DNA.....	39
3 OBJETIVOS.....	45
3.1 Objetivo primário.....	45
3.2 Objetivos secundários.....	45
4. PACIENTES E MÉTODOS.....	47
4.1 Aspectos éticos e local do estudo.....	47
4.2 Seleção e recrutamento das pacientes.....	47
4.3 Desenho experimental.....	48
4.4 Suplementação de ácido fólico e vitamina B12.....	50
4.5 Avaliação antropométrica e composição corporal.....	51
4.6 Análise da ingestão alimentar.....	51
4.7 Questionário Internacional de Atividade Física (IPAQ)	52
4.8 Coleta de amostra de sangue periférico e análises metabólicas.....	52
4.9 Coleta de tecido adiposo subcutâneo.....	53
4.10 Análise de metilação do DNA.....	54
4.10.1 Extração de DNA de tecido adiposo.....	54
4.10.2 Tratamento com bissulfito de sódio.....	55
4.10.3 Ensaio dos níveis de metilação do DNA.....	55
4.11 Análises de expressão gênica.....	57
4.11.1 Extração e quantificação de RNA.....	57
4.11.2 Síntese de cDNA.....	57
4.11.3 Reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR)	57
4.12 Análises de bioinformática e estatísticas.....	58
4.12.1 Variáveis clínicas e de expressão gênica.....	58
4.12.2 Análises de metilação do DNA.....	59

4.12.3 Análises de enriquecimento de vias metabólicas.....	59
5. RESULTADOS.....	62
5.1 Triagem e recrutamento.....	62
5.2 Dados socioeconômicos.....	62
5.3 Medicação e atividade da doença.....	64
5.4 Dados antropométricos e de composição corporal.....	65
5.5 Consumo alimentar.....	66
5.6 Nível de atividade física.....	68
5.7 Perfil metabólico.....	69
5.8 Metilação do DNA no tecido adiposo.....	72
5.8.1 Grupo EUT.....	72
5.8.2 Grupo EP.....	81
5.8.3 Comparação entre grupos (EUT <i>versus</i> EP).....	90
5.9 Expressão gênica no tecido adiposo.....	91
6 DISCUSSÃO.....	94
7 CONCLUSÃO.....	105
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
APÊNDICES.....	122
ANEXOS.....	124

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) se enquadra na classe das doenças reumáticas, as quais se caracterizam pela perda da tolerância homeostática do sistema imunológico devido, principalmente, a produção de autoanticorpos¹. No LES observa-se uma variedade de condições sistêmicas mediadas pela produção de citocinas pró-inflamatórias com consequente perda da qualidade de vida^{1,2}. Além do sistema musculoesquelético e manifestações articulares, o LES pode envolver sintomas cutâneos, cardiovasculares, pulmonares, renais e/ou gastrointestinais, o que reforça esta desordem como sendo extremamente complexa e heterogênea³. De forma geral, a prevalência de doenças imunomediadas tem aumentado e, nesse sentido, há um importante e crescente reconhecimento de que o estilo de vida possui um papel preponderante nesta prevalência progressiva⁴.

A obesidade tem sua fisiopatologia estabelecida em diversas vias metabólicas caracterizadas pela produção aumentada de adipocinas e citocinas pró-inflamatórias advindas do desequilíbrio no balanço energético e de fatores genéticos e externos, nos quais destacam-se aspectos socioculturais e comportamentais⁵. Nessa perspectiva, evidências apontam que o excesso de peso e a obesidade podem estar associados a um risco aumentado para o desenvolvimento das doenças reumáticas, como o LES^{6,7}. Ainda, a obesidade em pacientes com doença reumática já estabelecida parece estar associada a uma maior atividade da doença, pior prognóstico e má resposta ao tratamento⁴, sendo a sobrecarga das articulações e limitação de mobilidade algumas das causas que justificam esse cenário^{4,8}.

A epigenética é definida como modificações estruturais e bioquímicas da cromatina sem que a sequência do DNA seja alterada⁹. Os mecanismos epigenéticos regulam a expressão gênica de maneira repressiva ou permissiva de forma que uma desregulação da maquinaria epigenética implique na patogênese de uma série de doenças^{10,11}. A metilação do DNA, que consiste na adição de grupos metil a uma molécula de DNA por meio da ação das enzimas DNA metiltransferases (DNMTs) é um dos mecanismos epigenéticos mais comuns na regulação da expressão gênica e tem seu papel no “silenciamento” de genes, impedindo com que a transcrição do DNA aconteça¹². Nos últimos anos, diversas alterações dos padrões epigenéticos têm sido propostas como importante fator contribuinte para o desenvolvimento da autoimunidade, assim como fator preditor das respostas aos diferentes tratamentos^{13,14}. No LES, a literatura mostra um perfil de hipometilação do DNA tanto a nível global como de genes específicos, principalmente daqueles relacionados ao processo inflamatório¹⁵⁻¹⁷.

Somado a isso, nutrientes dietéticos advindos da alimentação ou suplementação podem influenciar os fenômenos epigenéticos por meio da inibição de enzimas que catalisam a metilação do DNA ou pela alteração da disponibilidade de substratos¹⁸. O metabolismo de um carbono é o mecanismo envolvido nessa relação, caracterizado principalmente pela transferência de grupo metil da S-adenosil-metionina (SAM) para as DNMTs, promovendo substrato para as reações de metilação do DNA¹⁹. Esta série de reações bioquímicas envolve micronutrientes que funcionam como cofatores importantes, tais como o ácido fólico e a vitamina B12¹⁹. Nesse sentido, uma relação entre o *status* de micronutrientes doadores de grupo metil com o perfil de metilação do DNA têm sido cada vez mais evidenciada¹⁸.

Considerando as evidências supracitadas, o presente estudo tem como hipótese que a suplementação de micronutrientes doadores de grupo metil pode alterar o perfil de metilação do DNA de pacientes com LES, em especial aqueles com LES e excesso de peso. Ainda são escassos os estudos que avaliam todos os mecanismos acima como um todo e, portanto, o presente estudo se faz relevante para que os mecanismos epigenéticos subjacentes sejam melhores compreendidos e, conseqüentemente, seja possível delinear estratégias terapêuticas que minimizem as conseqüências do LES e garantam uma melhor qualidade de vida para esses pacientes.

Revisão da literatura

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Lúpus eritematoso sistêmico

As doenças reumáticas se caracterizam pela perda da tolerância homeostática do sistema imunológico, com consequente perda de qualidade de vida¹. Elas afetam principalmente as articulações e músculos e configuram um importante problema de saúde pública, com prevalência mundial variando entre 2 a 65%²⁰. Complementarmente, o número de indivíduos acometidos por doenças autoimunes tem aumentado, sobretudo nos últimos 20 anos e nos países desenvolvidos²¹.

Dentre as doenças reumáticas autoimunes, destacam-se o LES, artrite reumatoide, síndrome de *Sjögren* primária, esclerose sistêmica, miosite inflamatória idiopática e vasculites sistêmicas²². Os principais sintomas englobam dores articulares, inchaço, redução ou perda de função, fadiga e manifestações mucocutâneas^{22,23}. Em alguns casos, há o comprometimento parcial ou total de órgãos e sistemas, como o sistema renal, pulmonar, cardiovascular, gastrointestinal, neurológico e hematológico²³⁻²⁶. Nas doenças autoimunes sistêmicas, os mecanismos de reconhecimento de patógenos e a prevenção de auto ataque estão prejudicados²¹ e não há um controle da inflamação induzida por este cenário, gerando uma ativação imune contínua com diferentes amplitudes durante o percurso da doença^{22,27}.

O LES é uma doença inflamatória crônica autoimune e caracterizada por uma heterogeneidade de sintomas clínicos²⁸. Embora a epidemiologia da doença varie de acordo com o sexo, faixa etária e região geográfica²⁹, uma revisão sistemática recente com 112 estudos incluídos demonstrou que a incidência global do LES foi de 5,14/100.000 indivíduos por ano. Na população feminina, a incidência foi estabelecida em 8,82/100.000 indivíduos por ano, enquanto nos homens os valores foram de 1,53/100.000 indivíduos por ano. Em termos de prevalência global, observou-se uma estimativa do LES em 43,7/100.000 indivíduos. Os valores direcionados à população feminina e masculina foram de 78,73/100.000 indivíduos e 9,26/100.000 indivíduos, respectivamente. Dentre os países com a maior prevalência de LES, destacam-se os Emirados Árabes Unidos, Barbados e Brasil²⁹. Ainda, estudos demonstram que tanto a incidência como a prevalência do LES são maiores em mulheres em idade fértil³⁰ e, ainda, que o LES é uma das principais causas de morte nesta população³¹.

Embora a etiologia do LES permaneça desconhecida, sabe-se que o aparecimento, progressão e prognóstico da doença são influenciados por fatores genéticos, epigenéticos, imunológicos e ambientais, como infecções virais e uso de certos medicamentos^{28,32,33}. O

mecanismo básico da doença, representado na Figura 1, é compreendido pela produção de autoanticorpos dirigidos contra antígenos nucleares e citoplasmáticos próprios, fato este que resulta em uma resposta imune multissistêmica representada por inflamação aguda e crônica exacerbada, além de dano tecidual^{10,23,34}.

Figura 1 - Mecanismo fisiopatológico do LES.

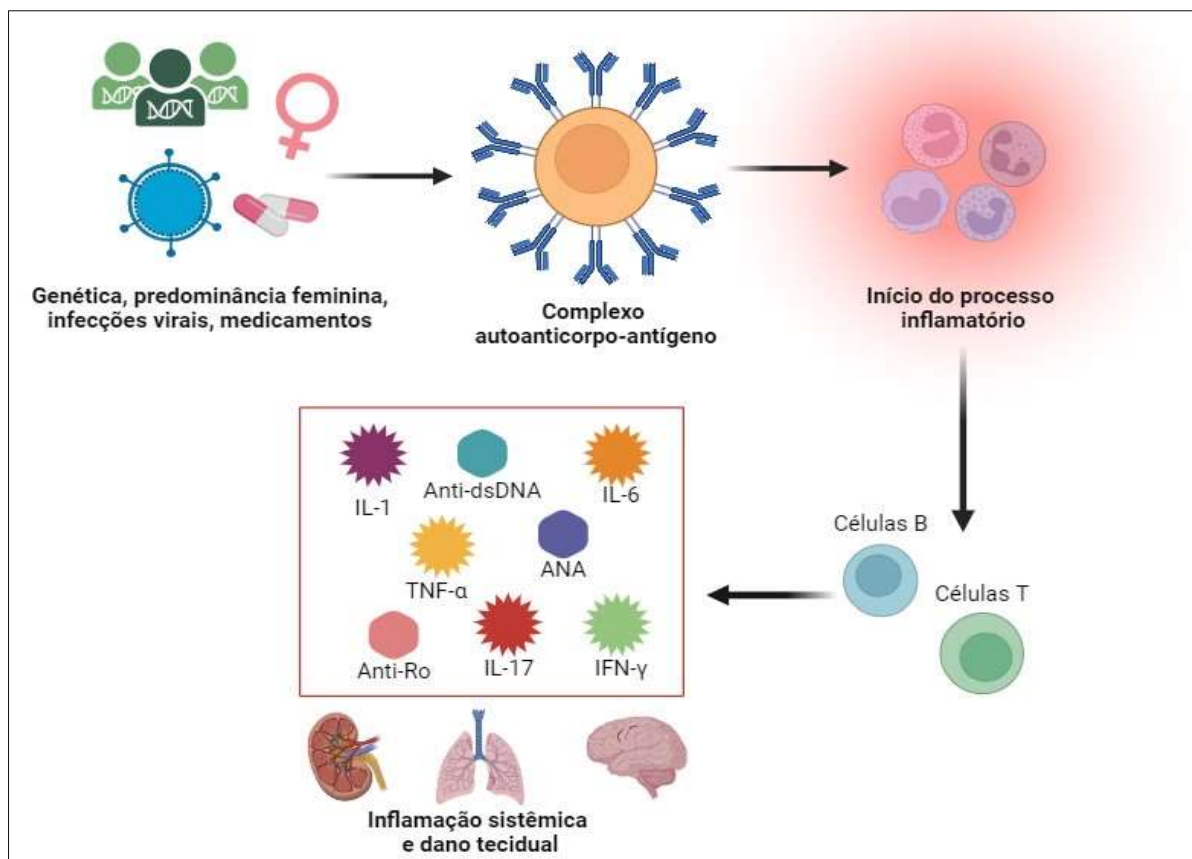


Figura de própria autoria. Fatores genéticos, infecções virais, uso de determinados medicamentos e a maior prevalência feminina se relacionam à etiologia do LES^{28,32,33}. O mecanismo da doença se baseia na produção de autoanticorpos dirigidos contra antígenos próprios, ocasionando uma resposta imune multissistêmica caracterizada por respostas exacerbadas de células B e T, com aumento da secreção de citocinas como as [IL]-17, 6, 1, 10, 13, TNF- α , IFN- γ , autoanticorpos anti-dsDNA e anti-Ro e anticorpo antinucleares que por sua vez, migram para os órgãos-alvo resultando em inflamação sistêmica e dano tecidual³⁵⁻³⁸. IL: interleucina; anti-dsDNA: autoanticorpos anti-DNA de dupla hélice; anti-Ro: anticorpo contra o antígeno Ro; ANA: anticorpo antinuclear; IFN: interferon; TNF: fator de necrose tumoral.

No LES, as manifestações clínicas são diversas e, muitas vezes, multissistêmicas³³, podendo ocorrer distúrbios hematológicos (anemia hemolítica autoimune, leucopenia e trombocitopenia), nefrite, artrite, dermatite, serosite e até mesmo envolvimento neuropsiquiátrico^{33,39}. Ademais, crises e remissões alternadas são comuns nos indivíduos com LES⁴⁰. O Quadro 1 demonstra uma sumarização das manifestações clínicas e principais sistemas afetados no LES.

Quadro 1 - Manifestações clínicas de acordo com os sistemas afetados no LES.

Sistemas	Manifestações clínicas
Sinais e sintomas constitucionais	Febre, fadiga e perda de peso
Sistema musculoesquelético	Artrite, artralgia
Sistema muscular	Mialgia, miosite
Manifestações mucocutâneas	<i>Rash malar</i> , fotossensibilidade, úlceras bucais
Sistema cardiovascular	Pericardite, doença cardiovascular precoce, endocardite de <i>Libman-Sacks</i>
Sistema pulmonar	Serosite, embolismo pulmonar, doença pulmonar intersticial, hipertensão pulmonar, encolhimento pulmonar
Sistema gastrointestinal	Vasculite mesentérica
Sistema renal	Glomerulonefrite
Sistema neurológico	Cefaleia, distúrbios cognitivos
Sistema hematológico	Diminuição da contagem de células brancas, plaquetas e hemoglobina

Adaptado de Fiona Goldblatt, Sean G O'Neill, 2013²³.

De forma geral, a fisiopatologia do LES é caracterizada pela autoimunidade, na qual uma cascata de ativação do sistema imune é disparada com respostas exacerbadas de células B e T⁴¹. As células B possuem seu papel estabelecido na patogênese do LES devido a produção de autoanticorpos e resposta à antígenos⁴². Uma das vias mais conhecida e estudada relacionada a ativação de células B é a via do receptor *toll-like* (TLR). Os TLRs são receptores cruciais na ativação da resposta imune e inflamatória, uma vez que são capazes de reconhecer padrões moleculares específicos e agir de imediato contra eles³⁰. A ativação dos TLRs leva a ativação de dois fatores de transcrição, sendo eles o fator regulador de interferon 3 (IRF3) e o fator nuclear- κ B (NF- κ B) que por sua vez levam a uma maior expressão de interferon tipo 1 (IFN-1), componente este amplamente estudado na patologia do LES^{43,44}. O aumento da expressão do TLR9, por exemplo, associa-se a maiores níveis de anticorpos anti-DNA dupla hélice (anti-dsDNA) no LES⁴⁴. O DNA e RNA fazem parte dos alvos dos autoanticorpos, sendo o anti-dsDNA e anticorpos anti-Smith (anti-Sm) os mais específicos para a doença³³. A ligação dos autoanticorpos com seus alvos leva a produção de citocinas pelas células T CD4+, como as interleucinas [IL]-17, 6, 1, 10, 13, fator de necrose tumoral α (TNF- α), IFN- γ e células produtoras de anticorpos. Estas, por sua vez, migram para os órgãos-alvo e resultam em destruição tecidual³⁵⁻³⁸.

Em adição, pacientes com LES possuem concentrações séricas de IL-10 elevadas⁴⁵. Esta citocina imuno reguladora desempenha seu papel nas respostas imunes inatas e adaptativas e pode estar envolvida na fisiopatologia do LES por contribuir com a produção de autoanticorpos, promovendo maior atividade de células B e T, e gerando os danos teciduais

característicos da doença⁴⁵. Estudos demonstraram que as concentrações séricas elevadas de IL-10 em pacientes com LES se correlaciona com o índice de atividade da doença, produção de autoanticorpos e consequente dano tecidual sistêmico⁴⁶⁻⁴⁸. Corroborando com tais achados, outros estudos demonstraram que o bloqueio de IL-10 resultou em melhora clínica⁴⁹ e correção das respostas exacerbadas de citocinas pró-inflamatórias em pacientes com LES⁵⁰.

Embora os mecanismos moleculares da IL-10 não sejam totalmente compreendidos, sabe-se que transdutores de sinal e ativadores de transcrição, do inglês *signal transducers and activators of transcription* (STAT1, STAT3, STAT4 e STAT5) relacionam-se com sua expressão e regulação⁴⁵. De modo geral, a família de proteínas STAT têm seu papel estabelecido como fatores de transcrição, agindo na regulação da expressão gênica e na comunicação intracelular⁵¹. A ativação de STAT3 é aumentada nas células T de pacientes com LES, o que significa dizer que existe o aumento da fosforilação do fator de transcrição STAT3 nas células T em indivíduos acometidos pela doença e, nesse contexto, ocorre a transativação e expressão de IL-10⁴⁵. Nesse sentido, o bloqueio e a inibição da ação do STAT3 vêm sendo propostos como estratégia em estudos envolvendo doenças autoimunes^{48,52}.

Além disso, concentrações plasmáticas de IL-17A, produzida pelas células T, também se encontram aumentadas nos pacientes com LES e demais doenças autoimunes. A IL-17A possui caráter pró-inflamatório por induzir a produção de quimiocinas e outras citocinas e por ativar os neutrófilos direcionando-os ao local da inflamação⁵³. A classe do modulador de elemento responsivo a cAMP, do inglês *cAMP Responsive Element Modulator* (CREM) se refere a fatores de transcrição que também possuem seus níveis de expressão elevados em células T no LES, sendo considerados responsáveis pela função exacerbada das células T na patogênese da doença. A ativação do CREM se relaciona com o aumento dos níveis de adenosina monofosfato cíclico (cAMP) na célula, sendo esta uma molécula mensageira produzida em resposta à ligação de outros componentes nos receptores da membrana celular⁵⁴. Estudos demonstram efeito adicional do CREM na expressão aumentada de IL-17A, cenário este que pode ser explicado pela associação do CREM à uma hipometilação observada do gene IL-17A em células T CD4⁺ do LES^{53,55}. Nesse sentido, estudos sugerem que uma expressão diminuída do CREM caracterizada por uma hipermetilação do DNA pode resultar em atenuação das respostas inflamatórias produzidas pela IL-17A. Em contrapartida, o CREM se relaciona com uma expressão diminuída de IL-2 a partir de uma hipermetilação do DNA⁵⁴.

A IL-2 também se relaciona a fisiopatologia do LES uma vez que sua principal função se baseia na proliferação e ativação de complexos imunes, sobretudo de células T, facilitando seu crescimento e diferenciação⁵⁶, sendo que distúrbios na secreção de IL-2 se relacionam a

um desequilíbrio imunológico⁵⁷. Um ensaio clínico randomizado controlado por placebo desenhado para tratar pacientes com LES evidenciou que baixas doses de IL-2 administrada por via subcutânea promoveu uma inibição de células T auxiliares 17 (Th17) de caráter pró-inflamatório, com consequente remissão sintomatológica⁵⁶.

Por fim, a IL-13 tem seu papel estabelecido nas respostas imunes e regulação da inflamação, sobretudo alérgica⁵⁸. Esta citocina é produzida principalmente pelas células T auxiliares do tipo 2 (Th2) e exerce influência sobre várias células do sistema imunológico, como as células B, eosinófilos, basófilos e monócitos³⁷. O envolvimento da IL-13 no LES se dá principalmente pela produção de componentes que se relacionam ao seu desenvolvimento, como a IL-6 e o fator de crescimento β (TGF- β)³⁷. Estudo conduzido com pacientes com LES indicou uma correlação positiva entre as concentrações séricas de IL-13 e o índice de atividade da doença⁵⁹.

Sabe-se que o diagnóstico precoce do LES é crucial para evitar as complicações multissistêmicas da doença^{60,61}. Concentrações elevadas de ANAs, autoanticorpos anti-Ro e anti-La e anticorpos antifosfolípidos são encontrados no soro de pacientes com LES⁶¹. Ademais, os anti-dsDNA e anti-Sm são altamente específicos e consagrados no diagnóstico⁶². De modo geral, as ferramentas diagnósticas do LES incluem principalmente 1) Teste de autoanticorpo; 2) Critérios de Classificação do *European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology* (EULAR/ACR) e 3) Teste de complemento ligado à célula⁶⁰.

As diretrizes desenvolvidas pelo ACR em 1997 e *Systemic Lupus International Collaborating Clinics* (SLICC) em 2012 foram utilizadas nos critérios de classificação da doença até 2019⁶³. A partir de 2019, novos critérios foram desenvolvidos e validados pelo EULAR em conjunto com o ACR, sobretudo para fins de pesquisa e a fim de garantir uma maior sensibilidade^{63,64}. As diretrizes de 2019 do EULAR/ACR utilizam diferentes valores (pesos) para cada sintoma, sejam eles clínicos e/ou imunológicos e o diagnóstico do LES é feito quando o indivíduo acumula 10 ou mais pontos advindos desses pesos⁶⁵. O Quadro 2 apresenta os critérios de 2019 do EULAR/ACR. Biomarcadores do sistema complemento, como os produtos de ativação do complemento ligado à célula (CB-CAPs), também foram incluídos nos critérios de classificação atuais⁶⁶ e podem igualmente ser utilizados para diagnóstico e na identificação do nível de atividade da doença⁶⁷. CB-CAPs têm maior sensibilidade do que os marcadores tradicionais do complemento tanto em adultos como na população pediátrica com LES^{68,69}.

Como o próprio nome sugere, o Índice de Atividade da Doença do Lúpus Eritematoso Sistêmico (SLEDAI-2K), é um instrumento validado utilizado para avaliação da atividade da doença no LES. Nesse instrumento, são atribuídos pesos (1, 2, 4 ou 8) a cada manifestação clínica e parâmetros laboratoriais presentes no LES (24 itens). O escore total do SLEDAI-2K varia de 0 a 105 e maiores escores representam uma maior atividade da doença. A atividade da doença pode ser classificada em: 1) inativa (escore=0); 2) leve (escore de 1-5); 3) moderada (escore de 6-10); 4) alta (escore de 11-19) ou 5) muito alta (escore ≥ 20). De maneira eficaz, essa ferramenta auxilia no monitoramento da doença de forma que os tratamentos sejam mais bem delineados nos pacientes com LES⁷⁰.

O LES geralmente requer tratamento vitalício com o uso de glicocorticoides e fármacos antimaláricos. Ademais, agentes imunossupressores, anti-inflamatórios não esteroidais e produtos biológicos relacionados às células B também fazem parte do tratamento farmacológico⁴¹. Até 80% dos pacientes com LES fazem uso de glicocorticoides, medicamentos estes que suprimem a inflamação induzida pela doença⁷¹. A prednisona é o fármaco glicocorticoide majoritariamente utilizado no tratamento e sua dosagem e tempo de duração são baseados em experiência clínica. Além disso, os glicocorticoides podem ser gradualmente retirados do tratamento desde que haja remissão da doença⁴¹. Dentre os efeitos adversos destacam-se a retenção hídrica, hipertensão arterial, acne, miopatia e osteoporose^{41,72}.

A hidroxicloroquina pertence à classe dos fármacos antimaláricos e normalmente é a escolhida no controle das exacerbações da doença⁷³. Além disso, graças a seus efeitos antitrombóticos, a droga é uma importante aliada no tratamento de pacientes com LES com tendência a eventos tromboticos secundários⁷⁴. De modo geral, a hidroxicloroquina é um medicamento bem tolerado com recomendação de dosagem estabelecido em diretriz prévia (5 mg/kg)⁷³. Doses que excedam a recomendação ou muitos anos de exposição a esta medicação podem acarretar em efeitos adversos, como a retinopatia⁷⁵.

Além dos medicamentos supracitados, micofenolato de mofetil, azatioprina, metotrexato, ciclofosfamida, ciclosporina, tacrolimo, belimumabe e rituximabe são outros fármacos normalmente utilizados no tratamento do LES, combinados ou não, frente às manifestações clínicas e condições individuais específicas de cada paciente⁴¹.

Quadro 2 - Critérios diagnósticos para o LES – EULAR/ACR (2019).

Domínios	Peso
Domínios Clínicos	
<i>Constitucional</i>	
Febre	2
<i>Hematológico</i>	
Leucopenia	3
Trombocitopenia	4
Hemólise autoimune	4
<i>Neuropsiquiátricos</i>	
Delirium	2
Psicose	3
Convulsão	5
<i>Mucocutâneos</i>	
Alopecia não cicatrizante	2
Úlceras orais	2
Lúpus eritematoso cutâneo subagudo	4
Lúpus eritematoso discoide	
Lúpus cutâneo agudo	6
<i>Serosal</i>	
Derrame pleural	5
Derrame pericárdico	
Pericardite aguda	6
<i>Musculoesquelético</i>	
Envolvimento articular	6
<i>Renal</i>	
Proteinúria (> 0,5g/24 h)	4
Biópsia renal classe II ou nefrite lúpica classe V	8
Biópsia renal classe III ou nefrite lúpica classe IV	10
Domínios imunológicos	
<i>Anticorpos antifosfolípidos</i>	
Anticorpos anticardiolipina	
Anticorpos anti- β 2GP1	2
Anticoagulante lúpico	
<i>Proteínas do sistema complemento</i>	
C3 ou C4 baixos	3
C3 e C4 baixos	4
<i>Anticorpos específicos para LES</i>	
Anticorpo anti-dsDNA	6
Anticorpo anti-Smith	

Adaptado de Michelle Petri *et al.*, 2012⁶⁴. LES: lúpus eritematoso sistêmico; EULAR: *European League Against Rheumatism*; ACR: *American College of Rheumatology*; Anti- β 2GP1: anti-beta2 glicoproteína 1; C3: proteína do sistema complemento 3; C4: proteína do sistema complemento 4; anti-dsDNA: autoanticorpo anti-DNA de dupla hélice; anti-Smith: autoanticorpo anti-Smith.

2.2. Implicações da obesidade no LES

A obesidade, considerada uma epidemia mundial, é definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma “condição caracterizada pelo excesso de gordura corporal em quantidade que determine prejuízos à saúde”. Um IMC igual ou maior que 30 kg/m² classifica um indivíduo com obesidade, ao passo que um IMC acima de 25 kg/m² classifica um indivíduo com sobrepeso⁷⁶. No Brasil, dados do Sistema de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL) publicados em 2023 indicaram uma prevalência de sobrepeso em 61,4% da população adulta, com maior percentual entre os homens em relação às mulheres (63,4% e 59,6%, respectivamente). Em relação à obesidade, o VIGITEL apurou uma prevalência de 24,3% na população adulta, com ocorrências sutilmente maiores na população feminina em relação à masculina (24,8% e 23,8%, respectivamente)⁷⁷.

A etiologia da obesidade é majoritariamente associada a um balanço energético positivo, isto é, quando o indivíduo consome mais energia do que é dispendida. Nesse sentido, o aumento do consumo de alimentos de alta densidade energética como os alimentos ultraprocessados, *fast-foods*, carnes vermelhas e processadas, grãos refinados, sal e açúcares adicionados e gorduras saturadas e trans está associado ao ganho de peso^{78,79}. De forma geral, já é bem elucidado que hábitos alimentares inadequados influenciam não só a etiologia da obesidade, como também de diversos outros fatores de risco cardiometabólicos, como hipertensão arterial, distúrbios endoteliais, distúrbios no metabolismo da glicose, alterações hepáticas e distúrbios no microbioma⁷⁹. Contudo, muito além de um balanço energético positivo, a obesidade é uma doença complexa e multifatorial, na qual fatores genéticos, epigenéticos, comportamentais, socioculturais e ambientais também estão envolvidos⁸⁰. Dentre esses fatores, autores destacam o uso de certos medicamentos, perda da qualidade do sono, distúrbios endócrinos e psiquiátricos⁷⁸, polimorfismos genéticos^{81,82} e distúrbios associados ao comportamento alimentar⁸³.

A obesidade engloba um processo inflamatório crônico de baixo grau e indivíduos, no qual os indivíduos com obesidade possuem um risco aumentado para desenvolverem doenças secundárias como diabetes mellitus do tipo 2 (DM2), câncer e doenças cardiovasculares⁸⁴. Na obesidade, o acúmulo de tecido adiposo gera disfunção das células adiposas, resultando em estresse oxidativo e em um estado de hipóxia desses adipócitos, favorecendo a infiltração de células imunes com consequente aumento da secreção de adipocinas e citocinas pró inflamatórias⁸⁵.

Paralelamente, estudos clínicos com pacientes com LES vem mostrando um risco cardiovascular aumentado nesses pacientes^{86,87}. Uma meta-análise publicada em 2017 avaliando 47 estudos e 8.367 indivíduos com a doença demonstrou uma prevalência de síndrome metabólica em 26% dos pacientes com LES⁸⁷. Ainda, dados da literatura demonstram que até 36% dos pacientes com LES adultos jovens apresentam dislipidemia e cerca de 40% apresentam hipertensão arterial⁸⁸.

Em resumo, o aumento da sinalização da cascata inflamatória oriunda do excesso de tecido adiposo pode potencializar o estado de autoimunidade, contribuindo para a patogênese do LES, assim como para a exacerbação da doença e piora dos sintomas LES⁸⁹⁻⁹². Ainda, considerando que a obesidade *per se* é um fator de risco cardiovascular, esta pode estar fortemente associada a piores desfechos clínicos da doença, alterando de forma significativa a qualidade de vida dos pacientes com LES^{88,93}. Estudos demonstram que o estado inflamatório do LES associado ao da obesidade predispõe os pacientes a desenvolverem síndrome metabólica^{88,94}, que por sua vez se associa a maior risco de doenças cardiovasculares devido ao aumento da pressão arterial, dislipidemia e glicemia elevada que caracterizam esta condição^{88,95}. Ressalta-se que a prevalência de obesidade entre pacientes com LES é consideravelmente alta (semelhante ou superior ao da população em geral)⁹⁶, atingindo cerca de 28 a 50% dos pacientes⁹². Ainda, pacientes com LES e obesidade parecem possuir maior probabilidade de apresentarem fadiga, dor, sintomas depressivos, comprometimento cognitivo e renal e declínio funcional ao longo do tempo⁸⁸.

Um estudo experimental envolvendo camundongos propensos ao LES (MRL/lpr) investigou o impacto de uma dieta rica em gordura na patogênese da doença. Os animais foram divididos aleatoriamente para receberem uma dieta regular (10% de calorias advindas de gordura) ou uma dieta rica em gordura (60% de calorias advindas de gordura) durante 14 semanas. Como resultado, observou-se que os animais alimentados com a dieta rica em gordura tiveram um maior peso corporal, maiores concentrações séricas de lipídeos, lesões cutâneas e alterações renais mais graves em comparação ao grupo que recebeu a dieta regular, sugerindo que uma dieta com alto teor de gordura pode estar associada ao desenvolvimento acelerado e exacerbado do LES e ao estado de autoimunidade⁹². Ainda, um estudo transversal com 275 pacientes (sendo 90,5% mulheres) visou investigar o impacto da obesidade na atividade da doença, acúmulo de danos, marcadores inflamatórios e fatores de risco cardiovascular no LES. A atividade da doença foi avaliada por meio do SLEDAI-2K e os danos aos órgãos relacionados ao LES foram avaliados por meio do SLICC/ACR. Os resultados demonstraram que pacientes com LES e obesidade associada apresentaram um pior índice de atividade da doença e acúmulo

de danos, maiores concentrações séricas de marcadores inflamatórios (PCR-us e C3), maiores níveis séricos de triglicerídeos e pressão arterial sistólica elevada em comparação aos pacientes com LES e peso adequado⁹⁷. Todas as evidências até aqui destacadas demonstram que existe um perfil inflamatório no LES e na obesidade e que uma associação entre estas condições pode resultar em complicações e piores desfechos clínicos.

2.3. Tecido adiposo como órgão endócrino

O tecido adiposo é um dos principais alvos dos processos inflamatórios relacionados a obesidade e pode ser classificado em tecido adiposo branco (TAB) ou marrom (TAM)⁹⁸. O TAB é composto por adipócitos brancos responsáveis pelo armazenamento de gordura corporal e estoque energético na forma de triglicerídeos, entretanto sua função vai além do armazenamento de energia, funcionando também como um órgão endócrino⁹⁹. Por outro lado, os adipócitos marrons que compõem o TAM desempenham seu papel na termogênese, sendo crucial nos processos adaptativos de gasto energético¹⁰⁰. Uma vez enriquecidos em mitocôndrias, os adipócitos marrons são capazes de oxidar substratos para produção de energia por meio da ação das proteínas desacopladoras-1 (UCP1), que desacopla a cadeia respiratória da fosforilação oxidativa¹⁰¹. Nesse sentido, parece que os papéis do TAB e TAM são opostos entre si, já que a termogênese e o gasto energético mediados pelo TAM poderiam exercer uma função “protetora” na obesidade¹⁰¹. Ainda, é importante destacar que o tecido adiposo pode estar armazenado à nível subcutâneo ou visceral, sendo este último relacionado a processos inflamatórios mais complexos associados a comorbidades⁹⁹. De fato, a literatura demonstra que existe uma menor infiltração de células imunes e citocinas pró inflamatórias (*e.g.* IL-6, TNF- α e proteína quimiotática monocitária-1 [MCP-1]) no TAB subcutâneo em comparação ao visceral na obesidade¹⁰².

Haja vista suas funções, o TAB é o alvo do presente estudo e merece maior aprofundamento. Em situações de alta ingestão calórica, *a priori* o TAB se expande de forma fisiológica e a liberação de mediadores pró-inflamatórios é necessária para que os adipócitos previamente existentes naquele tecido sejam remodelados e novos triglicerídeos sejam acomodados, a fim de que não haja extravasamento lipídico para fora do tecido adiposo ocasionando uma possível lipotoxicidade¹⁰³. Entretanto, quando o balanço energético positivo se mantém e a obesidade se sustenta, essa resposta pró-inflamatória até então considerada fisiológica e adaptativa passa a se tornar mais complexa, caracterizando uma inflamação crônica e de baixo grau¹⁰¹. Nesse cenário, tanto o número como o tamanho das células adiposas

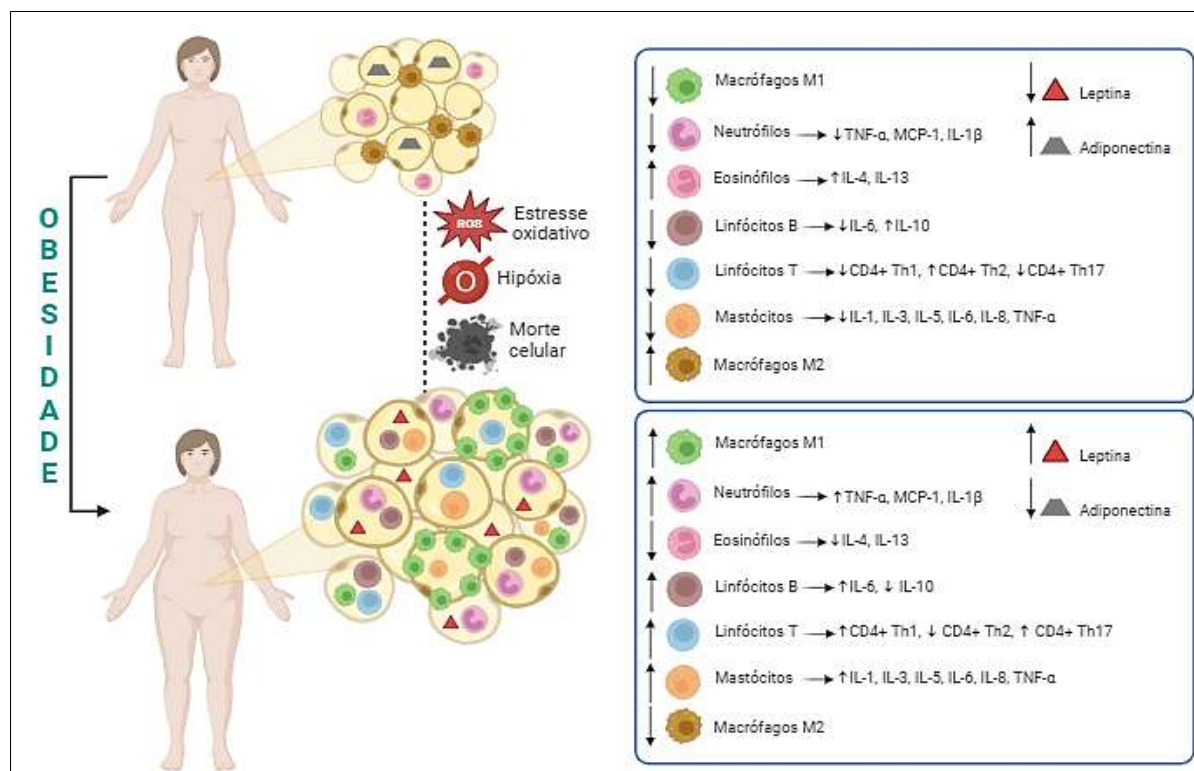
são aumentados, caracterizando os fenômenos de hiperplasia e hipertrofia dos adipócitos, respectivamente¹⁰⁴.

Assim, o estresse mecânico gerado quando existe sobrecarga da capacidade de armazenamento de triglicerídeos acarreta em remodelação inadequada do TAB na matriz extracelular, resultando em vascularização insuficiente com consequente estado de hipóxia, estresse oxidativo e morte celular dos adipócitos¹⁰⁵. Durante a resposta inflamatória, células imunes são infiltradas no TAB, principalmente macrófagos. Esse tipo celular exhibe diferentes fenótipos em resposta ao ambiente, sendo o macrófago do tipo 1 (M1) liberado em resposta a estímulos pró-inflamatórios e o macrófago do tipo 2 (M2) considerado anti-inflamatório^{106,107}. Na obesidade, ocorre uma troca de fenótipo dos macrófagos presentes no tecido adiposo do estado M2 para o M1, resultando na secreção de citocinas pró-inflamatórias (*e.g.* MCP-1, TNF- α , [IL]-1 β , 6, 17A) por meio da ativação de vias metabólicas envolvidas na resposta inflamatória, como as vias do NF- κ B e c-Jun N-terminal quinase (JNK)^{85,106,107}.

Na obesidade, os ácidos graxos livres podem ativar a via do NF- κ B por meio de receptores como o TLR4¹⁰⁸. Além disso, o estresse oxidativo resultante da hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos também pode desencadear respostas mediadas pela via do NF- κ B^{109,110}. Quando ativado, o NF- κ B é direcionado ao núcleo da célula, levando à transcrição de genes pró-inflamatórios¹⁰⁹. Da mesma maneira, a via do JNK pode ser ativada por meio do estresse do retículo endoplasmático e lipotoxicidade decorrentes do acúmulo de lipídeos nos adipócitos¹¹¹, promovendo a ativação de proteínas regulatórias e fatores de transcrição [*e.g.* STAT, receptor ativado por proliferadores de peroxissomos gama (PPAR γ)] que também aumentam a transcrição de genes pró-inflamatórios¹¹¹.

Além dos macrófagos, outras células imunes são capazes de se infiltrar no tecido adiposo, como as células T auxiliares (Th)¹¹². As células Th1, bem como as Th17, são caracterizadas por seu perfil pró-inflamatório, sendo induzidas por IFN- γ , promovendo a secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e TNF- α ¹¹². Por outro lado, as células Th2 são consideradas tipicamente anti-inflamatórias, promovendo a secreção de citocinas como as interleucinas [IL]-4, 5, 10 e 13^{98,112}. O mecanismo inflamatório presente no tecido adiposo do indivíduo com excesso de peso e obesidade está representado com detalhes na Figura 2.

Figura 2 - Mecanismo inflamatório do tecido adiposo e citocinas presentes no excesso de peso e obesidade.



Adaptado de Klaudia Antoniak *et al.*, 2021⁸⁴. No excesso de peso e obesidade, as células adiposas aumentam em número (hiperplasia) e em tamanho (hipertrofia), gerando estresse oxidativo, hipóxia dos adipócitos e até mesmo morte celular¹⁰⁴. No indivíduo com peso adequado, existe maior quantidade de macrófagos M2 e secreção de adiponectina, e menor produção de TNF-α, MCP-1, [IL]-1β, 6, 1, 3, 5, 8, células CD4+ Th1 e Th17. Por outro lado, existe maior produção de [IL]-4, 13, 10 e células CD4+ Th2. No excesso de peso e obesidade, existe uma maior quantidade de macrófagos M1, maior concentração de leptina e menor produção de [IL]-4, 13, 10 e células CD4+ Th2, enquanto a produção de TNF-α, MCP1, [IL]- 1β, 6, 1, 3, 5, 8, células CD4+ Th1 e Th17 é maior. As células envolvidas na produção das citocinas são neutrófilos, eosinófilos, mastócitos e linfócitos B e T em sua maioria⁸⁴. ↑: mais/maior; ↓: menos/menor; IL: interleucina; MCP-1: Proteína Quimiotática Monocitária 1; TNF: fator de necrose tumoral; CD4+: células CD4+; Th: células T auxiliares.

A leptina é uma adipocina secreta pelo tecido adiposo e conhecida principalmente por seus efeitos na regulação da ingestão alimentar e gasto energético à nível cerebral, mais especificamente no hipotálamo^{113,114}. Sua principal função se resume na capacidade de induzir o gasto energético e diminuir o apetite. Quando os níveis de lipídeos estão aumentados nos adipócitos, a leptina envia ao cérebro sinais de que existem reservas suficientes de energia, inibindo o apetite^{115,116}. Naturalmente, o aumento sustentado dos níveis de lipídeos nos adipócitos faz com que os níveis circulantes de leptina sejam mais elevados. De fato, a literatura demonstra de forma clara que à medida que a adiposidade aumenta, as concentrações séricas de leptina também aumentam¹¹⁷. Nesse sentido, parece que a leptina passa a não exercer sua função de maneira efetiva e um estado de resistência à sua ação passa a ser investigado, resultando em maiores sinais de apetite e maior ingestão energética^{118,119}. De forma geral, os

mecanismos por trás da resistência à leptina ainda não foram totalmente esclarecidos, entretanto o mecanismo mais abordado na literatura se refere aos efeitos de saturação do receptor de leptina devido ao excesso de leptina circulante, acarretando em perda de função e contribuindo para uma série de disfunções metabólicas associadas à obesidade^{99,120}.

Além da leptina, a adiponectina também é secretada pelos adipócitos. Esta adipocina está relacionada a desfechos anti-inflamatórios e diversos estudos demonstram a sua ação na sensibilidade à insulina¹¹³. É importante destacar que as concentrações de adiponectina estão inversamente relacionados com os níveis de gordura corporal e ganho de peso, ou seja, à medida que a quantidade de gordura corporal e/ou peso aumentam, os níveis de adiponectina tendem a diminuir^{121,122}. Nesse contexto, fica claro que a expressão da adiponectina no tecido adiposo branco é diminuída em condições inflamatórias, como na obesidade⁸⁴. Uma síntese do mecanismo de ação da leptina e adiponectina pode ser observada na Figura 3.

Figura 3 - Ação da leptina e adiponectina no indivíduo com ou sem excesso de peso/obesidade.

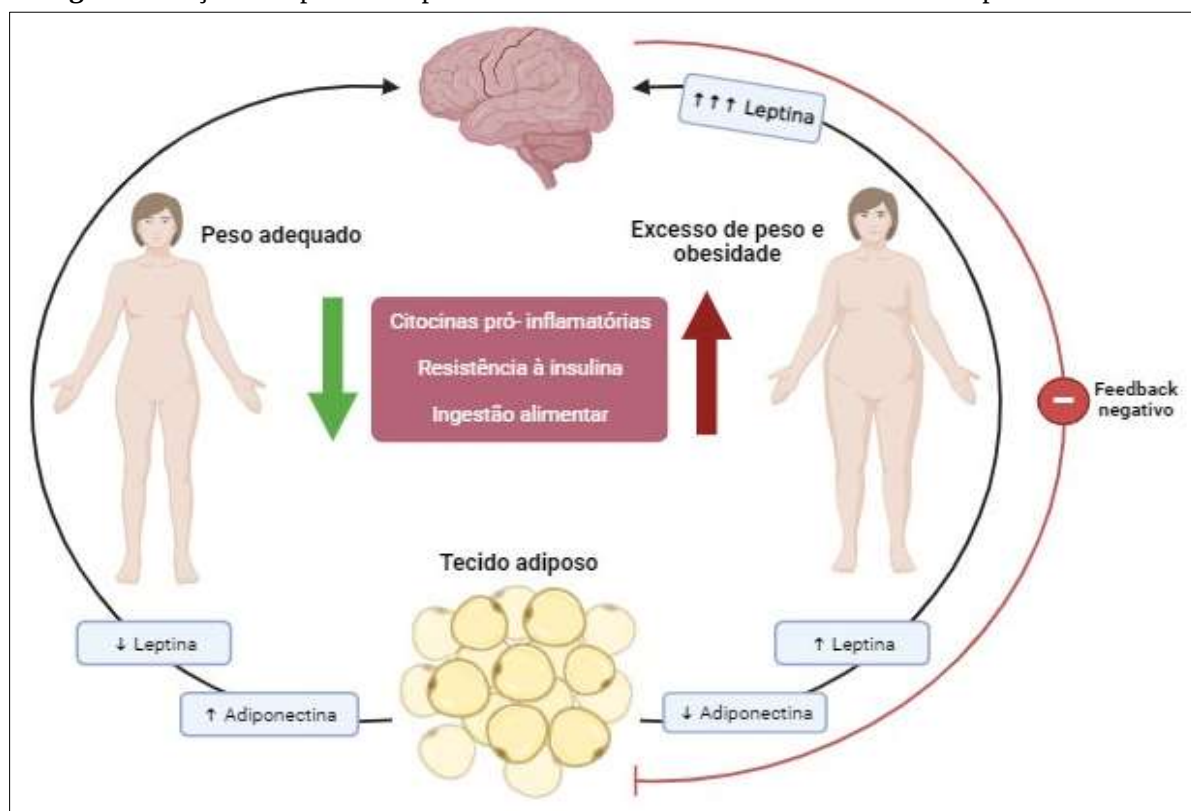


Imagem de própria autoria. A leptina e adiponectina são adipocinas secretadas pelo tecido adiposo com diferentes funções. A leptina tem seu papel estabelecido na regulação da ingestão alimentar e gasto energético. Quando os níveis de gordura estão aumentados nos adipócitos, a leptina envia ao cérebro sinais de que existem reservas suficientes de energia, garantindo ao indivíduo a sensação de saciedade. No indivíduo com excesso de peso e obesidade, a expressão de leptina é aumentada no tecido adiposo e, devido ao ambiente inflamatório metabolicamente desfavorável, o acúmulo de leptina pode resultar em um *feedback* negativo e resistência à sua ação a nível hipotalâmico^{115,116}. A ação da adiponectina está relacionada a sensibilidade à insulina e seus níveis se relacionam inversamente aos níveis de gordura corporal^{121,122}. ↑: mais/maior; ↓: menos/menor.

2.4. Mecanismos epigenéticos e metilação do DNA

A epigenética consiste em alterações estruturais e bioquímicas reversíveis da cromatina sem que a sequência do DNA seja alterada, sendo capaz de regular a expressão gênica com configurações repressiva ou permissiva transcricionalmente¹²³. A metilação do DNA, as modificações de histonas (*e.g.* metilação, acetilação, ubiquitinação) e a expressão de RNA não codificantes são os mecanismos epigenéticos mais amplamente estudados^{124–126}. Uma vez que tais mecanismos controlam diversos processos fisiológicos, uma desregulação da maquinaria epigenética pode implicar na patogênese de um número crescente de doenças, como a obesidade^{125,126} e o LES^{9,123,127}.

A metilação do DNA consiste na adição de grupos metil (CH₃) na posição carbono-5 da citosina, geralmente em sítios 5-C-Fosfato G-3 (CpG), pelas enzimas DNMTs^{12,127}. Este mecanismo (Figura 4), quando em regiões promotoras de genes, acarreta em uma repressão transcricional (“silenciamento do gene”)¹²⁸. Dessa maneira, a hipermetilação do DNA pode silenciar genes, da mesma forma que a hipometilação do DNA pode ativá-los transcionalmente¹²⁹.

Figura 4 - Processo de metilação do DNA.

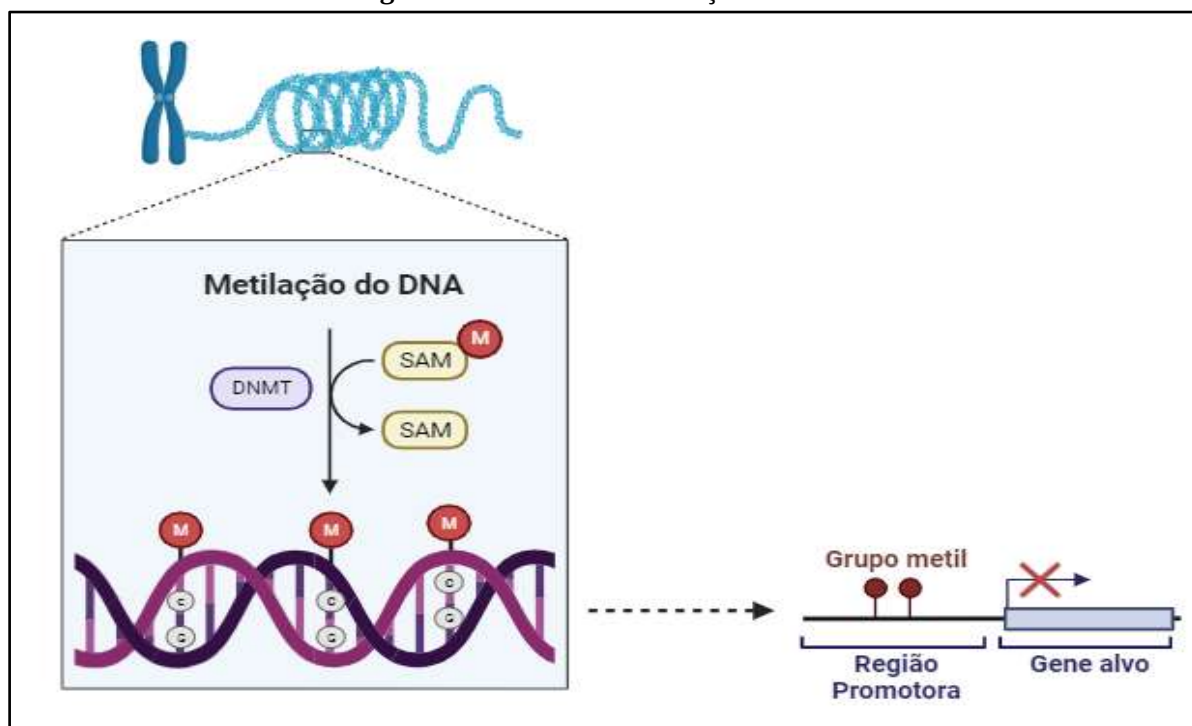


Imagem de própria autoria. A metilação do DNA ocorre quando a SAM doa um grupo metil (CH₃) para a DNMT, que adiciona este grupo na posição carbono-5 da citosina. Este mecanismo regula a expressão gênica ao reprimi-la transcionalmente (“silenciamento do gene”)^{12,127}. DNMT: DNA metiltransferase; SAM: S-adenosilmetionina; M: grupo metil.

Dentre a família das enzimas DNMTs, a DNMT1, DNMT3A e DNMT3B são as mais conhecidas e com funções bem estabelecidas na literatura^{130,131}. A classe das DNMTs3 tem por função transferir o grupo metil da coenzima SAM para o resíduo de citosina não metilado do DNA, sendo responsável por novos padrões de metilação durante a replicação, sem que seja necessária a existência de um DNA previamente metilado¹³⁰. Por outro lado, a DNMT1 (também conhecida como DNMT de manutenção) transfere grupos metil para citosina hemimetilada¹³¹, promovendo a manutenção do padrão de metilação do DNA e a memória epigenética durante a replicação celular^{131,132}. A literatura demonstra que a DNMT1 é a maior proteína da família DNMT¹³⁰, sendo a primeira identificada com atividade de DNA metiltransferase em mamíferos¹³¹.

Muitos são os fatores que podem regular o processo de metilação do DNA, tais como dieta, agressões externas (*e.g.* radiação ultravioleta [U.V.], tabagismo, exposição a metais)¹³³ e modificadores genéticos (*e.g.* variantes genéticas, condições genéticas hereditárias)^{128,134,135}, seja alterando os substratos para que as reações aconteçam ou codificando a expressão das DNMTs^{128,133}.

2.5. Metilação do DNA no LES e obesidade

De modo geral, a literatura que avalia o perfil de metilação do DNA em células T CD4+ de pacientes com LES é vasta; entretanto, diversas evidências demonstraram um perfil de hipometilação do DNA tanto no genoma como um todo (hipometilação global)^{136,137}, como em genes específicos, principalmente aqueles relacionados à cascata inflamatória e de autoimunidade¹³⁸⁻¹⁴⁰. Um estudo no qual foi conduzida uma análise ampla do perfil de metilação do DNA de células T CD4+ encontrou 341 sítios CpGs diferentemente metilados entre pacientes com LES e controles saudáveis, sendo que 236 sítios CpGs encontravam-se hipometilados nos portadores da doença. Tais CpGs localizavam-se em genes relacionados às vias da autoimunidade e ao metabolismo de infecções virais¹⁴¹. Em adição, um ensaio experimental conduzido com mulheres com LES e controles saudáveis demonstrou menores níveis de metilação do DNA nas regiões promotoras dos genes *IL-10* e *IL-13* nas células T CD4+, sugerindo que a hipometilação do DNA leva a uma superexpressão de *IL-10* e *IL-13* em pacientes com LES¹³⁸. Vale relembrar que o aumento da expressão de *IL-10* nas células T promove a atividade das células B no LES, o que contribui com a autoimunidade, produção de citocinas pró-inflamatórias e consequente dano tecidual^{142,143}.

Outro ensaio clínico incluindo 80 pacientes com LES (59 mulheres e 21 homens) e 77 controles saudáveis (57 mulheres e 20 homens) demonstrou um perfil de hipometilação do gene metaloproteinase de matriz 9 (*MMP9*) na análise de células mononucleares do sangue periférico¹⁴⁰. Uma vez que estudos anteriores associaram níveis elevados de *MMP9* a piores desfechos no LES (como nefrite lúpica e neuropatia periférica)^{144,145}, o estudo em questão sugeriu que o padrão de hipometilação identificado na região promotora do gene *MMP9* poderia estar associado a descobertas importantes frente às manifestações clínicas típicas do LES¹⁴⁰. Por fim, um ensaio clínico conduzido com 20 pacientes com LES e 10 controles saudáveis (sendo a maioria dos voluntários do sexo feminino) investigou o os níveis de metilação do DNA dos genes *IL-4* e *IL-6* em células T isoladas e ativadas (*in vitro*) na presença ou ausência de um “inibidor de metilação” (5-azacitidina). Os autores observaram um perfil de hipometilação das ilhas CpG nos promotores de *IL-4* e *IL-6* semelhante entre os pacientes com LES e as células tratadas com 5-azacitidina. Uma vez que as interleucinas *IL-4* e *IL-6* estão diretamente relacionadas à patogênese do LES pelo seus papéis na diferenciação de células B e que níveis séricos de *IL-6* se associam ao perfil inflamatório característico do LES, o perfil de hipometilação encontrado foi associado a uma maior atividade da doença¹³⁹.

Ressalta-se que as causas da hipometilação associada ao LES ainda não foram totalmente elucidadas, entretanto uma expressão diminuída das DNMTs, sobretudo da DNMT1, tem sido associada a redução da metilação global do DNA de células imunes no LES^{127,146}. Um estudo conduzido com 34 pacientes com LES e 23 controles saudáveis (maioria mulheres) demonstrou que pacientes com LES apresentaram menores níveis de mRNA de DNMT1 do que os controles, ao passo que não foram observadas correlações entre o nível de mRNA de DNMT1 e o índice de atividade da doença do LES. Ainda, os achados indicaram que os pacientes com LES apresentaram um perfil de hipometilação global do DNA em comparação aos controles e que o perfil de metilação global foi inversamente associado ao índice de atividade da doença, sugerindo que a menor expressão de DNMT1 pode desempenhar um papel importante na patogênese do LES¹⁴⁷.

No contexto da obesidade, diversos estudos visaram investigar a influência dos padrões epigenéticos em sua fisiopatologia, com resultados conflitantes^{148–150}. Embora os estudos sugeriram existir um perfil de DNA predominantemente hipermetilado associado a obesidade^{149–151}, sítios CpGs hipometilados também foram identificados em indivíduos com obesidade e relacionados com perfil metabólico^{149,150}.

Um ensaio envolvendo 96 jovens afro-americanos de ambos os sexos avaliou o perfil de metilação do DNA de sangue periférico por meio do equipamento *Beadchip Infinium*

Human Methylation 450K (Illumina). Como resultado, vários locais CpG diferentemente metilados foram identificados entre os indivíduos com obesidade e com peso adequado, sendo a maioria dos sítios CpGs caracterizados por um padrão de hipermetilação nos indivíduos com obesidade. Destaca-se que tais sítios CpGs localizavam-se em genes relacionados as vias metabólicas da própria obesidade, hipertensão arterial, dislipidemia, DM2 e alguns tipos de câncer, apoiando a hipótese de que alterações na metilação do DNA podem influenciar na patogênese da obesidade e distúrbios metabólicos associados¹⁴⁹. Nesse sentido, outro estudo com mesma metodologia mostrou um total de 9.371 sítios CpGs diferentemente metilados entre indivíduos com obesidade e peso adequado, sendo 7.974 deles hipermetilados e 1.397 hipometilados naqueles com obesidade. Os autores enfatizaram cinco genes hipermetilados em pacientes com obesidade em comparação aos controles com peso adequado, sendo eles associados à via de sinalização do cálcio, do câncer, da regulação mediadora inflamatória dos canais de receptores transientes de potencial (TRP), via de sinalização do hormônio tireoidiano e via da sinapse glutamatérgica¹⁵¹. Uma coorte europeia conduzida com mulheres gêmeas monozigóticas ou dizigóticas (IMC: $26,7 \pm 4,9 \text{ kg/m}^2$) ao investigar níveis de metilação do DNA no tecido adiposo evidenciou uma correlação positiva entre os níveis de metilação da cg22891070 no fator 3 induzível por hipóxia A (*HIF3A*) e o IMC, sugerindo que o aumento do IMC pode estar associado ao aumento da metilação do gene *HIF3A* no tecido adiposo, gene este associado a adaptação celular à hipóxia¹⁵⁰.

Atualmente não existem fármacos disponíveis que consigam reverter o perfil de hipometilação ou hipermetilação do DNA e, nesse sentido, surge uma maior necessidade de investigar este fenômeno sob um olhar clínico de forma que padrões de metilação alterados sejam modulados e terapias direcionadas às células que expressam genes modificados sejam estabelecidas como alvos terapêuticos no LES e na obesidade^{152,153}.

2.6. Papel dos nutrientes doadores de grupo metil na metilação do DNA

Nutrientes dietéticos e compostos bioativos dos alimentos podem influenciar os mecanismos epigenéticos, inibindo as enzimas que catalisam a reação de metilação do DNA ou alterando a disponibilidade dos substratos utilizados nessas reações enzimáticas^{17,18}. Nesse sentido, uma relação entre o *status* de nutrientes doadores de grupo metil, como ácido fólico, vitamina B12, colina, metionina, betaína, com o perfil de metilação do DNA têm sido cada vez mais evidenciada¹⁸. De fato, estudos em humanos e animais demonstraram que a baixa ingestão ou deficiência desses micronutrientes estavam associadas a menores níveis de metilação global

ou de genes específicos^{15,16} ou que a suplementação desses nutrientes se associava a maiores níveis de metilação do DNA^{154,155}.

Nesse cenário, estudos conduzidos em animais, humanos e estudos *in vitro* têm demonstrado o efeito da suplementação com micronutrientes doadores de grupo metil sob o perfil de metilação do DNA em diferentes populações, tecidos e condições clínicas^{156–161}. Um estudo experimental com camundongos C57BL/6 fêmeas grávidas objetivando investigar o padrão de metilação do DNA (global e em genes específicos) na prole frente ao cenário de deficiência no teor de colina da dieta materna evidenciou que uma ração deficiente em colina promoveu redução dos níveis de metilação global do DNA e do gene *Cdkn3*, o qual associou-se à via metabólica do ciclo celular¹⁶. Outro estudo *in vivo* conduzido com ratos demonstrou que a suplementação conjunta de ácido fólico, vitamina B6 e vitamina B12 foi capaz de reduzir os níveis de metilação do elemento nuclear intercalado longo (*LINE-1*) no hipotálamo¹⁵⁶.

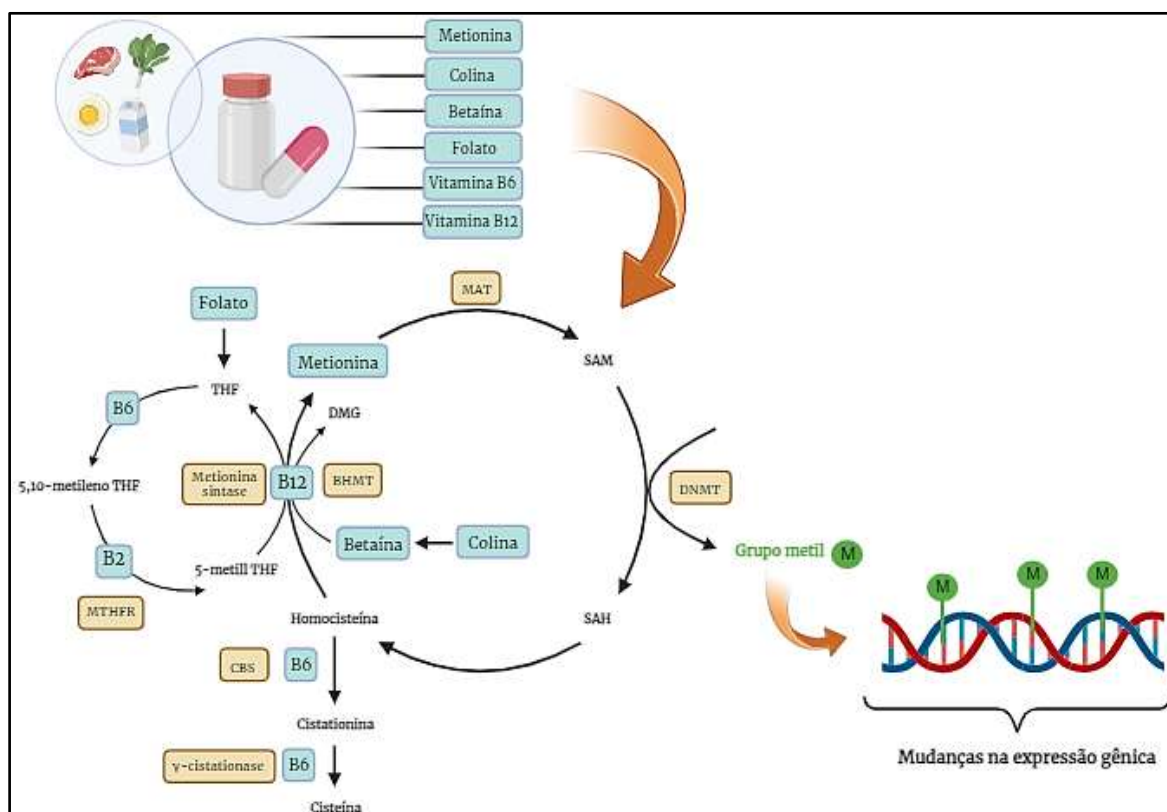
Considerando estudo com humanos, um ensaio clínico randomizado com pacientes com adenoma colorretal mostrou aumento da metilação global do DNA, tanto no sangue como na mucosa do cólon, após suplementação com 400 µg de ácido fólico durante 10 semanas¹⁵⁴. Outro ensaio clínico randomizado conduzido com 86 mulheres grávidas saudáveis demonstrou que a suplementação com 400µg de ácido fólico por 22 semanas promoveu um aumento no nível de metilação do fator de transcrição com dedos de zinco 57 (*ZFP57*) no sangue materno e do cordão umbilical¹⁵⁸. Uma revisão sistemática com meta-análise realizada pelo nosso grupo teve como objetivo identificar e sintetizar as evidências acerca da suplementação de micronutrientes doadores do grupo metil no perfil de metilação do DNA¹⁶². De forma geral, evidenciou-se que os micronutrientes podem alterar os níveis de metilação do DNA em modelos animais, humanos e até mesmo *in vitro*, contudo a suplementação com ácido fólico apenas afetou os níveis de metilação global do DNA em doses altas e muito altas em animais. Além disso, não foi possível estabelecer recomendações clinicamente concretas devido à grande heterogeneidade dos estudos que envolvem este desfecho, sobretudo no que se refere a dosagens e tempo de suplementação, genes de investigação e tecidos alvo¹⁶².

O mecanismo por trás dessa relação envolve o metabolismo de um carbono (1C), definido por um conjunto de reações metabólicas interligadas que incluem os ciclos de metionina e folato, e encarregadas pela transferência de uma unidade de carbono para processos bioquímicos (Figura 5)^{162–164}. Em síntese, o aminoácido metionina, derivado da dieta ou da remetilação da homocisteína, é transformado em SAM pela ação da enzima metionina-adenosiltransferase (MAT). A SAM, conhecida como o doador universal de grupos metil, desempenha um papel essencial nas reações de metilação, incluindo aquelas catalisadas pelas

enzimas DNMTs¹⁶⁵. Após a doação dos grupos metil, a SAM se converte em S-adenosil-homocisteína (SAH), que por sua vez é transformada em homocisteína. Durante esse processo, certos nutrientes atuam como cofatores ou doadores de grupos metil, tornando a disponibilidade de SAM sensível à ingestão insuficiente de folato, vitamina B12, vitamina B6, vitamina B2, colina, betaina e metionina^{162,166}. Nessa perspectiva, essa interação entre nutrientes e metabolismo é crucial, uma vez que distúrbios no metabolismo de 1C, seja por baixa ingestão de nutrientes doadores de grupo metil ou por polimorfismos em genes que codificam enzimas importantes, podem afetar diretamente o perfil de metilação do DNA^{167,168}.

O ácido fólico e a vitamina B12 são micronutrientes doadores do grupo metil em foco no presente estudo. A priori, vale destacar as diferenças das nomenclaturas “ácido fólico” e “folato”: enquanto o folato (ou vitamina B9) se refere ao nutriente encontrado naturalmente nos alimentos, o ácido fólico se refere à versão sintética do folato (suplementação). Assim sendo, o folato é um micronutriente crucial para o bom funcionamento dos processos celulares, incluindo síntese e metilação de DNA¹⁶⁹. Ele está presente majoritariamente em vegetais verde folhosos, nozes, feijões e alimentos fortificados (em forma de ácido fólico), como a farinha de trigo¹⁷⁰. Sua ingestão diária recomendada (RDA) é de 400 µg/dia (dieta) para homens e mulheres adultos, enquanto o nível máximo tolerável (UL) é de 1.000 µg/dia (forma fortificada)¹⁷¹. Estudos sugerem que a deficiência dietética deste micronutriente pode afetar a diferenciação das células T auxiliares¹⁷² e, além disso, causar rompimento de DNA nos linfócitos T humanos, afetando sua proliferação^{169,173}.

Como observado na Figura 5, a enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) desempenha um papel fundamental no metabolismo do folato e na síntese e metilação do DNA. A MTHFR catalisa a conversão de 5,10-metilenotetrahidrofolato (5,10-MTHF) em 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF), que é uma forma ativa de folato usada como doadora de grupos metil em várias reações bioquímicas, incluindo a metilação do DNA¹⁷³. Dessa forma, presume-se que alterações na expressão de *MTHFR* poderiam certamente influenciar o metabolismo de transferência de grupo metil no ciclo de 1C e acarretar em diferentes respostas no que se refere ao perfil epigenético de doenças como o LES.

Figura 5 - Metabolismo de 1 carbono (1C).

Adaptado de Sang-Woon Choi e Simonetta Friso, 2023¹⁶⁴. Os nutrientes doadores de grupo metil participam de uma série de vias metabólicas funcionando como cofatores de enzimas importantes no processo de metilação do DNA. A metionina dietética ou suplementada é convertida em SAM pela enzima MAT. A SAM doa seu grupo metil para outros compostos, incluindo o DNA, através da enzima DNMT. Posteriormente a SAM é metabolizada em SAH, sendo esta hidrolisada à homocisteína. A homocisteína pode seguir o caminho da transulfuração e ser metabolizada em cisteína por ação das enzimas dependentes de vitamina B6 CBS e γ -cistationase ou ser remetida a metionina novamente por ação da enzima metionina sintase dependente de vitamina B12 como cofator. Este último caminho está acoplado à redução de 5,10-metileno THF a 5-metil THF, reação esta catalisada pela enzima dependente de vitamina B2 MTHFR. O 5-metil THF transforma-se em THF ao doar seu grupo metil para a homocisteína, que por sua vez é convertida em metionina novamente. A betaina, derivada da colina dietética ou suplementada, também pode funcionar como doadora de grupo metil e atuar na conversão da homocisteína em metionina (remetilação) por uma via alternativa. Para tal, a betaina é metabolizada à DMG numa reação catalisada por enzima também dependente de vitamina B12, a BHMT^{162,166}. THF: Tetrahydrofolato; B6: Vitamina B6; 5,10-metileno THF: 5,10-metileno tetrahydrofolato; B2: Vitamina B2; MTHFR: Metileno-tetrahydrofolato redutase; 5-metil THF: 5-metil tetrahydrofolato; CBS: Cistationina-beta-sintetase; B12: Vitamina B12, DMG: Dimetilglicina; BHMT: Betaína-homocisteína metiltransferase; MAT: Metionina-adenosiltransferase; SAM: S-adenosil-metionina; SAH: S-adenosil-homocisteína; DNMT: DNA metiltransferase.

A vitamina B12, ou cobalamina, é naturalmente encontrada em alimentos de origem animal, como em carnes, aves, peixes, ovos, leite e demais produtos lácteos¹⁷⁴. Alguns alimentos fortificados com vitamina B12, como os cereais matinais, também estão disponíveis para consumo¹⁷⁵. Sua ingestão diária recomendada (RDA) é de 2,4 $\mu\text{g}/\text{dia}$ para homens e mulheres adultos e o nível máximo tolerável (UL) ainda não foi estabelecido para esse nutriente^{171,175}. Esta vitamina atua diretamente na regulação da metilação do DNA por meio do

metabolismo de 1C¹⁷¹. Um estudo conduzido em modelo murino demonstrou que sua deficiência induziu um estado de hipometilação global do DNA mesmo quando combinada ao folato. Este resultado sugere que talvez o consumo de outros micronutrientes doadores do grupo metil possa não “compensar” a deficiência da vitamina B12 no que se refere ao perfil de metilação do DNA¹⁶⁹. Tanto a deficiência de ácido fólico como a de vitamina B12 podem trazer severas consequências, como hiperhomocisteinemia e danos ao DNA¹⁷⁰.

Em vista disso, a nutrição de precisão surge como uma importante área da pesquisa nutricional focada na individualidade em resposta a intervenções dietéticas e mudanças no estilo de vida^{17,176}. Atualmente, a nutrição de precisão se direciona principalmente ao estudo do genoma e microbioma intestinal, ao passo que o epigenoma (metilação do DNA) ainda carece de profundidade científica¹⁷⁷. Nesse sentido, estratégias nutricionais baseadas na suplementação com micronutrientes doadores de grupo metil parecem desempenhar um papel fundamental na modulação do perfil de metilação do DNA^{162,178}.

Assim, a hipótese do presente estudo é de que a suplementação com micronutrientes doadores de grupo metil (ácido fólico e vitamina B12) é capaz de modular o perfil de metilação do DNA no tecido adiposo de mulheres com LES com peso adequado ou com excesso de peso e que essa modulação ocorre diferentemente de acordo com o estado nutricional.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo primário

Avaliar se a suplementação com ácido fólico e vitamina B12 é capaz de modular o perfil de metilação do DNA no tecido adiposo de pacientes com LES com peso adequado ou com excesso de peso e se essa modulação é diferente de acordo com o estado nutricional.

3.2. Objetivos secundários

Em pacientes com LES com peso adequado ou excesso de peso, avaliar antes e após protocolo de suplementação com ácido fólico e vitamina B12:

- Medidas antropométricas e de composição corporal;
- Perfil metabólico;
- Expressão dos genes *DNMT1*, *STAT3*, *MTHFR*, *IL-6*, *TNF- α* , *LEP* e *ADIPOQ* no tecido adiposo.

Pacientes e Métodos

4. PACIENTES E MÉTODOS

4.1. Aspectos éticos e local do estudo

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

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) (CAAE.: 47317521.8.0000.0068). As pacientes consideradas elegíveis foram informadas sobre todos os detalhes do projeto e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO A).

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Avaliação e Condicionamento em Reumatologia (LACRE) do HC-FMUSP e no Centro de Medicina do Estilo de Vida da FMUSP (LIM 17; sala 3148).

4.2. Seleção e recrutamento das pacientes

As participantes foram recrutadas no Ambulatório de Lúpus Adulto da Divisão de Reumatologia do HC-FMUSP. As pacientes foram consideradas elegíveis se atendessem aos seguintes critérios de inclusão: 1) diagnóstico de LES; 2) sexo feminino; 3) período pré-menopausa; 4) idade entre 18 e 45 anos; 5) que atendessem aos critérios de classificação de SLICC⁶⁴; 6) com pontuação SLEDAI ≤ 4 ; 7) em tratamento com prednisona em uma dosagem < 10 mg/dia; 8) em tratamento com hidroxicloroquina em dose estável e 9) com IMC $> 18,5$ kg/m². Pacientes envolvidas em programas de treinamento físico e/ou dietas não foram consideradas elegíveis para a participação no estudo. Os critérios de exclusão adotados foram: diabetes mellitus, hipertensão arterial, tabagismo, uso de anticoagulantes, uso de metotrexato, infecção atual, outras doenças autoimunes, gravidez suplementação com vitamina B12, ácido fólico ou similares.

Uma vez que o gênero feminino é um forte contribuinte para a fisiopatologia do LES e que a presença de um segundo cromossomo X nas mulheres contribui para o aumento da prevalência de LES^{179–181}, optou-se pela inclusão somente de pacientes do sexo feminino. Além disso, os hormônios estrogênicos podem influenciar os mecanismos epigenéticos e, por esse motivo, foram selecionadas apenas mulheres na pré-menopausa. Além disso, uma vez que a metilação global do DNA é reduzida em idosos¹⁸², optou-se por selecionar apenas mulheres

em uma faixa etária estabelecida.

Considerando os efeitos das drogas antirreumáticas na metilação do DNA, estipulou-se como critérios de inclusão o uso de prednisona em doses menores que 10 mg/dia e o uso de hidroxicloroquina em dose estável. Não foram incluídas pacientes que fizessem uso de metotrexato, uma vez que este fármaco atua inibindo a absorção do ácido fólico¹⁸³. Por fim, não foram incluídas pacientes que fizessem uso de anticoagulante a fim de se evitar possíveis riscos no procedimento de biópsia, como sangramento excessivo e/ou falha na cicatrização¹⁸⁴.

Por meio da análise dos prontuários eletrônicos individuais (Prontmed®) implementados no sistema interno do referido hospital, as pacientes potencialmente elegíveis foram identificadas e convidadas a participar do estudo. O convite foi realizado pessoalmente durante a espera nas consultas, por mensagens de texto ou chamadas telefônicas.

De acordo com recomendações recentes^{185,186}, os seguintes fatores foram levados em consideração para determinar o tamanho da amostra: (a) número de pacientes potencialmente elegíveis no referido serviço ambulatorial, (b) capacidade da equipe de pesquisa, e (c) disponibilidade de recursos e tempo para conduzir o presente estudo. Assim, a análise de viabilidade desses fatores em conjunto permitiu a inclusão mínima de 40 pacientes no total (20 pacientes em cada grupo).

4.3. Desenho experimental

Trata-se de um ensaio clínico randomizado duplo-cego. Primeiramente, as pacientes foram divididas em dois grupos de acordo com a classificação do estado nutricional segundo o IMC. O grupo eutrofia (EUT) incluiu pacientes com LES e peso adequado (IMC entre 18,5 e 24,9 kg/m²) e o grupo excesso de peso (EP) incluiu pacientes com LES e excesso de peso (IMC $\geq$ 25 kg/m²). Posteriormente, as pacientes de cada grupo foram randomizadas a receber suplementação de mix de vitaminas ou placebo. A randomização (1:1, em blocos de 2) foi feita de maneira eletrônica pela plataforma *Random* (random.org). Ao final, obteve-se quatro grupos como descrito abaixo.

- Grupo EUT controle: pacientes com LES e peso adequado que receberam placebo;
- Grupo EP controle: pacientes com LES e excesso de peso que receberam placebo;
- Grupo EUT suplementado: pacientes com LES e peso adequado que receberam suplementação de vitamina B12 e ácido fólico;
- Grupo EP suplementado: pacientes com LES e excesso de peso receberam

suplementação de vitamina B12 e ácido fólico.

O período de intervenção foi de 3 meses. Em ambos os períodos (pré e pós), as pacientes se apresentaram ao laboratório pela manhã seguindo um jejum noturno de 12 horas. Em ambos os períodos, as pacientes foram avaliadas antes e após suplementação por meio de uma extensa bateria de desfechos relacionados aos objetivos propostos, incluindo amostras de sangue e coleta de tecido adiposo subcutâneo (TAS). As amostras de TAS foram utilizadas para análises dos níveis de metilação do DNA e de expressão gênica e as amostras de sangue foram utilizadas para análises inflamatórias e metabólicas. Parâmetros antropométricos e de ingestão alimentar também foram avaliados. Os parâmetros clínicos da doença (idade de início, duração da doença desde o diagnóstico, dose de medicamentos e índice de atividade da doença) foram obtidos por meio de revisão de prontuário e anamnese pessoal (APÊNDICE A). A Figura 6 mostra o desenho experimental do estudo.

Este estudo foi desenhado de acordo com as recomendações do grupo de testes de padrões consolidados de relatórios (CONSORT), e foi registrado em clinicaltrials.gov (nº.: NCT05097365) antes do início.

Figura 6 - Desenho experimental.

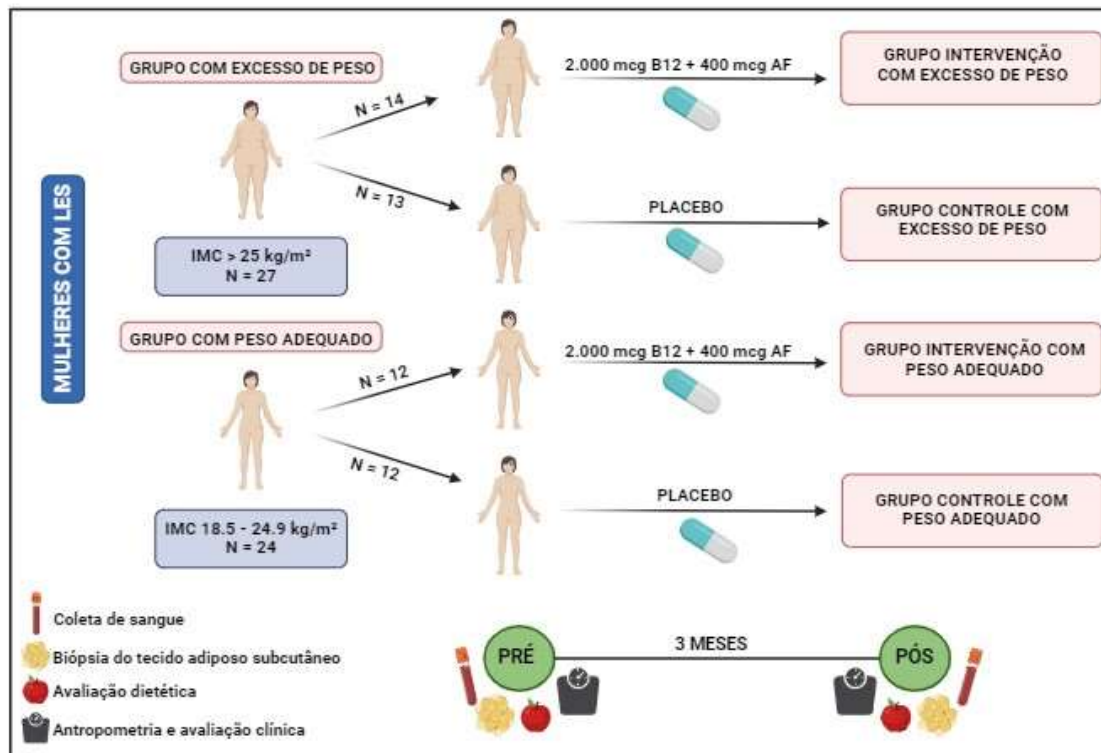


Figura de própria autoria. LES: lúpus eritematoso sistêmico; IMC: Índice de massa corporal; N: número de pacientes; mcg: microgramas; B12: vitamina B12; AF: ácido fólico.

4.4. Suplementação de ácido fólico e vitamina B12

As pacientes foram aleatoriamente designadas a receber uma dose oral diária de um mix de vitaminas (400 mcg de ácido fólico e 2.000 mcg de vitamina B12) ou um placebo indistinguível em termos de sabor, cheiro e aparência, durante 3 meses. As dosagens de ácido fólico e vitamina B12 foram definidas respeitando os valores pré-estabelecidos de RDA e UL e de acordo com a literatura anterior cuja intervenção foi a suplementação com micronutrientes doadores de metil para análise de metilação do DNA¹⁶². A identificação cega dos frascos com as referidas cápsulas (suplemento ou placebo) foi realizada por uma única pesquisadora não pertencente ao estudo, com cada número (1 ou 2) correspondendo a um grupo de tratamento (intervenção ou placebo) (Figura 7).

No momento do encontro com as pacientes (período pré) foram entregues três frascos contendo 35 cápsulas/cada. As pacientes foram aconselhadas a ingerir uma cápsula por dia, pela manhã, durante 3 meses. Durante todo o período do protocolo de suplementação as pacientes foram contatadas por telefone semanalmente e estimuladas a fazerem anotações para que não houvesse esquecimento da ingestão das cápsulas. Ainda, para que houvesse um maior controle, as pacientes foram orientadas a levar os frascos ao laboratório na visita de retorno (período pós). Nesse período, foi realizada uma contagem da quantidade de cápsulas remanescentes ao final da intervenção. Por fim, as participantes foram instruídas a não alterarem o padrão alimentar ou o nível de atividade física e a não incluir ou excluir qualquer atividade ou comportamento que pudesse culminar em perda ou ganho de peso.

Figura 7 - Frascos contendo suplementação ou placebo.

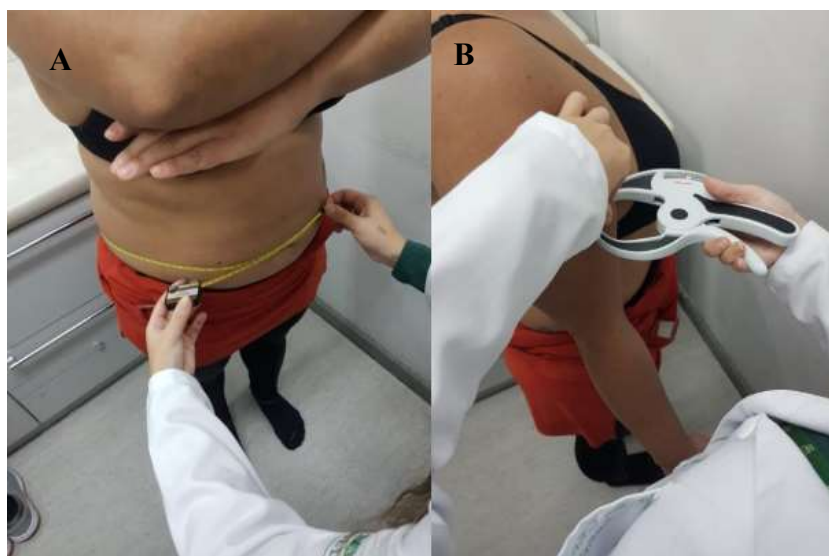


4.5. Avaliação antropométrica e composição corporal

A estatura foi aferida por um estadiômetro de parede com graduação de 0,5 cm. Para tal, as pacientes ficaram descalças, com os calcanhares juntos, as costas retas e os braços estendidos ao longo do corpo. O peso foi aferido com o auxílio de uma balança digital, com capacidade de 300 kg e sensibilidade de 100 gramas. No momento da medição as pacientes ficaram descalças e com roupas leves. O IMC foi calculado usando a seguinte equação: $\text{peso (kg)}/\text{altura}^2(\text{m})$. A circunferência abdominal foi aferida com fita plástica extensível com graduação de 0,1 mm posicionada na mesma linha da cicatriz umbilical com as pacientes em pé. Todas as medições foram realizadas pelo mesmo pesquisador (Figura 8).

A composição corporal (massa livre de gordura e massa gorda) foi estimada por meio da aferição de dobras cutâneas (DC), sendo elas: tricipital, bicipital, subescapular e suprailíaca. As equações preditivas de *Durnin e Siri*^{187,188} foram utilizadas como referência para a realização dos cálculos dentro da plataforma nutricional *Web Diet*®.

Figura 8 - Aferição das medidas antropométricas.



A: Aferição de circunferência abdominal; B: Aferição de dobra cutânea bicipital.

4.6. Análise da ingestão alimentar

Em cada período do estudo (pré e pós), três recordatórios alimentares de 24 horas (R24h) foram aplicados a cada paciente. Tais R24h foram realizados em dias alternados, englobando um dia de final de semana. O primeiro R24h foi realizado no dia da coleta de dados e os outros dois via ligação telefônica. A ingestão alimentar foi avaliada por uma média entre os três R24h.

No que se refere a análise quantitativa, a ingestão energética [valor energético total (VET)], quantidade de macronutrientes (proteínas, carboidratos e lipídios), ácido fólico, vitamina B12 e o número de refeições realizadas ao longo do dia foram obtidos e calculados por meio da plataforma de cálculos nutricionais *Dietbox*®.

Ainda, foi realizada uma análise qualitativa da ingestão alimentar quanto ao nível de processamento dos alimentos. Os alimentos e preparações consumidos pelas pacientes foram divididos e desmembrados de acordo com a recomendação NOVA de nível de processamento dos alimentos¹⁸⁹: 1) *In natura* ou minimamente processados; 2) Processados; 3) Ultraprocessados e 4) Ingredientes culinários. Após a divisão, as refeições foram inseridas no *Dietbox*® de forma a obter o valor energético de cada grupo/nível de processamento e a porcentagem de cada grupo em relação ao VET.

4.7. Questionário Internacional de Atividade Física (IPAQ)

O Questionário Internacional de Atividade Física (*IPAQ Short Form Version 2.0. April 2004*) foi aplicado pessoalmente em ambos os períodos (APÊNDICE B). Para análise, foi utilizada a soma dos minutos despendidos na realização de atividades físicas durante a semana de acordo com as normativas do IPAQ, que usa como critérios de avaliação a prática de: 1) atividades moderadas por pelo menos 10 minutos contínuos (pedalar leve na bicicleta, nadar, dançar, jogar vôlei recreativo, carregar pesos leves, fazer serviços domésticos na casa, no quintal ou no jardim como varrer, aspirar, cuidar do jardim, ou qualquer atividade que aumente moderadamente a respiração ou batimentos cardíacos) e 2) atividades vigorosas por pelo menos 10 minutos contínuos (correr, fazer ginástica aeróbica, jogar futebol, pedalar rápido na bicicleta, jogar basquete, fazer serviços domésticos pesados em casa, no quintal ou cavoucar no jardim, carregar pesos elevados ou qualquer atividade que aumente muito a respiração ou batimentos cardíacos)^{190,191}.

4.8. Coleta de amostra de sangue periférico e análises metabólicas

Após jejum de 12 horas, amostras de sangue periférico foram coletadas por profissional qualificado em dois tubos contendo gel separador e em dois tubos contendo anticoagulante etilenodiamina tetra acética ácida (EDTA) (Figura 9). Imediatamente após a coleta as amostras foram armazenadas em recipiente com gelo. A coleta de sangue teve risco mínimo (Categoria 2; 45 CFR 46.110).

Figura 9 - Coleta de sangue periférico.



Concentrações séricas de glicose, colesterol total e frações [lipoproteína de baixa densidade (LDL-c), lipoproteína de alta densidade (HDL-c) e não-HDL-c], triglicerídeos, proteína C reativa (PCR), ácido fólico e vitamina B12 foram analisadas no Laboratório Central do HC-FMUSP. Para tal, as amostras foram cadastradas conforme o sistema de identificação do laboratório central e levadas até o mesmo para seu respectivo processamento.

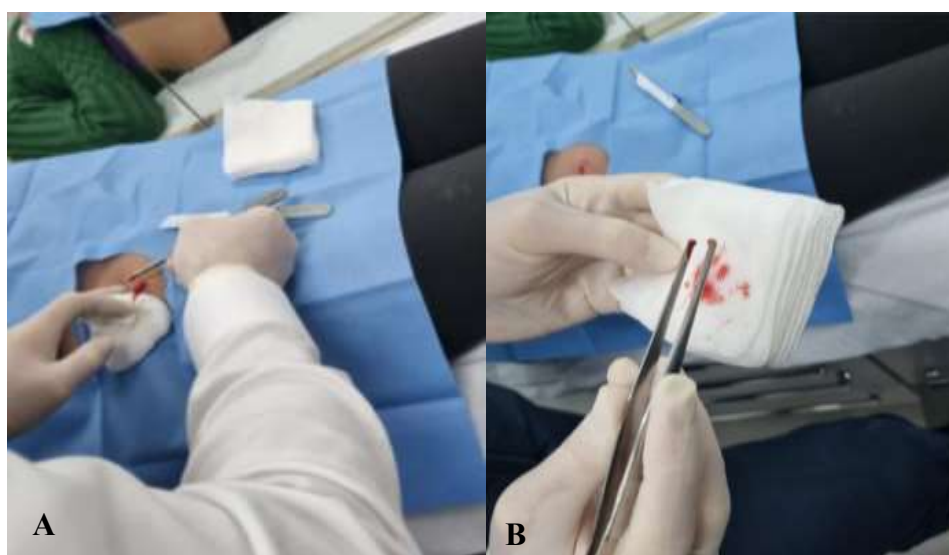
O restante das amostras coletadas foi conduzido para as dependências dos laboratórios da FM-USP, no qual foram centrifugadas a 3000 rpm, por 15 minutos, para a separação do plasma e este foi então armazenado a -80°C . Posteriormente, concentrações séricas de leptina, adiponectina e [IL]-2, 6, 17A e TNF- α foram avaliadas com utilização dos kits comerciais *MILLIPLEX MAP Human Adipocyte Magnetic Bead Panel - Endocrine Multiplex Assay* e *MILLIPLEX® Human Cytokine/Chemokine/Growth Factor Panel A - Immunology Multiplex Assay* (Millipore, Missouri, EUA) em um analisador Luminex® (Luminex®, MiraiBio, EUA) de acordo com instruções do fabricante. Por fim, os dados obtidos foram normalizados e expressos pelo software *Milliplex Analyst 5.1* (EMD Millipore).

4.9. Coleta de tecido adiposo subcutâneo

Para análise dos níveis de metilação do DNA e de expressão gênica, foram coletados dois gramas de TAS abdominal. Para tanto, o procedimento de biópsia foi realizado na região acima da cicatriz umbilical superior direita de cada paciente sempre pela mesma equipe médica habilitada (Figura 10). Após toda a limpeza e assepsia do local, o profissional aplicou uma

dosagem de aproximadamente 5 mL de cloridrato de lidocaína para anestesia local. Com a paciente sem dor e devidamente anestesiada, uma incisão de aproximadamente 1,5 cm foi feita com o auxílio do bisturi. A retirada e corte do TAS foram realizados com auxílio de pinça e bisturi. A incisão foi fechada de forma não-invasiva por meio de sutura cutânea adesiva. Imediatamente após o procedimento de biópsia, metade da amostra do TAS coletado foi inserida em tubo criogênico para posterior extração de DNA. A outra metade da amostra foi conservada em tubo criogênico com 1,0 mL do composto TriZol® para posterior extração de RNA. Ambas as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C.

Figura 10 - Procedimento de biópsia do tecido adiposo subcutâneo.



A: Incisão para coleta do tecido adiposo subcutâneo; B: Amostra de tecido adiposo subcutâneo.

4.10. Análises de metilação do DNA

4.10.1. Extração de DNA de tecido adiposo

O DNA do tecido adiposo foi extraído utilizando o kit *QIAamp DNA Blood Kit* (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante. A concentração e a pureza do DNA foram determinadas por espectrofotometria utilizando *Nano Vue Plus*. 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.

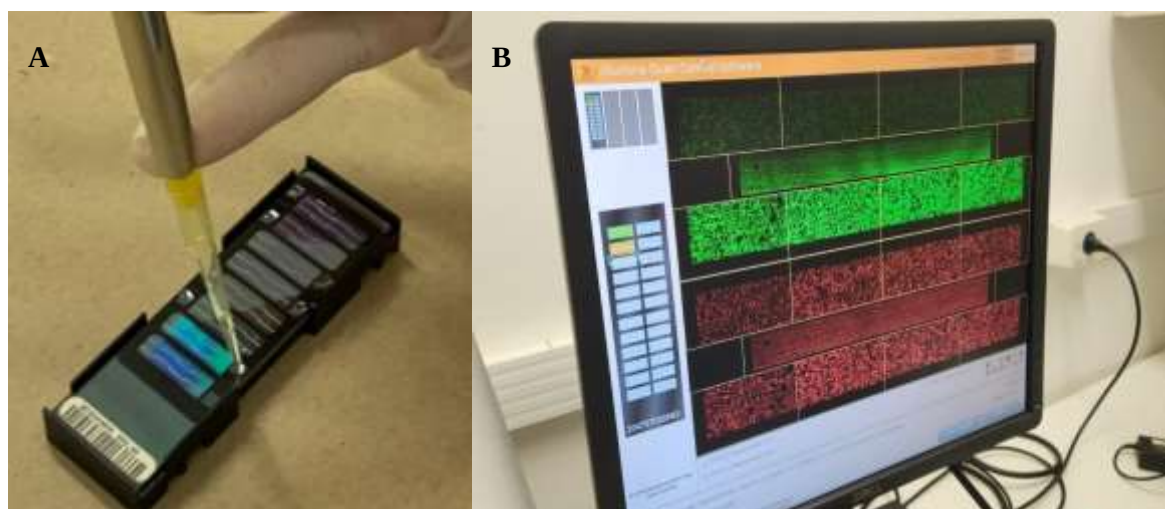
4.10.2. Tratamento com bissulfito de sódio

O DNA (500 ng) foi tratado com bissulfito de sódio e purificado utilizando o kit *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.

4.10.3. Ensaio dos níveis de metilação do DNA

O DNA tratado com bissulfito de sódio foi usado para hibridização na plataforma *Infinium Human Methylation EPIC Beadchip* (Illumina, San Diego, CA) de acordo com o protocolo do fabricante (*Infinium HD Assay Methylation Protocol Guide, Illumina*). Primeiramente, o DNA foi submetido a um processo de desnaturação e neutralização, seguido de amplificação isotérmica. O produto amplificado passou por um processo de fragmentação enzimática, e depois foi precipitado e ressuspenso em tampão de solução. A solução foi hibridizada nas lâminas dos *beadchips* por emparelhamento covalente com sondas específicas durante uma incubação a 48°C por 16 horas (Figura 11A). Após a hibridização, foi realizada lavagem para remoção dos fragmentos não anelados, e o *beadchip* foi preparado para estender bases alelo-específicas incorporando nucleotídeos de citosina marcados.

A amplificação da marcação embutida fornece o sinal identificado por um laser (*IlluminaTM iScan System*), que excita os fluoróforos em cada base, permitindo a identificação de sítios metilados no DNA em estudo. Desta forma, os *beadchips* foram escaneados usando o sistema *Illumina iScanSQ* que emprega um *scanner* a laser fluorescente de duas cores (532 nm/660 nm) com resolução de 0,375 µm capaz de excitar os fluoróforos incorporados durante o protocolo (Figura 11B). A Figura 12 demonstra o protocolo simplificado do processo de análise de metilação do DNA.

Figura 11 – Ensaio de metilação do DNA.

A: Inserção de amostra de DNA tratado com bissulfito de sódio nos *beadchips*. B: Escaneamento dos *beadchips* no aparelho *iScan*.

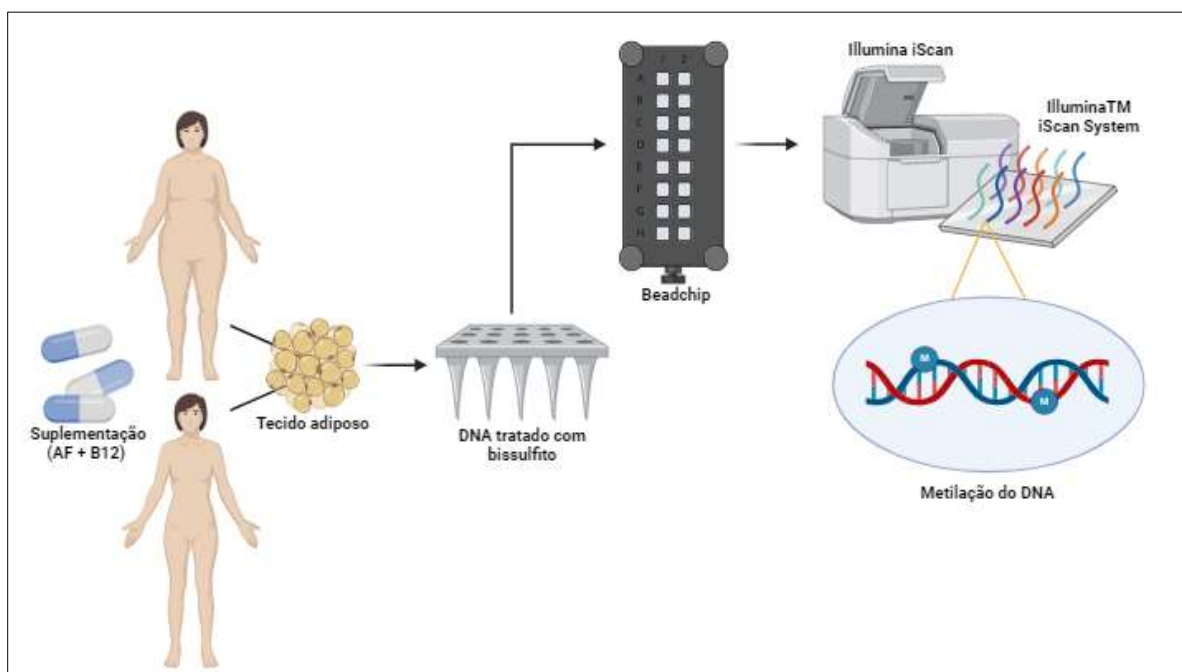
Figura 12 - Protocolo simplificado do processo de análise de metilação do DNA.

Figura de autoria própria. O DNA tratado com bissulfito de sódio foi usado para hibridização na plataforma *Infinium Human Methylation EPIC Beadchip* (Illumina, San Diego, CA). A amplificação da marcação embutida fornece o sinal identificado por um laser (*IlluminaTM iScan System*), que excita os fluoróforos em cada base, permitindo a identificação de sítios metilados no DNA em estudo. Os *beadchips* foram escaneados usando o sistema *Illumina iScanSQ* que emprega um *scanner* a laser fluorescente de duas cores (532 nm/660 nm) com resolução de 0,375 μm capaz de excitar os fluoróforos incorporados durante o protocolo. AF: ácido fólico; B12: vitamina B12.

4.11. Análises de expressão gênica

4.11.1. Extração e quantificação de RNA

O RNA do tecido adiposo foi extraído pelo *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) de acordo com o protocolo do fabricante e quantificado por absorbância (260nm/280nm) no *Nano Vue Plus*.

4.11.2. Síntese de cDNA

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

4.11.3. Reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR)

A análise da expressão gênica foi realizada por reação em cadeia de polimerase (PCR) quantitativo em tempo real (RT-qPCR) no equipamento *Step One Plus Real-Time PCR System* – *Applied Biosystems*, utilizando sondas *TaqMan™ MGB 6-FAM fluorogênicas* (*Applied Biosystems*) (Quadro 3) e *Gene Expression Master Mix* (*Applied Biosystems*). Para a reação foi utilizado 1 µL de cDNA sintetizado da etapa transcrição reversa, para um volume final da reação de 10 µL. As condições para a reação foram de 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, seguido de anelamento e extensão a 60°C por 60 segundos. Os dados obtidos a partir da reação de RT-qPCR foram expressos como um limiar de ciclagem ou *Cycle threshold* (Ct), que representa uma linha de base de detecção de fluorescência. A quantificação relativa do gene foi calculada por meio do método comparativo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ¹⁹². Como controle endógeno, foram utilizados os genes gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) e β -actina (*ACTB*).

Quadro 3 - Sondas selecionadas para realizar os ensaios de PCR quantitativo (qPCR) e suas respectivas referências na plataforma da *Thermo Fisher Scientific*.

Símbolo	Gene	Ensaio TaqMan® ID
<i>GAPDH</i>	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	Hs02786624_g1
<i>ACTB</i>	β -actina	Hs01060665_g1
<i>DNMT1</i>	DNA metil transferase 1	Hs00945875_m1
<i>STAT3</i>	Transdutor de sinal e ativador de transcrição	Hs00374280_m1
<i>LEP</i>	Leptina	Hs00174877_ml
<i>ADIPOQ</i>	Adiponectina	Hs00977214_ml
<i>MTHFR</i>	Metilenotetrahidrofolato redutase	Hs01114487_ml
<i>TNF-α</i>	Fator de necrose tumoral alfa	Hs00174128_ml
<i>IL-6</i>	Interleucina 6	Hs00174131_ml

4.12. Análises de bioinformática e estatísticas

4.12.1. Variáveis clínicas e de expressão gênica

Variáveis numéricas foram descritas por valores de média e desvio-padrão, enquanto para variáveis categóricas utilizou-se número absoluto e porcentagem. A normalidade de distribuição dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. A comparação dos dados basais em cada grupo (EUT e EP) para pacientes que receberam placebo ou suplemento foi realizada pelo teste t para amostras independentes (variáveis numéricas) ou qui-quadrado (variáveis categóricas). Para avaliar o efeito da intervenção utilizou-se Equação de Estimativa Generalizada (EEG) e, quando um valor significativo de F foi observado, foi realizado o *post hoc* de Bonferroni para comparações múltiplas. Para todas as variáveis dependentes, o grupo (i.e., intervenção e placebo) e o tempo (i.e., pré e pós) foram considerados fatores fixos, e os sujeitos foram definidos como fatores aleatórios. Todas as análises foram conduzidas de acordo com o princípio da intenção de tratamento e por protocolo. Avaliação por protocolo foi conduzida com as pacientes que apresentavam dados dos períodos pré e pós-intervenção e que atingiram uma adesão ao uso de placebo/suplemento maior ou igual a 75%. A significância estatística foi estabelecida em 5% ($p < 0,05$), sendo todas as análises realizadas no software *Statistical Package for Social Science* (SPSS versão 22.0 [Inc. Chicago. IL]).

4.12.2. Análises de metilação do DNA

Os dados da matriz de metilação foram processados no ambiente estatístico R 4.1.1 ([//www.r-project.org/](http://www.r-project.org/)). O pacote R (R Core Team, 2021) RnBeads foi utilizado para controle de qualidade e pré-processamento¹⁹³. Primeiramente, utilizou-se o algoritmo de corte para filtrar sondas e/ou amostras. Posteriormente, sondas que se sobrepunham a polimorfismos de nucleotídeo único, sondas em cromossomos sexuais e/ou sondas cujas sequências mapeavam múltiplas localizações genômicas (reação cruzada) foram removidas. As intensidades brutas obtidas na matriz foram normalizadas usando o método BMIQ, que é uma abordagem de normalização baseada em modelo para corrigir valores β de sondas do tipo II de acordo com a distribuição beta dos valores β das sondas do tipo I. Assim, um valor β específico foi obtido para cada sítio CpG encontrado. O valor β corresponde a razão do sinal fluorescente entre a sonda metilada (M) em relação à soma das sondas M e não metilada (UM) [$\beta = M/(M + UM)$] e variam de 0 (sem metilação) a 1 (100% de metilação de ambos os alelos). Por fim, modelos lineares hierárquicos foram utilizados com pacote *limma* para obter as diferenças entre grupos¹⁹⁴. 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.

4.12.3. 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).

Resultados

5. RESULTADOS

5.1. Triagem e recrutamento

Foi realizada a triagem de 1.219 pacientes atendidas no Ambulatório de Lúpus Adulto da Divisão de Reumatologia do HC-FMUSP. Após varredura com aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, obteve-se um número de 758 pacientes não elegíveis e 461 pacientes elegíveis para o presente estudo. Dente o total de pacientes elegíveis, 20 não se apresentaram nas consultas presenciais agendadas e tampouco foram encontrados os contatos telefônicos das mesmas via cadastro do sistema do hospital, restando, portanto, 441 pacientes que foram convidadas para ingresso no estudo. Dessas, 199 se recusaram a participar, 189 não retornaram aos contatos telefônicos, duas pacientes vieram a óbito e 51 aceitaram participar e foram incluídas no estudo.

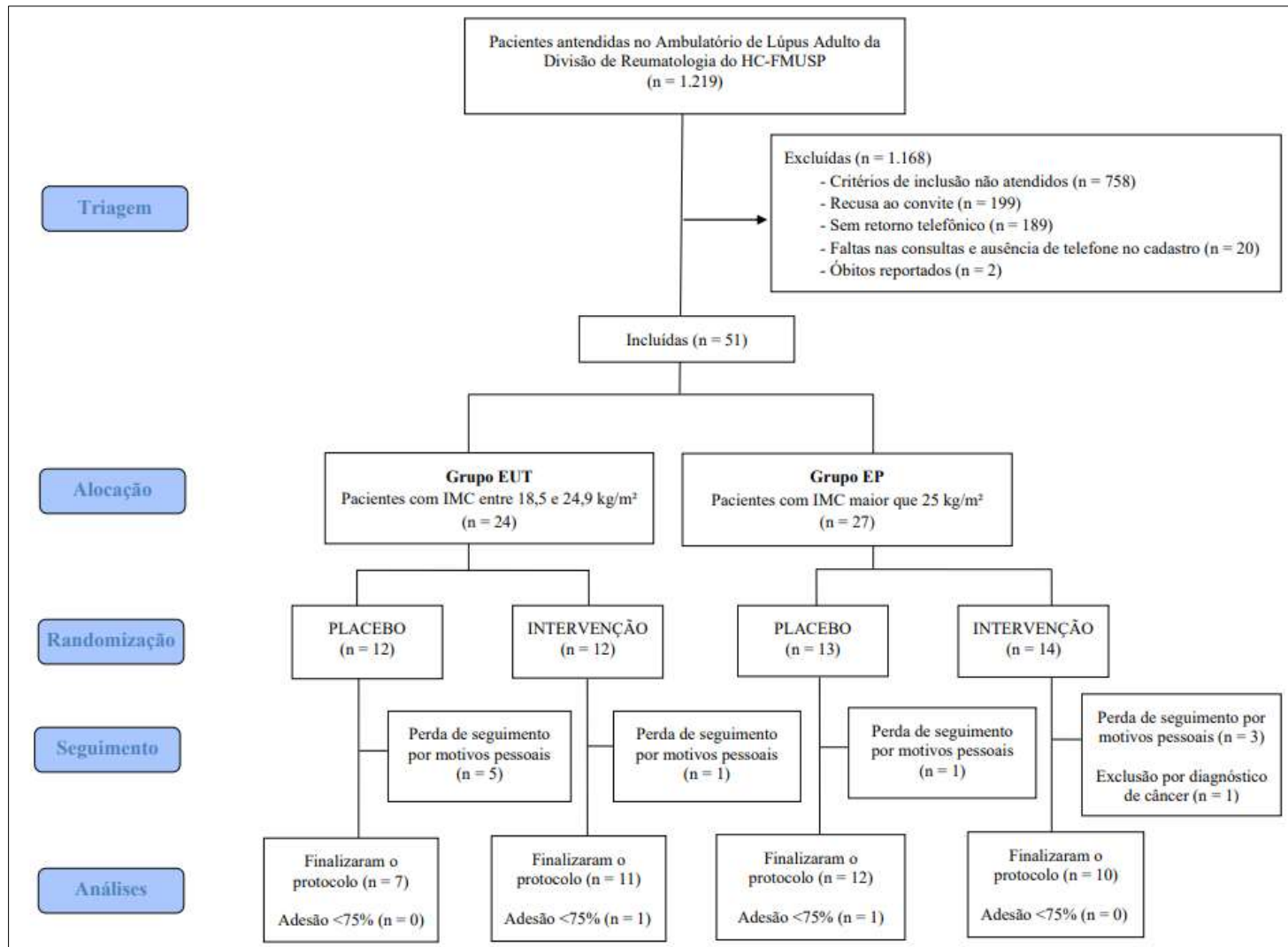
Das 51 pacientes incluídas, 24 foram alocadas no grupo EUT, sendo 12 randomizadas para receberem a suplementação e 12 para receberem o placebo. As 27 pacientes restantes foram alocadas no grupo EP, sendo 14 delas direcionadas ao uso da suplementação e 13 ao uso de placebo. Durante o desenvolvimento do protocolo de suplementação, seis pacientes do grupo EUT e quatro pacientes do grupo EP desistiram da intervenção e não retornaram para avaliação pós-suplementação, sendo que todas as pacientes relataram desistência por motivos pessoais. Ainda, uma paciente pertencente ao grupo EP foi diagnosticada com doença neoplásica durante o protocolo do estudo, sendo excluída. Assim, 18 pacientes do grupo EUT e 22 pacientes do grupo EP finalizaram o protocolo (coleta pré e pós). O fluxograma de recrutamento está demonstrado na Figura 13.

Das 40 pacientes que finalizaram o protocolo de intervenção, apenas uma paciente de cada grupo (EUT e EP) tiveram adesão menor do que 75% ao uso diário das cápsulas.

5.2. Dados socioeconômicos

Os dados socioeconômicos das pacientes estão demonstrados na Tabela 1. Observou-se uma distribuição homogênea considerando raça, escolaridade e estado civil entre as pacientes que receberam placebo ou suplementação em ambos os grupos (EUT e EP). Entretanto, observou-se uma maior média de idade nas pacientes do grupo EUT que receberam a suplementação em comparação com as que receberam placebo.

Figura 13 – Fluxograma de recrutamento.



HC-FMUSP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; N: número; IMC: Índice de Massa Corporal; grupo EUT: grupo de pacientes com peso adequado; grupo EP: grupo de pacientes com excesso de peso.

Tabela 1 - Dados basais socioeconômicos das pacientes com lúpus eritematoso sistêmico incluídas no estudo.

Variáveis	EUT				EP			
	Total (n = 24)	PLA (n = 12)	INT (n = 12)	<i>p</i>	Total (n = 27)	PLA (n = 13)	INT (n = 14)	<i>p</i>
Idade (anos)	33,7±7,1	30,4±7,4	37,1±5,1	0,02	36,3±5,5	37,5±4,6	35,4±6,3	0,42
Raça declarada								
<i>Branca</i>	37,5 (9)	33,3(4)	41,7(5)		29,7 (8)	23,1(3)	35,7(5)	
<i>Preta</i>	20,8 (5)	8,3(1)	33,3(4)		25,9 (7)	30,8(4)	21,4(3)	
<i>Parda</i>	37,5 (9)	50(6)	25(3)	0,27	44,4 (12)	46,1(6)	42,8(6)	0,74
<i>Amarela</i>	4,2 (1)	8,3(1)	0		0	0	0	
Estado civil								
<i>Casada</i>	33,3 (8)	25(3)	41,7(5)		63 (17)	61,5(8)	64,3(9)	
<i>Solteira</i>	62,5 (15)	75(9)	50(6)		37 (10)	38,5(5)	35,7(5)	0,88
<i>Divorciada</i>	4,2 (1)	0	8,3(1)	0,35	0	0	0	
Escolaridade								
<i>EF</i>	0	0	0		7,4 (2)	7,7(1)	7,1(1)	
<i>incompleto</i>								
<i>EM</i>	4,2 (1)	0	8,3(1)		18,5(5)	23,1(3)	14,3(2)	0,86
<i>incompleto</i>				0,65				
<i>EM completo</i>	33,3 (8)	33,3(4)	33,3(4)		33,3(9)	30,8(4)	35,7(5)	
<i>ES</i>	29,2 (7)	25(3)	33,3(4)		3,7(1)	0	7,1(1)	
<i>incompleto</i>								
<i>ES completo</i>	33,3 (8)	41,7(5)	25(3)		37 (10)	38,5(5)	35,7(5)	

Dados apresentados em média ± desvio padrão ou porcentagem (número absoluto). EF: ensino fundamental; EM: ensino médio; ES: ensino superior; PLA: placebo; INT: intervenção; EUT: grupo eutrofia; EP: grupo excesso de peso; *p*: comparação entre placebo e intervenção no mesmo grupo. Valores em negrito indicam $p < 0,05$.

5.3. Medicação e atividade da doença

Os dados basais de medicação e atividade da doença estão descritos na Tabela 2. Não foram observadas diferenças na média de tempo de doença, uso de hidroxicloroquina e atividade da doença entre os grupos. Do total de pacientes incluídas, apenas oito faziam uso de prednisona, sendo quatro do grupo EUT (uma que recebeu placebo e três que receberam suplementação) e quatro do grupo EP (uma que recebeu placebo e três que receberam suplementação). Em ambos os grupos a dosagem variou de 5 a 10 mg/dia. Ainda, 60,8% (n = 31) das pacientes faziam uso de vitamina D, 2% (n = 1) de vitamina A, 2% (n = 1) de cálcio e 2% (n = 1) de ferro.

Tabela 2 - Dados basais de medicação e atividade da doença das pacientes com lúpus eritematoso sistêmico incluídas no estudo.

Variáveis	EUT				EP			
	Total (n = 24)	PLA (n = 12)	INT (n = 12)	p	Total (n = 27)	PLA (n = 13)	INT (n = 14)	p
Diagnóstico LES (anos)	11,5±8,2	10,7±8,1	12,3±8,5	0,64	12,9±5,7	12,8 ±5,7	12,9±6,0	0,94
<i>Hidroxicloroquina</i>								
Dose diária (mg)	389,1±56,3	395,8±54,2	381,8±60,3	0,56	404,2±20,4	400,0±0,0	408,3±28,9	0,34
Dias por semana	5,3±1,2	5,1±1,4	5,5±0,9	0,48	5,7±1,4	5,7±2,0	5,7±0,7	1,00
Tempo de uso (meses)	114,8±85,0	111,3±81,0	118,4±92,2	0,84	125,1±64,5	120,7±67,8	129,1±63,6	0,71
SLEDAI	0,7±1,2	0,8±1,4	0,6±1,1	0,75	0,3±1,1	0,3±1,1	0,3±1,1	0,96

Dados apresentados em média ± desvio padrão. LES: lúpus eritematoso sistêmico; SLEDAI: índice de atividade da doença; EUT: grupo eutrofia; EP: grupo excesso de peso; PLA: placebo; INT: intervenção; p: comparação entre placebo e intervenção no mesmo grupo.

5.4. Dados antropométricos e de composição corporal

Os dados basais antropométricos e de composição corporal estão descritos na Tabela 3. Não foram observadas diferenças entre as pacientes que receberam placebo ou intervenção tanto no grupo EUT como no EP.

Tabela 3 - Dados antropométricos e de composição corporal basais das pacientes com lúpus eritematoso sistêmico incluídas no estudo.

Variáveis	EUT				EP			
	Total (n = 24)	PLA (n = 12)	INT (n = 12)	p	Total (n = 27)	PLA (n = 13)	INT (n = 14)	p
Peso (kg)	58,2±7,0	58,3±7,5	58,1±6,8	0,94	78,9±10,5	80,6±10,6	77,4±10,6	0,43
IMC (kg/m ²)	22,1±2,4	22,0±2,6	22,2±2,2	0,84	30,4±3,6	30,5±2,7	30,3±4,4	0,91
CA (cm)	79,3±7,0	77,6±6,9	80,9±7,0	0,26	98,1±7,6	98,4±8,2	97,9±7,4	0,87
MG (kg)	18,6±3,9	19,0±4,1	18,2±4,0	0,62	29,4±5,0	30,4±5,1	28,6±4,9	0,34
MG (%)	31,6±4,2	32,1±3,6	31,2±5,0	0,59	37,2±2,3	37,5±2,0	36,9±2,6	0,46
MM (kg)	39,6±4,1	39,3±3,9	39,9±4,4	0,72	49,5±6,1	50,2±5,8	48,8±6,6	0,56
MM (%)	68,2±4,3	67,6±3,5	68,9±4,9	0,47	62,8±2,4	62,4±2,0	63,2±2,7	0,43

Dados apresentados em média ± desvio padrão. IMC: índice de massa corporal; CA: circunferência abdominal; MG: massa gorda; MM: massa magra; EUT: grupo eutrofia; EP: grupo excesso de peso; PLA: placebo; INT: intervenção; p: comparação entre placebo e intervenção no mesmo grupo.

Tabela 4 demonstra o efeito da intervenção nos parâmetros antropométricos e de composição corporal nos grupos EUT e EP. Em ambos os grupos, não foram observadas alterações no peso, IMC, CA e percentuais de massa magra e massa gorda após uso do mix de vitaminas ou do placebo.

Tabela 4 – Dados antropométricos e de composição corporal das pacientes com lúpus eritematoso sistêmico antes e após a suplementação com vitamina B12 e ácido fólico ou placebo.

Variáveis		Pré	Pós	<i>p</i> *	<i>p</i> **
Peso (kg)					
EUT	INT	58,1 (54,4 - 61,8)	58,1 (54,2 - 62,0)	0,59	1,00
	PLA	58,3 (54,2 - 62,3)	57,8 (54,0 - 61,6)		1,00
EP	INT	77,3 (72,0 - 82,7)	76,1 (70,4 - 81,8)	0,63	1,00
	PLA	80,6 (75,1 - 86,2)	80,2 (74,1 – 86)		1,00
IMC (kg/m²)					
EUT	INT	22,2 (21,0 - 23,4)	22,2 (21,1 - 23,4)	0,65	1,00
	PLA	22,0 (20,6 - 23,5)	21,9 (20,4 - 23,3)		1,00
EP	INT	30,3 (28,1 - 32,5)	30,0 (28,0 - 32,0)	0,83	1,00
	PLA	30,5 (29,0 - 31,9)	30,3 (28,7 - 32,0)		1,00
CA (cm)					
EUT	INT	80,9 (77,1 - 84,6)	80,2 (76,2 - 84,2)	0,08	1,00
	PLA	77,6 (73,9 - 81,3)	58,8 (38,1 - 79,4)		0,43
EP	INT	97,9 (94,1 - 101,6)	96,1 (91,3 - 100,9)	0,46	1,00
	PLA	98,4 (94,1- 102,7)	98,2 (94,2 - 102,2)		1,00
Massa gorda (%)					
EUT	INT	31,1 (28,5 - 33,8)	30,8 (28,2 - 33,3)	0,63	1,00
	PLA	32,1 (30,2 - 34,0)	31,3 (28,7 - 33,9)		1,00
EP	INT	36,8 (35,5 - 38,2)	36,6 (34,7 - 38,5)	0,79	1,00
	PLA	37,5 (36,5 - 38,6)	37,1 (35,7 - 38,4)		1,00
Massa magra (%)					
EUT	INT	68,8 (66,2 - 71,5)	69,2 (66,7 - 71,7)	0,25	1,00
	PLA	67,6 (65,6 - 69,5)	68,8 (66,3 - 71,3)		0,04
EP	INT	63,2 (61,9 - 64,5)	63,3 (61,3 - 65,2)	0,67	1,00
	PLA	62,4 (61,4 - 63,5)	62,9 (61,6 - 64,2)		1,00

Dados apresentados em médias marginais estimadas e intervalo de confiança de 95%. IMC: índice de massa corporal; CA: circunferência abdominal; EUT: grupo eutrofia; EP: grupo excesso de peso; PLA: placebo; INT: intervenção; *p**: interação entre grupos (PLA vs. INT); *p***: interação do tempo (pré vs. pós) dentro do grupo; Valores em negrito indicam *p* < 0,05.

5.5. Consumo alimentar

Os dados basais de ingestão alimentar encontram-se na Tabela 5. Não foram observadas diferenças entre os grupos. Da mesma forma, em ambos os grupos, não foram observadas diferenças no consumo alimentar após intervenção (Tabela 6).

Tabela 5 - Dados basais do consumo alimentar das pacientes das pacientes com lúpus eritematoso sistêmico incluídas no estudo.

Variáveis	EUT				EP			
	Total (n = 24)	PLA (n = 12)	INT (n = 12)	<i>p</i>	Total (n = 27)	PLA (n = 13)	INT (n = 14)	<i>p</i>
Ingestão energética (kcal)	1711,8±532,0	1757,3±642,6	1666,3±417,5	0,68	1668,2±737,8	1517,6±500,3	1818,8±913,7	0,31
Carboidratos (g)	193,7±62,0	189,5±72,9	197,8±51,9	0,75	191,6±93,0	190,3±70,3	192,7±112,8	0,95
Carboidratos (%)	46,5±7,8	44,7±8,3	48,2±7,3	0,29	43,7±12,0	45,3±9,3	42,3±14,3	0,53
Proteínas (g)	78,1±48,2	87,9±55,5	68,3±39,5	0,33	79,2±35,5	78,6±32,6	79,8±39,6	0,93
Proteínas (%)	17,7±6,1	18,9±5,7	16,5±6,4	0,35	18,7±4,7	19,3±5,4	18,0±3,9	0,50
Lipídios (g)	69,8±23,9	72,8±28,7	66,7±18,7	0,54	61,1±33,6	53,3±18,7	68,5±42,6	0,24
Lipídios (%)	35,4±5,2	35,6±6,3	35,3±4,0	0,88	32,0±11,1	30,3±8,7	33,6±13,2	0,45
Ácido fólico (mcg)	61,6±56,3	64,1±59,4	59,1±55,6	0,83	78,7±77,5	64,7±70,1	92,7±84,7	0,37
Vitamina B12 (mcg)	1,3±1,9	1,0±0,7	1,5±2,6	0,51	1,4±1,8	1,7±2,4	1,7±2,4	0,45

Dados apresentados em média ± desvio padrão; EUT: grupo eutrofia; EP: grupo excesso de peso; PLA: placebo; INT: intervenção; *p*: comparação entre placebo e intervenção no mesmo grupo.

Tabela 6 - Dados do consumo alimentar das pacientes com lúpus eritematoso sistêmico antes e após a suplementação com vitamina B12 e ácido fólico ou placebo.

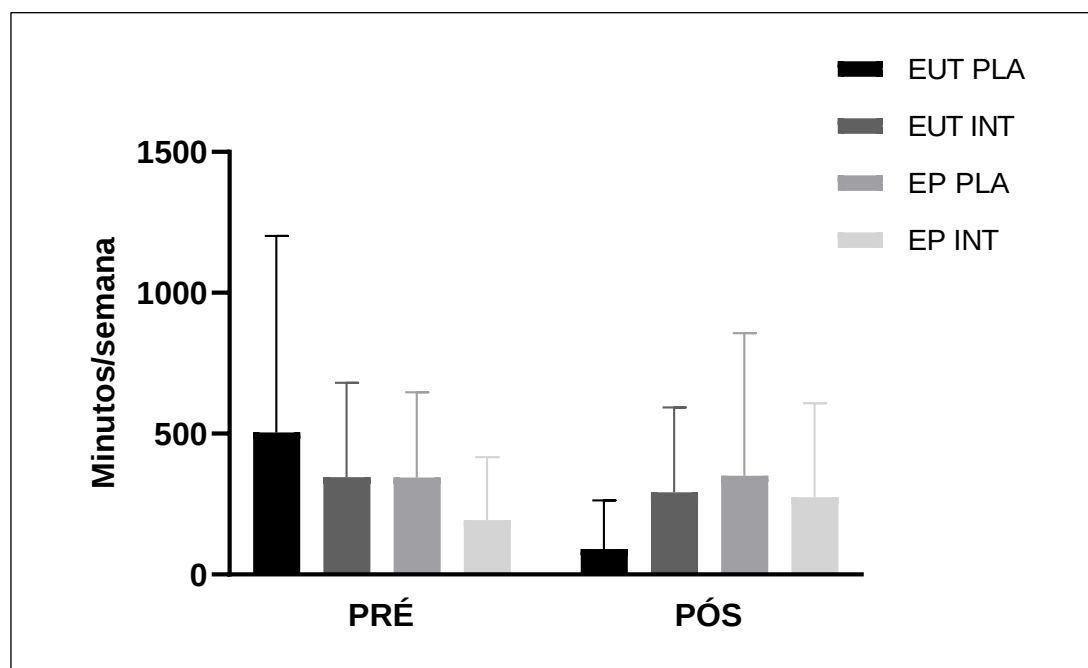
Variáveis		Pré		Pós		<i>p</i> *	<i>p</i> **
Ingestão energética (kcal)							
EUT	INT	1666,3 (1440,1 - 1892,5)	1952,3 (1659,9 - 2244,6)	0,69		0,75	
	PLA	1757,2 (1409,2 - 2105,3)	2193,5 (1522,1 - 2864,9)			1,00	
EP	INT	1818,8 (1341,7 - 2296,0)	1764,3 (1116,8 - 2411,8)	0,39		1,00	
	PLA	1517,6 (1256,3 - 1778,9)	1800,9 (1515,0 - 2086,8)			1,00	
Carboidratos (%)							
EUT	INT	48,2 (44,2 - 52,1)	47,9 (43,1 - 52,6)	0,31		1,00	
	PLA	44,7 (40,2 - 49,2)	48,6 (43,4 - 53,9)			1,00	
EP	INT	42,3 (35,1 - 49,5)	45,1 (40,9 - 49,3)	0,75		1,00	
	PLA	45,3 (40,4 - 50,1)	49,6 (45,8 - 53,4)			0,75	
Proteínas (%)							
EUT	INT	16,5 (13,0 - 20,0)	15,3 (13,1 - 17,5)	0,48		1,00	
	PLA	18,9 (15,8 - 22,0)	15,6 (12,2 - 19,1)			0,62	
EP	INT	18,0 (16,0 - 20,1)	15,7 (13,3 - 18,1)	0,99		0,49	
	PLA	19,3 (16,5 - 22,1)	17,0 (14,7 - 19,4)			0,77	
Lipídios (%)							
EUT	INT	35,2 (33,0 - 37,4)	37,0 (-33,3 - 40,7)	0,77		1,00	
	PLA	35,6 (32,2 - 39)	36,3 (31,7 - 40,8)			1,00	
EP	INT	33,6 (27,0 - 40,3)	37,9 (33,3 - 42,4)	0,51		0,76	
	PLA	30,3 (25,7 - 34,8)	32,2 (29,5 - 35,0)			1,00	
Vit. B12 (mcg)							
EUT	INT	1,5 (0,1 - 2,9)	2,9 (1,6 - 4,2)	0,32		0,84	
	PLA	1,0 (0,6 - 1,4)	6,4 (-1,4 - 14,3)			1,00	
EP	INT	1,1 (0,6 - 1,6)	2,1 (0,7 - 3,5)	0,51		1,00	
	PLA	1,7 (0,4 - 3,0)	3,6 (2,0 - 5,3)			0,64	
Ácido fólico (mcg)							
EUT	INT	59,1 (29,0 - 89,2)	184,9 (121,4 - 248,5)	0,30		0,00	
	PLA	64,1 (32,0 - 96,3)	145,6 (84,4 - 206,9)			0,05	
EP	INT	92,7 (48,4 - 136,9)	112,2 (24,1 - 200,4)	0,26		1,00	
	PLA	64,7 (28,0 - 101,3)	156,5 (97,4 - 215,5)			0,02	

Dados apresentados em medias marginais estimadas e intervalo de confiança de 95%. EUT: grupo eutrofia; EP: grupo excesso de peso; PLA: placebo; INT: intervenção; *p**: interação entre grupos (PLA vs. INT); *p***: interação do tempo (pré vs. pós) dentro do grupo.

5.6. Nível de atividade física

O nível de atividade física das pacientes está demonstrado na Figura 14. Não foram observadas diferenças no tempo despendido com a prática de atividade física entre os momentos pré e pós-intervenção nas pacientes que fizeram uso de placebo ou suplementação em ambos os grupos.

Figura 14 – Dados do nível de atividade física das pacientes com peso adequado e excesso de peso antes e após a suplementação com vitamina B12 e ácido fólico ou placebo.



EUT PLA: grupo de pacientes com peso adequado suplementadas com placebo; EUT INT: grupo de pacientes com peso adequada suplementadas com ácido fólico e vitamina B12; EP PLA: grupo de pacientes com excesso de peso suplementadas com placebo; EP INT: grupo de pacientes com excesso de peso suplementadas com ácido fólico e vitamina B12.

5.7. Perfil metabólico

As pacientes do grupo EUT receberam placebo apresentaram maiores concentrações séricas basais de adiponectina que aquelas que receberam o mix de vitaminas (Tabela 7). Ressalta-se que nenhuma paciente apresentou deficiência de ácido fólico em ambos os grupos no período pré intervenção, ao passo que duas pacientes (7,1%) com excesso de peso apresentaram deficiência de vitamina B12 na análise basal.

A Tabela 8 demonstra o efeito da intervenção no perfil metabólico nos grupos EUT e EP. De maneira geral, a intervenção não alterou a maioria dos parâmetros avaliados em ambos os grupos. Entretanto, a suplementação aumentou as concentrações séricas de vitamina B12 e ácido fólico tanto nas pacientes com peso adequado como as com excesso de peso.

Tabela 7 - Dados metabólicos basais das pacientes com lúpus eritematoso sistêmico incluídas no estudo.

Variáveis	EUT				EP			
	Total (n = 24)	PLA (n = 12)	INT (n = 12)	<i>p</i>	Total (n = 27)	PLA (n = 13)	INT (n = 14)	<i>p</i>
Glicemia (mg/dL)	80,3±7,4	80,5±6,9	80,2±8,1	0,91	83,4±8,4	84,2±10,8	82,8±5,8	0,69
Col total (mg/dL)	149,8±33,3	159,3±37,7	140,3±26,4	0,16	175,7±36,4	187,5±34,4	164,7±36,0	0,10
LDL-c (mg/dL)	82,9±31,5	90,7±35,6	75,2±26,1	0,24	107,0±28,9	114,2±29,2	100,4±28,1	0,22
HDL-c (mg/dL)	49,7±11,4	49,6±14,1	49,8±8,7	0,97	47,6±11,2	49,2±10,3	46,1± 2,1	0,48
TG (mg/dL)	82,0±50,0	93,3±68,1	70,8±17,8	0,29	111,5±62,0	133,9±77,2	90,6±34,7	0,07
Vit B12 (pg/mL)	394,6±142,3	421,8±162,5	367,4±119,8	0,36	384,7±135,1	376,5±111,3	392,4±157,9	0,77
Ácido fólico (ng/mL)	10,7±2,9	11,2±3,0	10,2±2,9	0,43	9,8±2,4	9,9±2,8	9,9±2,8	0,75
PCR (mg/dL)	3,7±7,7	2,1±1,6	5,1±10,6	0,36	5,0±8,4	3,8±3,9	6,1±11,1	0,47
IL-2 (pg/mL)	0,4±0,4	0,6±0,5	0,3±0,1	0,05	1,9±4,3	2,0±4,4	1,9±4,3	0,97
IL-6 (pg/mL)	1,7±2,0	2,3±2,6	1,0±0,6	0,12	2,2±3,2	2,0±1,8	2,5±4,2	0,69
IL-17A (pg/mL)	0,2±0,6	0,4±0,8	0,0±0,0	0,19	1,4±5,2	2,6±7,3	0,2±0,5	0,29
TNF-α (pg/mL)	9,6±5,7	10,6±6,9	8,5±4,3	0,39	8,3±5,1	8,2±4,4	8,3±5,7	0,96
Leptina (pg/mL)	5663,1±4178,3	5777,3±4418,7	5548,9±4117,1	0,90	16646,9±7923,9	16653,3±8332,6	16640,9±7841,2	0,10
Adiponectina (pg/mL)	76227375,5± 56359268,6	100850759,5± 67933426,8	51603991,6 ± 26527043,7	0,03	25138209,5± 32993468,1	30145454,9± 39049114,1	20488624,5± 26856010,8	0,46

Dados apresentados em média ± desvio padrão. Col: colesterol; LDL-c: lipoproteína de baixa densidade; HDL-c: lipoproteína de alta densidade; TG: triglicérides; Vit.: vitamina; PCR: proteína C reativa; IL: interleucina; TNF: fator de necrose tumoral; EUT: grupo eutrofia; EP: grupo excesso de peso; PLA: placebo; INT: intervenção; *p*: comparação entre placebo e intervenção no mesmo grupo. Valores em negrito indicam *p* <0,05.

Tabela 8 - Dados metabólicos das pacientes com LES antes e após a suplementação com vitamina B12 e ácido fólico ou placebo.

Variáveis		Pré	Pós	<i>p</i> *	<i>p</i> **
Glicemia (mg/dL)					
EUT	INT	80,2 (75,7 - 84,5)	77,8 (72,7 - 82,9)	0,30	1,00
	PLA	80,5 (76,3 - 84,3)	82,9 (77,0 - 87,0)		1,00
EP	INT	82,8 (79,9 - 85,7)	92,3 (87,2 - 97,4)	0,05	0,01
	PLA	84,1 (78,5 - 89,8)	85,1 (77,8 - 92,4)		1,00
Colesterol total (mg/dL)					
EUT	INT	140,2 (125,9 - 154,5)	148,1 (132,0 - 164,2)	0,17	0,03
	PLA	159,3 (138,9 - 179,7)	160,5 (143,4 - 177,6)		1,00
EP	INT	164,7 (146,6 - 182,9)	162,2 (149,7 - 175,6)	0,19	1,00
	PLA	187,5 (169,6 - 205,5)	194,9 (176,7 - 213,2)		0,92
LDL-c (mg/dL)					
EUT	INT	75,2 (61,0 - 89,3)	82,1 (66,4 - 97,7)	0,49	0,09
	PLA	90,7 (71,4 - 109,9)	94,0 (78,4 - 109,7)		1,00
EP	INT	100,4 (86,2 - 114,6)	98,6 (86,1 - 111,1)	0,10	1,00
	PLA	114,1 (98,9 - 129,4)	121,4 (104,5 - 138,4)		0,34
HDL-c (mg/dL)					
EUT	INT	49,7 (45,0 - 54,4)	51,6 (46,8 - 56,4)	0,24	0,56
	PLA	49,6 (42,0 - 57,2)	47,4 (44,1 - 50,7)		1,00
EP	INT	46,1 (39,9 - 52,2)	42,8 (38,1 - 47,6)	0,21	1,00
	PLA	49,1 (43,8 - 54,5)	51,2 (45,0 - 57,4)		1,00
Triglicérides (mg/dL)					
EUT	INT	70,7 (61,1 - 80,4)	64,1 (57,0 - 71,3)	0,64	1,00
	PLA	93,3 (56,4 - 130,2)	78,5 (65,3 - 91,7)		1,00
EP	INT	90,6 (73,1 - 108,2)	107,6 (90,4 - 124,9)	0,20	0,36
	PLA	133,9 (93,6 - 174,2)	126,5 (90,1 - 162,9)		1,00
Vitamina B12 (pg/mL)					
EUT	INT		1292,8 (1042,5 - 1543,2)	0,00	0,00
	PLA	367,4 (302,5 - 432,3)	393,1 (319,6 - 466,6)		1,00
EP	INT		1394,2 (1171,3 - 1617,0)	0,00	0,00
	PLA	421,8 (333,8 - 509,8)	411,1 (334,0 - 488,3)		1,00
Ácido fólico (ng/mL)					
EUT	INT	11,0 (8,9 - 13,1)	17,3 (15,6 - 18,9)	0,00	0,00
	PLA	11,9 (9,8 - 14,0)	10,1 (8,4 - 11,9)		0,79
EP	INT	9,5 (7,9 - 11,1)	13,7 (10,3 - 17,1)	0,00	0,00
	PLA	9,6 (8,5 - 10,7)	9,9 (9,2 - 10,6)		1,00
PCR (mg/dL)					
EUT	INT	5,1 (-0,65 - 10,8)	5,0 (-1,12 - 11,1)	0,91	1,00
	PLA	2,1 (1,3 - 2,9)	2,1 (1,1 - 3,0)		1,00
EP	INT	6,1 (0,5 - 11,7)	8,4 (-1,3 - 18,2)	0,32	1,00
	PLA	3,8 (1,7 - 5,8)	14,3 (-1,6 - 30,2)		1,00
IL-2 (pg/mL)					
EUT	INT	0,28 (0,22 - 0,34)	0,23 (0,17 - 0,29)	0,42	0,36
	PLA	0,61 (0,33 - 0,90)	0,38 (0,70 - 0,68)		0,06

IL-6 (pg/mL)	EP	INT	1,89 (-0,3 - 4,1)	1,17 0,08 - 2,3)	0,29	1,00
		PLA	1,9 (-0,4 - 4,3)	1,9 (-0,29 - 4,2)		1,00
	EUT	INT	1,1 (0,73 - 1,52)	1,3 (0,65 - 1,86)	0,30	1,00
		PLA	2,3 (0,90 - 3,68)	1,7 (0,18 - 3,2)		1,00
IL-17A (pg/mL)	EP	INT	2,5 (0,4 - 4,6)	1,5 (0,8 - 2,1)	0,13	1,00
		PLA	2,0 (1,0 - 2,9)	2,5 (0,9 - 4,1)		1,00
	EUT	INT	0,04 (0,01 - 0,06)	0,02 (0,003 - 0,03)	0,35	1,00
		PLA	0,36 (-0,07 - 0,79)	0,12 (-0,002 - 0,25)		1,00
TNF- α (pg/mL)	EP	INT	1,8 (-1,1 - 4,8)	2,5 (-1,9 - 7,0)	0,39	1,00
		PLA	2,4 (-1,3 - 6,2)	2,2 (-0,8 - 5,2)		1,00
	EUT	INT	8,5 (6,2 - 10,3)	7,3 (5,4 - 9,1)	0,94	0,51
		PLA	10,6 (6,8 - 14,4)	9,2 (6,8 - 11,7)		1,00
Leptina (pg/mL)	EP	INT	8,3 (5,4 - 11,2)	7,4 (4,8 - 10,0)	0,10	0,13
		PLA	8,3 (5,9 - 10,5)	8,9 (6,1 - 11,7)		1,00
	EUT	INT	5548,9 (3318,6 - 7779,2)	5324,5 (3507,6 - 7141,4)	0,34	1,00
		PLA	5777,2 (3383,6 - 8170,9)	4084,5 (1476,9 - 6692,1)		1,00
	EP	INT	16640,8 (12682,9 - 20598,8)	20354,6 (6941,6 - 33767,6)	0,61	1,00
		PLA	16653,3 (12301,4 - 210005,2)	16773,8 (19764,7 - 22783,0)		1,00

Dados apresentados em medias marginais estimadas e intervalo de confiança de 95%. LDL-c: lipoproteína de baixa densidade; HDL-c: lipoproteína de alta densidade; PCR: proteína C reativa; IL: interleucina; TNF: fator de necrose tumoral; EUT: grupo eutrofia; EP: grupo excesso de peso; PLA: placebo; INT: intervenção. *p**: interação entre grupos (PLA vs. INT); *p*** : interação do tempo (pré vs. pós) dentro do grupo. Valores em negrito indicam *p* <0,05.

5.8. Metilação do DNA no tecido adiposo

5.8.1. Grupo EUT

A comparação do perfil de metilação do DNA das pacientes do grupo EUT que receberam placebo revelou 457 CpGs diferentemente metiladas (CpGDMs), estando estas localizados em 379 genes (Figura 15). A maioria dessas CpGDMs encontrava-se em ilhas CpGs (Figura 16A) e no corpo do gene (Figura 16B).

Figura 15 - *Heatmap* das CpGs diferentemente metiladas após uso de placebo entre pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e peso adequado.

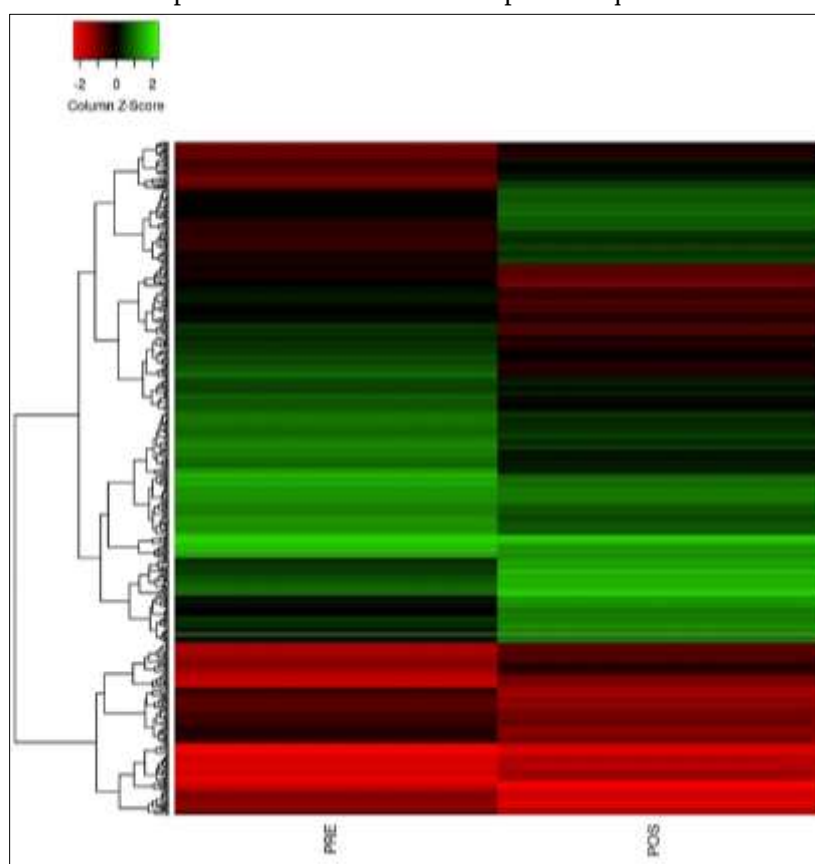
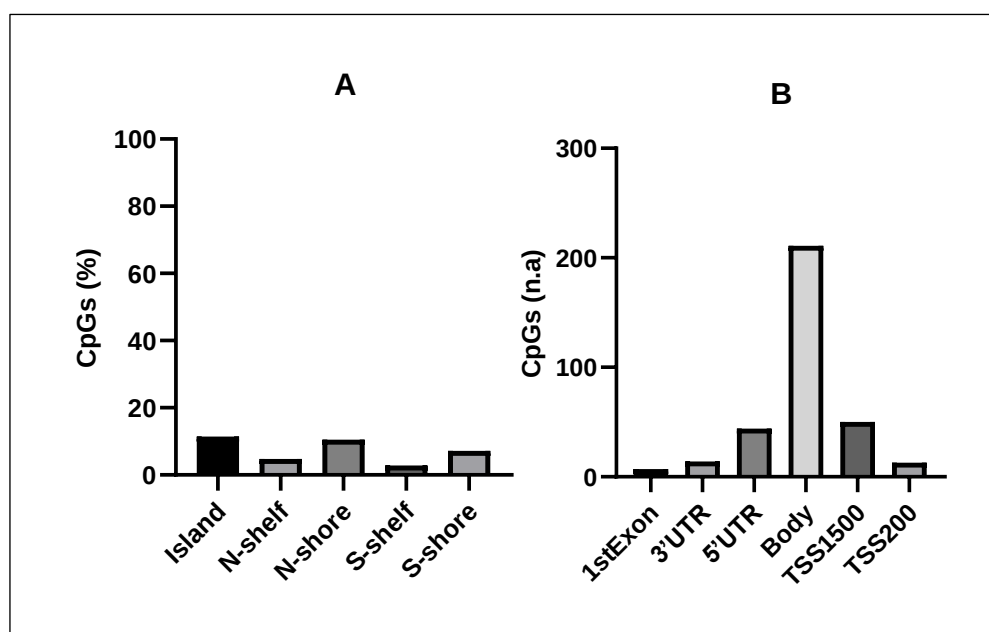


Figura 16 – Distribuição das CpGs diferentemente metiladas após uso de placebo entre pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e peso adequado ao longo do gene.



A: Regiões gênicas dos sítios CpG do grupo EUT placebo comparando os períodos pré e pós-intervenção; B: Distribuição genômica de locais CpG do grupo EUT placebo comparando os períodos pré e pós-intervenção. n.a.: número absoluto.

Observou-se que 28,4% das CpGDMs encontravam-se na região promotora de genes. Desta, 69 CpGs estavam hipermetiladas em pacientes no período pós-intervenção, sendo que a variação foi de 5,7 a 30,5%. Tais CpGDMs foram relacionadas a 73 genes conhecidos. Por outro lado, observou-se 61 CpGs hipometiladas no período pós-intervenção (relacionadas a 63 genes conhecidos) e a variação foi de 5,5 a 28,4%.

A Tabela 9 mostra as 20 principais CpGDMs em regiões promotoras de genes entre pacientes com peso adequado após uso de placebo. As diferenças mais significativas observadas foram para os genes *NRCAM* e *CCDC64B* ($\Delta > 28\%$).

Dentre as CpGDMs hipermetiladas, 23 genes foram anotados para as categorias funcionais selecionadas e na lista de referências, sendo assim utilizados para a análise de enriquecimento (Tabela 10).

Dentre as CpGs hipometiladas nas pacientes, 16 genes foram anotados para as categorias funcionais selecionadas e na lista de referências, sendo assim utilizados para a análise de enriquecimento (Tabela 11).

Tabela 9 -Top 20 principais CpGs em regiões promotoras diferentemente metiladas em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e peso adequado após uso de placebo.

CpG	Metilação do DNA		Δ	Gene	Posição no gene
	Pré	Pós			
Hipermetiladas após uso de placebo					
cg23836155	0,31±0,14	0,62±0,19	0,30	NRCAM;NRCAM;NRCAM;NRCAM	5'UTR;5'UTR;5'UTR;5'UTR
cg09345121	0,51±0,14	0,75±0,08	0,25	ZNF584	TSS1500
cg03742937	0,43±0,12	0,65±0,06	0,22	LRP5;LRP5	5'UTR;Body
cg26212328	0,23±0,10	0,44±0,09	0,21	SLC38A2	TSS1500
cg12629515	0,46±0,09	0,66±0,13	0,20	HIST1H3J;HIST1H2BO	TSS1500;TSS1500
cg18306226	0,51±0,09	0,71±0,05	0,20	CCDC9	5'UTR
cg01440371	0,41±0,08	0,61±0,12	0,20	FGGY;FGGY;FGGY;FGGY;FGGY	5'UTR;Body;Body;Body;Body
cg20901032	0,57±0,11	0,760,05	0,19	CSNK1A1L	TSS1500
cg04250765	0,52±0,09	0,71±0,10	0,19	ARMC3;ARMC3;ARMC3;ARMC3	5'UTR;Body;Body;Body
cg00421164	0,53±0,09	0,72±0,08	0,18	RREB1;RREB1;RREB1;RREB1	5'UTR;5'UTR;5'UTR;5'UTR
Hipometiladas após uso de placebo					
cg06606091	0,61±0,12	0,33±0,21	0,28	LOC100128770;CCDC64B	TSS200;Body
cg06152276	0,71±0,14	0,43±0,07	0,28	NAA60;NAA60;NAA60	5'UTR;5'UTR;5'UTR
cg07647036	0,64±0,11	0,36±0,17	0,27	HDAC11-AS1;HDAC11;HDAC11	TSS1500;5'UTR;Body
cg00437411	0,61±0,11	0,36±0,12	0,25	GCNT3	TSS200
cg06268956	0,58±0,12	0,36±0,10	0,22	TSSC4	TSS1500
cg20712532	0,65±0,11	0,44±0,11	0,21	RCAN3;RCAN3;RCAN3;RCAN3;RCAN3;RCAN3;RCAN3;RCAN3;RCAN3;RCAN3	5'UTR;5'UTR;Body;Body;Body;Body;Body;Body;Body;Body;Body
cg03703171	0,63±0,07	0,42±0,04	0,21	IL1RN;IL1RN;IL1RN	TSS1500;TSS1500;TSS1500
cg24407546	0,69±0,09	0,48±0,16	0,21	TMCC2;TMCC2;TMCC2;TMCC2	TSS200;Body;Body;Body
cg11222053	0,77±0,0	0,56±0,16	0,21	ITGA3;ITGA3	TSS1500; TSS1500
cg24983135	0,47±0,12	0,26±0,04	0,21	LINC01525	TSS1500

Dados apresentados em média $\pm$ desvio padrão; Δ : diferença entre pré e pós; *p*: valor de significância estabelecido em $p<0,001$.

Tabela 10 - Vias metabólicas relacionadas aos genes hipermetilados em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e peso adequado após uso de placebo.

KEEG	Via Metabólica	Razão de enriquecimento
hsa00533	Biossíntese de glicosaminoglicanos	23,2
hsa00603	Biossíntese de glicosfingolípido	21,6
hsa04974	Digestão e absorção de proteínas	10,8
hsa05322	Lúpus eritematoso sistêmico	4,9
hsa04310	Via de sinalização Wnt	4,4
hsa05224	Câncer de mama	4,4
hsa05226	Câncer gástrico	4,3
hsa05200	Vias de sinalização de câncer	2,4

KEEG: Enciclopédia de Kyoto de Genes e Genomas.

Tabela 11 - Vias metabólicas relacionadas aos genes hipometilados em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e peso adequado após uso de placebo.

KEEG	Via Metabólica	Razão de enriquecimento
hsa00061	Biossíntese de ácidos graxos	35,9
hsa05150	Infecção por <i>Staphylococcus aureus</i>	16,7
hsa05221	Leucemia mieloide aguda	14,1
hsa05412	Cardiomiopatia arritmogênica do ventrículo direito	13,0
hsa05140	Leishmaniose	12,6
hsa05322	Lúpus eritematoso sistêmico	7,0
hsa04310	Via de sinalização Wnt	6,4
hsa04145	Fagossomo	6,1
hsa05152	Tuberculose	5,2
hsa05165	Infecção por papilomavírus humano	4,1

KEEG: Enciclopédia de Kyoto de Genes e Genomas.

A comparação do perfil de metilação do DNA das pacientes do grupo EUT que receberam suplementação revelou 418 CpGDMs, localizadas em 300 genes (Figura 17). A maioria se encontrava na região *N-shore* (Figura 18A) e no corpo do gene (Figura 18B).

Figura 17 - *Heatmap* das CpGs diferentemente metiladas após suplementação com vitamina B12 e ácido fólico entre pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e peso adequado.

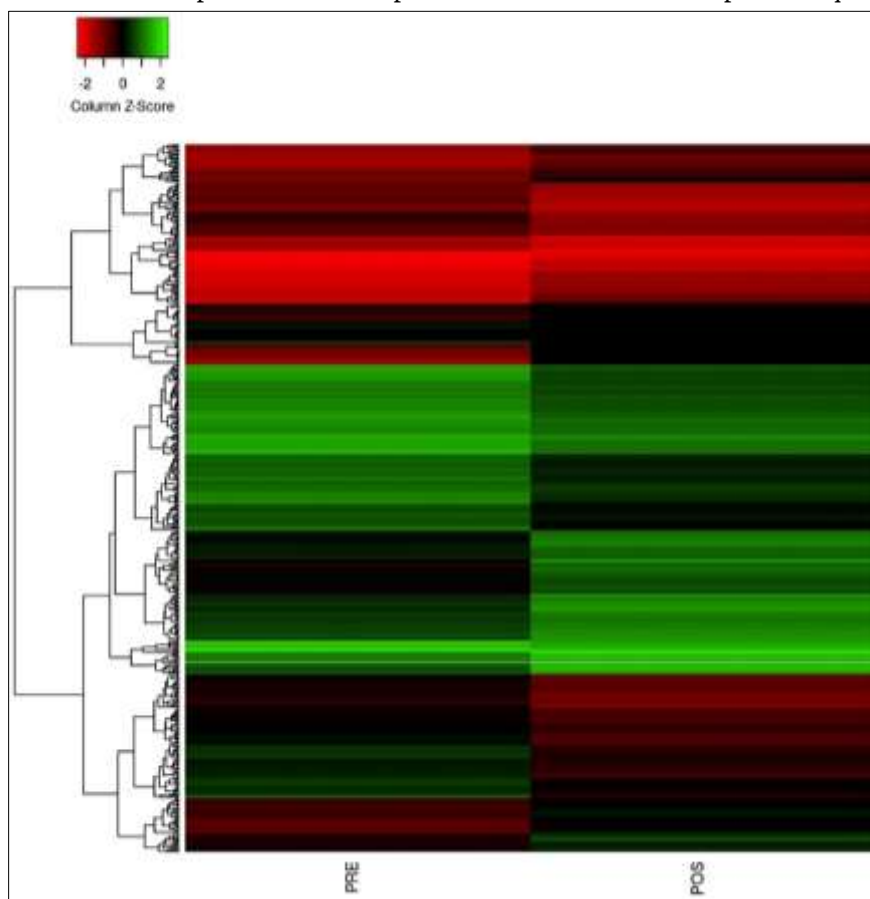
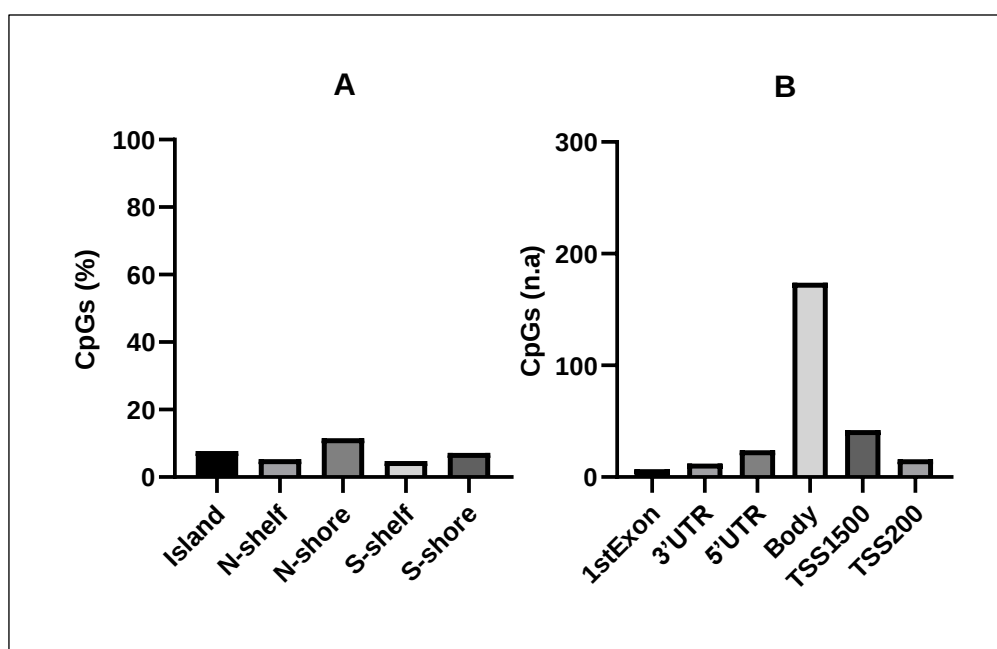


Figura 18 - Distribuição das CpGs diferentemente metiladas após suplementação com vitamina B12 e ácido fólico entre pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e peso adequado ao longo do gene.



A: Regiões gênicas dos sítios CpG do grupo EUT intervenção comparando os períodos pré e pós; B: Distribuição genômica de locais CpG do grupo EUT intervenção comparando os períodos pré e pós. n.a.: número absoluto.

Observou-se que 24,4% das CpGDMs encontravam-se na região promotora de genes. Desta, 47 CpGs estavam hipermetiladas após a suplementação, sendo que a variação foi de 5 a 23%. Tais CpGDMs foram relacionadas a 53 genes conhecidos. Por outro lado, observou-se 55 CpGs hipometiladas no período pós suplementação (relacionadas a 64 genes conhecidos), cuja variação foi de 6 a 18,4%.

A Tabela 12 mostra as 20 principais CpGDMs em regiões promotoras de genes entre pacientes com peso adequado após uso do suplemento. As diferenças mais significativas observadas foram para os genes *C22orf25* e *REXO1* ($\Delta > 18\%$).

Dentre as CpGs hipermetiladas, 15 genes foram anotados para as categorias funcionais selecionadas e na lista de referências, sendo assim utilizados para a análise de enriquecimento (Tabela 13).

Dentre as CpGs hipometiladas nas pacientes, 19 genes foram anotados para as categorias funcionais selecionadas e na lista de referências, sendo assim utilizados para a análise de enriquecimento (Tabela 14).

Tabela 12 - Top 20 principais CpGs em regiões promotoras diferentemente metiladas em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e peso adequado após suplementação com vitamina B12 e ácido fólico.

CpG	Metilção do DNA		Δ	Gene	Posição no gene
	Pré	Pós			
Hipermetiladas após uso de suplemento					
cg00504285	0,53±0,13	0,76±0,11	0,23	C22orf25;MIR185	5'UTR;TSS1500
cg08889811	0,48±0,141	0,69±0,06	0,21	GFM2;GFM2;GFM2;GFM2;N	5'UTR;5'UTR;5'UTR;5'UTR;TSS1500;TSS1500;TSS1500;Body
cg24018814	0,51±0,2	0,68±0,10	0,17	SA2;NSA2;NSA2;GFM2	3'UTR
cg26863600	0,15±0,08	0,32±0,14	0,16	GOLGA3	5'UTR
cg05205670	0,17±0,08	0,33±0,12	0,16	GNG7	TSS200
cg04754315	0,23±0,10	0,40±0,09	0,16	VWDE	HOPX;HOPX;HOPX;HOPX;HOPX
cg11101798	0,55±0,09	0,71±0,09	0,16	SUPT7L;SUPT7L;SUPT7L;SUPT7L;SUPT7L;SUPT7L;SLC4A1AP	5'UTR;Body;Body;TSS200;TSS200;TSS1500;TSS1500;TSS1500;TSS1500;TSS1500;TSS1500;Body
cg22064136	0,54±0,11	0,69±0,06	0,15	TGM5;TGM5	TSS200;TSS200
cg05744452	0,57±0,10	0,73±0,09	0,15	XKR5;XKR5	3'UTR;3'UTR
cg01820192	0,29±0,09	0,45±0,10	0,15	C21orf125	TSS200
Hipometiladas após uso de suplemento					
cg13981214	0,75±0,07	0,57±0,07	0,18	REXO1	TSS1500
cg07269843	0,61±0,12	0,43±0,08	0,18	UBE2J2;UBE2J2;UBE2J2;UBE2J2	5'UTR;5'UTR;Body;Body
cg03029371	0,62±0,12	0,44±0,09	0,18	E2J2	5'UTR
cg22535754	0,52±0,07	0,35±0,11	0,17	SLCO4A1	PAFAH1B3;PAFAH1B3;PAFAH1B3
cg21768809	0,55±0,09	0,39±0,12	0,17	AH1B3;PRR19	TSS1500;TSS1500;TSS1500;5'UTR
cg07131540	0,75±0,08	0,58±0,13	0,17	MOGAT1	TSS1500
cg24767968	0,44±0,10	0,28±0,07	0,16	SOLH	5'UTR
cg08379517	0,78±0,07	0,62±0,12	0,16	HOXB3	TSS200
cg01938476	0,65±0,10	0,49±0,08	0,16	LRRC25	TSS1500
cg18279757	0,43±0,09	0,27±0,11	0,16	SCARNA12;PHB2;PHB2	TSS200;Body;Body
				C8orf49;GATA4;GATA4;GATA4	TSS1500;3'UTR;3'UTR;3'UTR

Tabela 13 - Vias metabólicas relacionadas aos genes hipermetilados em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e peso adequado após suplementação com vitamina B12 e ácido fólico.

KEEG	Via Metabólica	Razão de enriquecimento
hsa00053	Metabolismo de ascorbato e aldarato	36,9
hsa00040	Interconversões de pentose e glucuronato	29,3
hsa00860	Metabolismo da porfirina	23,7
hsa05110	Infecção por <i>Vibrio cholerae</i>	19,9
hsa00140	Biossíntese de hormônio esteróide	16,6
hsa00830	Metabolismo de retinol	14,9
hsa00982	Metabolismo de drogas	13,8
hsa00980	Metabolismo de xenobióticos pelo citocromo P450	13,1
hsa05204	Carcinogênese química	12,1

KEEG: Enciclopédia de Kyoto de Genes e Genomas.

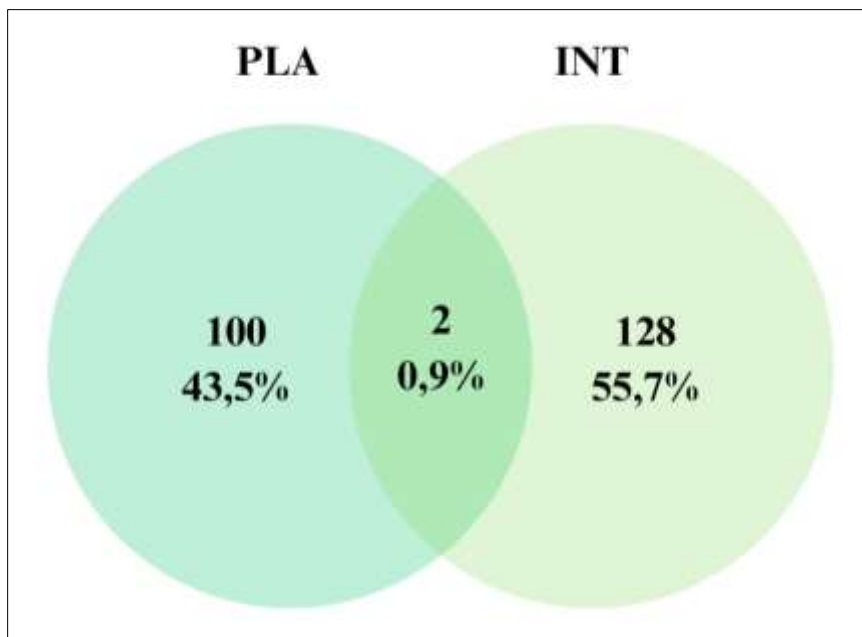
Tabela 14 - Vias metabólicas relacionadas aos genes hipometilados em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e peso adequado após suplementação com vitamina B12 e ácido fólico.

KEEG	Via Metabólica	Razão de enriquecimento
hsa00910	Metabolismo do nitrogênio	23,1
hsa00561	Metabolismo glicerolípido	12,9
hsa05310	Asma	12,7
hsa04216	Ferroptose	9,8
hsa00565	Metabolismo de éter lipídico	8,4
hsa00330	Metabolismo de arginina e prolina	7,9
hsa04979	Metabolismo do colesterol	7,9
hsa05014	Esclerose lateral amiotrófica	7,7
hsa03460	Via da anemia de Fanconi	7,3
hsa04621	Via de sinalização dos receptores tipo NOD	4,7

KEEG: Enciclopédia de Kyoto de Genes e Genomas.

A Figura 19 demonstra o diagrama de Venn realizado com a intersecção dos conjuntos de CpGDMs nas pacientes com peso adequado que receberam placebo ou suplementação com mix de vitaminas. Observou-se que apenas duas CpGs (cg22529822 e cg27057071) foram comuns entre ambas as comparações, evidenciando uma modificação no perfil de metilação do DNA diferente com placebo ou suplementação.

Figura 19 - Diagrama de Venn das CpGs diferentemente metiladas após uso de placebo ou suplementação com vitamina B12 e ácido fólico entre pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e peso adequado.



PLA: placebo; INT: intervenção.

5.8.2 Grupo EP

A comparação do perfil de metilação do DNA das pacientes do grupo EP que receberam placebo revelou 451 CpGs CpGDMs, estando estas localizadas em 321 genes (Figura 20). A maioria dessas CpGDMs encontrava-se na região *N-shore* (Figura 21A) e no corpo do gene (Figura 21B).

Figura 20 - *Heatmap* das CpGs diferentemente metiladas após uso de placebo entre pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e excesso de peso.

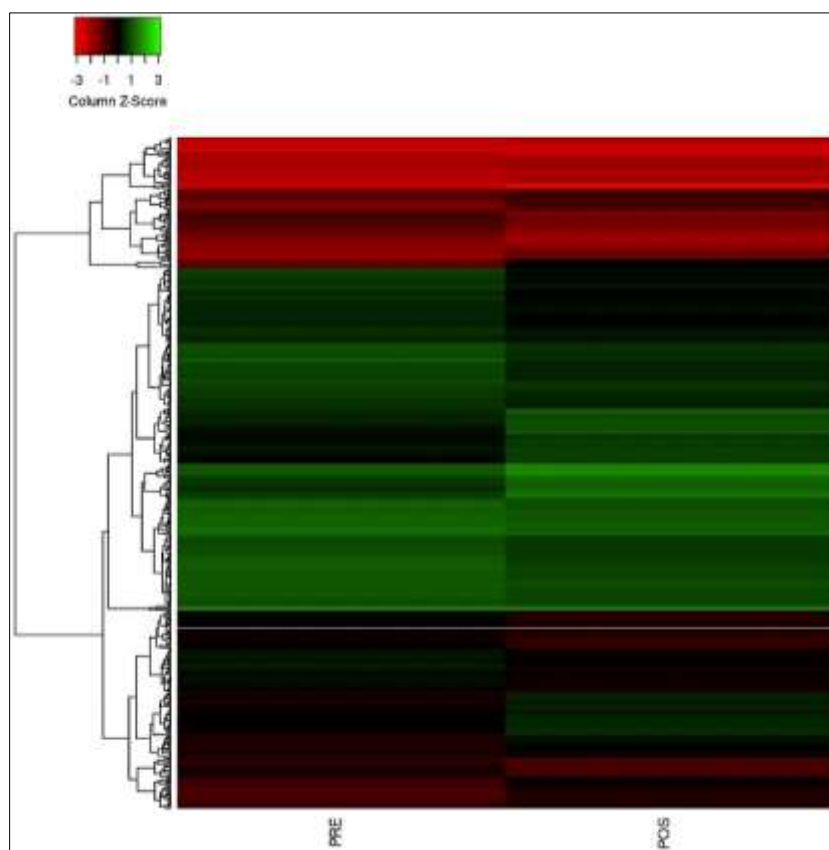
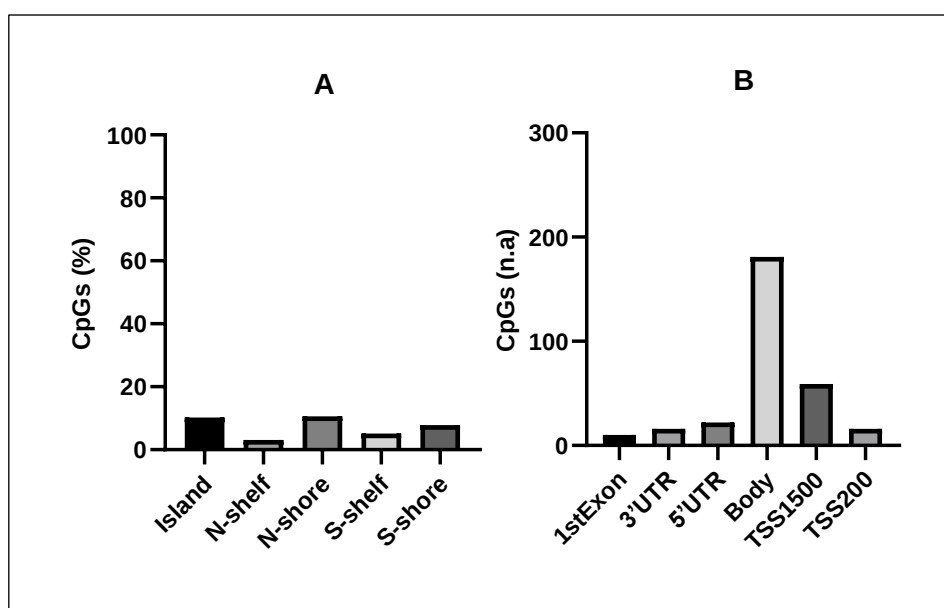


Figura 21 - Distribuição das CpGs diferentemente metiladas após uso de placebo entre pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e excesso de peso ao longo do gene.



A: Regiões gênicas dos sítios CpG do grupo EP placebo comparando os períodos pré e pós-intervenção; B: Distribuição genômica de locais CpG do grupo EP placebo comparando os períodos pré e pós-intervenção. n.a.: número absoluto.

Observou-se que 22,6% das CpGDMs encontravam-se na região promotora de genes. Desta, 49 CpGs estavam hipermetiladas em pacientes no período pós-intervenção, sendo que a variação foi de 5 a 17%. Tais CpGDMs foram relacionadas a 55 genes conhecidos. Por outro lado, observou-se 53 CpGs hipometiladas no período pós-intervenção (relacionadas a 55 genes conhecidos) e a variação foi de 5 a 17%.

A Tabela 15 mostra as 20 principais CpGDMs em regiões promotoras de genes entre pacientes com excesso de peso após uso de placebo. As diferenças mais significativas observadas foram para os genes *KIAA0182* e *LINC01280* ($\Delta=17\%$).

Dentre as CpGDMs hipermetiladas, 15 genes foram anotados para as categorias funcionais selecionadas e na lista de referências, sendo assim utilizados para a análise de enriquecimento (Tabela 16).

Dentre as CpGDMs hipometiladas, 18 genes foram anotados para as categorias funcionais selecionadas e na lista de referências, sendo assim utilizados para a análise de enriquecimento (Tabela 17).

Tabela 15 - Top 20 principais CpGs em regiões promotoras diferentemente metiladas em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e excesso de peso após uso de placebo.

CpG	Metilação do DNA		Δ	Gene	Posição no gene
	Pré	Pós			
Hipermetiladas após uso de placebo					
cg08114245	0,76±0,06	0,66±0,09	0,11	KCNJ11;KCNJ11	1stExon;Body
cg16760049	0,76±0,06	0,65±0,11	0,11	PICK1;PICK1;PICK1	TSS1500;TSS1500;TSS1500
cg01307483	0,60±0,08	0,49±0,06	0,11	NRF1	5'UTR
cg17039519	0,52±0,07	0,41±0,07	0,12	ERBB2IP;ERBB2IP	5'UTR;5'UTR
cg10749808	0,43±0,06	0,32±0,06	0,12	TMEM30B;TMEM30B	1stExon;3'UTR
cg19547187	0,58±0,09	0,46±0,08	0,12	MECR;MECR	TSS1500;TSS1500
cg00007675	0,61±0,05	0,49±0,11	0,12	LOC728024;ERLIN2	TSS1500;Body
cg05355216	0,46±0,08	0,34±0,04	0,12	FLT3;FLT3	TSS1500;TSS1500
cg18247691	0,73±0,08	0,58±0,12	0,15	CDH23;CDH23;CDH23;CDH23;CDH23	TSS1500;TSS1500;Body;Body;Body
cg09743650	0,59±0,11	0,42±0,09	0,17	KIAA0182;KIAA0182	5'UTR;Body
Hipometiladas após uso de placebo					
cg09162385	0,40±0,09	0,57±0,12	0,17	LINC01280	TSS1500
cg03134000	0,54±0,08	0,69±0,11	0,15	FLI1;FLI1;FLI1;FLI1	5'UTR;5'UTR;5'UTR;Body
cg13858481	0,63±0,10	0,77±0,09	0,14	TSHZ2;TSHZ2	TSS200;Body
cg27245649	0,30±0,10	0,43±0,09	0,13	DGKH	TSS1500
cg06558326	0,53±0,08	0,65±0,08	0,12	B3GAT3;B3GAT3;B3GAT3;B3GAT3;B3GAT3	TSS1500;TSS1500;TSS1500;TSS1500;TSS1500
cg16082253	0,50±0,06	0,62±0,07	0,12	DNHD1;DNHD1	TSS1500;TSS1500
cg13121780	0,58±0,08	0,70±0,05	0,12	MOCS1;MOCS1;MOCS1;MOCS1	1stExon;5'UTR;Body;Body
cg17223707	0,16±0,08	0,28±0,10	0,11	ZNF331;ZNF331;ZNF331;ZNF331;ZNF331;ZNF331	TSS1500;TSS1500;5'UTR;5'UTR;5'UTR;5'UTR
cg05018300	0,69±0,08	0,79±0,04	0,10	MICAL3	5'UTR
cg04651166	0,64±0,07	0,57±0,08	0,10	PSAT1;PSAT1	TSS1500;TSS1500

Dados apresentados em média ± desvio padrão.; Δ : diferença entre pré e pós; p : valor de significância estabelecido em $p < 0,001$.

Tabela 16 - Vias metabólicas relacionadas aos genes hipermetilados em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e excesso de peso adequado após uso de placebo.

KEEG	Via Metabólica	Razão de enriquecimento
hsa00360	Metabolismo da fenilalanina	29,3
hsa04930	Diabetes mellitus tipo II	21,6
hsa00340	Metabolismo da histidina	21,6
hsa05221	Leucemia mieloide aguda	15,1
hsa05031	Dependência de anfetaminas	14,6
hsa00982	Metabolismo de drogas	13,8
hsa04911	Secreção de insulina	11,7
hsa04640	Linhagem de células hematopoiéticas	10,3
hsa0472	Sinalização endocanabinoide retrógrada	6,7
hsa05202	Desregulação transcricional no câncer	5,35

KEEG: Enciclopédia de Kyoto de Genes e Genomas.

Tabela 17 - Vias metabólicas relacionadas aos genes hipometilados em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e excesso de peso adequado após uso de placebo.

KEEG	Via Metabólica	Razão de enriquecimento
hsa00750	Metabolismo da vitamina B6	69,1
hsa00061	Biossíntese de ácidos graxos	31,9
hsa00532	Biossíntese de glicosaminoglicanos	20,7
hsa04975	Digestão e absorção de gordura	20,2
hsa0056	Metabolismo glicerolípido	13,6
hsa00564	Metabolismo glicerofosfolípido	12,8
hsa04974	Digestão e absorção de proteínas	9,2
hsa04972	Secreção pancreática	8,6
hsa04072	Via de sinalização da fosfolipase D	5,7
hsa01100	Vias metabólicas	2,2

KEEG: Enciclopédia de Kyoto de Genes e Genomas.

A comparação do perfil de metilação do DNA das pacientes do grupo EP que receberam suplementação revelou 657 CpGs CpGDMs, estando estas localizadas em 453 genes (Figura 22). A maioria dessas CpGDMs encontrava-se na região *N-shore* (Figura 23A) e no corpo do gene (Figura 23B).

Figura 22 - *Heatmap* das CpGs diferentemente metiladas após suplementação com vitamina B12 e ácido fólico entre pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e excesso de peso.

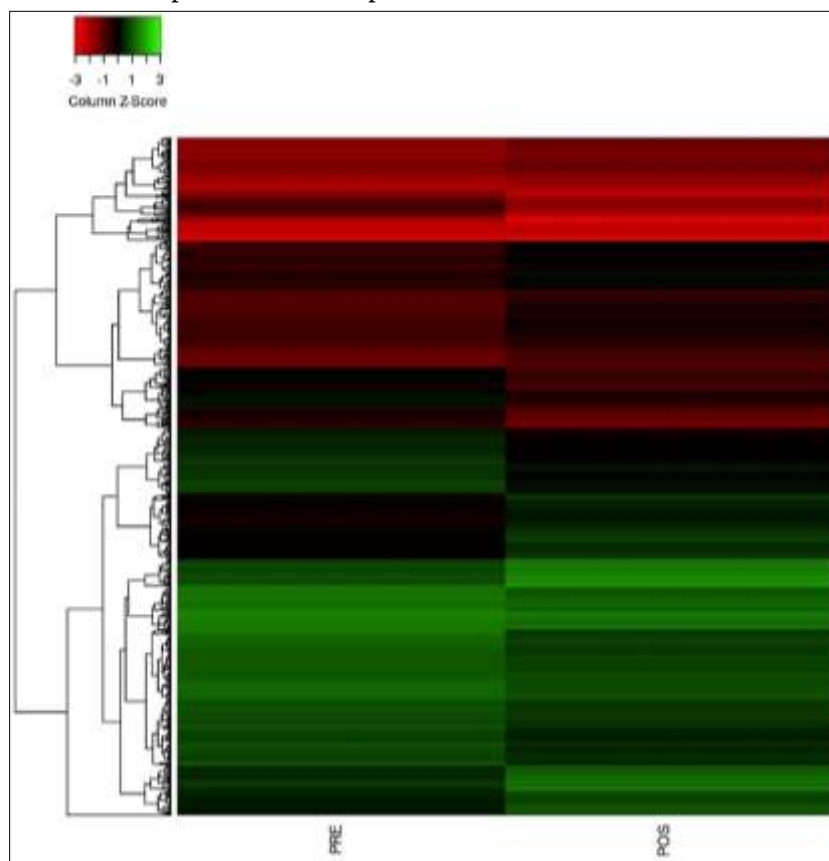
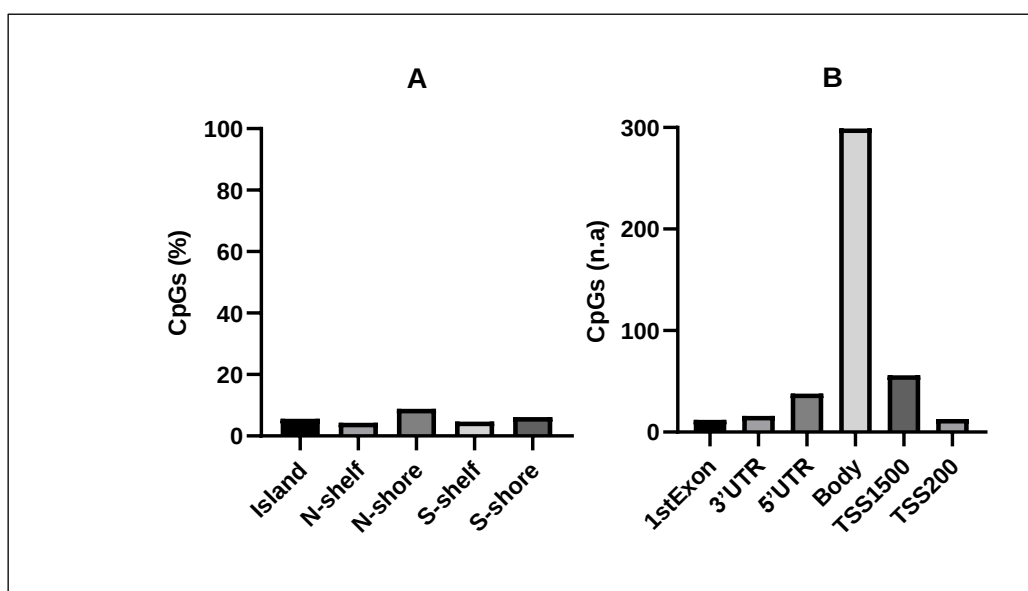


Figura 23 - Distribuição das CpGs diferentemente metiladas após suplementação com vitamina B12 e ácido fólico entre pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e excesso de peso ao longo do gene.



A: Regiões gênicas dos sítios CpG do grupo EP intervenção comparando os períodos pré e pós;
 B: Distribuição genômica de locais CpG do grupo EP intervenção comparando os períodos pré e pós. n.a.: número absoluto.

Observou-se que 18,7% das CpGDMs encontravam-se na região promotora de genes. Desta, 64 CpGs estavam hipermetiladas em pacientes no período pós-intervenção, sendo que a variação foi de 5 a 18%. Tais CpGDMs foram relacionadas a 70 genes conhecidos. Por outro lado, observou-se 59 CpGs hipometiladas no período pós-intervenção (relacionadas a 62 genes conhecidos) e a variação foi de 5 a 15%.

A Tabela 18 mostra as 20 principais CpGDMs em regiões promotoras de genes entre pacientes com excesso de peso após suplementação. As diferenças mais significativas observadas foram para os genes *FARP1* e *GPR4* ($\Delta > 15\%$).

Dentre as CpGDMs hipermetiladas, 29 genes foram anotados para as categorias funcionais selecionadas e na lista de referências, sendo assim utilizados para a análise de enriquecimento (Tabela 19).

Dentre as CpGDMs hipometiladas, 14 genes foram anotados para as categorias funcionais selecionadas e na lista de referências, sendo assim utilizados para a análise de enriquecimento (Tabela 20).

Tabela 18 - Top 20 principais CpGs em regiões promotoras diferentemente metiladas em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e excesso de peso após suplementação com vitamina B12 e ácido fólico.

CpG	Metilação do DNA		Δ	Gene	Posição no gene
	Pré	Pós			
Hipermetiladas após uso de suplemento					
cg02589949	0,59±0,07	0,48±0,09	0,12	RPL13AP20	TSS1500
cg06815865	0,73±0,05	0,60±0,13	0,12	NT5C3A;NT5C3A	TSS1500;TSS1500
cg03400731	0,69±0,05	0,55±0,15	0,14	C17orf85;C17orf85	5'UTR;Body
cg13726962	0,85±0,07	0,71±0,14	0,14	TSPYL6;ACYP2;TSPYL6	1stExon;Body;5'UTR
cg00431289	0,68±0,06	0,54±0,15	0,14	RIBC1;RIBC1;RIBC1	5'UTR;5'UTR;5'UTR
cg16648571	0,63±0,07	0,48±0,10	0,15	BLCAP;BLCAP;BLCAP;BL CAP;NNAT;NNAT;BLCAP	5'UTR;5'UTR;5'UTR;5'UTR;TSS1500; TSS1500;5'UTR
cg11106060	0,54±0,11	0,39±0,10	0,15	TRPV1;TRPV1;TRPV1	TSS1500;5'UTR;TSS200
cg07568822	0,76±0,06	0,60±0,15	0,16	CYFIP1;CYFIP1	5'UTR;5'UTR
cg02306236	0,57±0,09	0,40±0,13	0,16	PITPNM2;PITPNM2	5'UTR;5'UTR
cg01725864	0,81±0,05	0,63±0,12	0,18	FARP1;RNF113B;FARP1	5'UTR;TSS200;5'UTR
Hipometiladas após uso de suplemento					
cg14185229	0,40±0,06	0,55±0,13	0,15	GPR4	5'UTR
cg03688884	0,40±0,09	0,55±0,14	0,15	LOC100506258;SYT9	TSS1500;Body
cg03660010	0,53±0,08	0,67±0,08	0,14	SLAIN2	TSS1500
cg17890940	0,45±0,10	0,58±0,09	0,14	ELFN1	5'UTR
cg26840970	0,67±0,07	0,80±0,05	0,13	ZNF19	TSS200
cg02034222	0,61±0,05	0,73±0,08	0,12	DQX1;DQX1	1stExon;5'UTR
cg01207474	0,23±0,05	0,35±0,13	0,12	CCNY;CCNY;CCNY;CCNY; CCNY	5'UTR;5'UTR;5'UTR;Body;Body
cg25739760	0,41±0,05	0,53±0,12	0,12	PRICKLE2-AS3;PRICKLE2	TSS1500;Body
cg10995873	0,48±0,08	0,59±0,08	0,12	ZBTB20;ZBTB20;ZBTB20;Z BTB20;ZBTB20;ZBTB20;ZB TB20	5'UTR;5'UTR;5'UTR;5'UTR;5'UTR;5' UTR;TSS200
cg27405706	0,43±0,08	0,55±0,09	0,11	TFF1	TSS200

Dados apresentados em média $\pm$ desvio padrão.; Δ : diferença entre pré e pós; p : valor de significância estabelecido em $p < 0,001$.

Tabela 19 - Vias metabólicas relacionadas aos genes hipermetilados em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e excesso de peso após suplementação com vitamina B12 e ácido fólico.

KEEG	Via Metabólica	Razão de enriquecimento
hsa04964	Recuperação de bicarbonato do túbulo proximal	22,4
hsa00620	Metabolismo do piruvato	13,2
hsa04976	Secreção biliar	7,2
hsa04911	Secreção de insulina	6,1
hsa04970	Secreção de saliva	5,7
hsa04974	Digestão e absorção de proteínas	5,7
hsa04972	Secreção pancreática	5,4
hsa00240	Metabolismo da pirimidina	5,1
hsa04922	Via de sinalização do glucagon	5,0
hsa04668	Via de sinalização TNF	4,7

KEEG: Enciclopédia de Kyoto de Genes e Genomas.

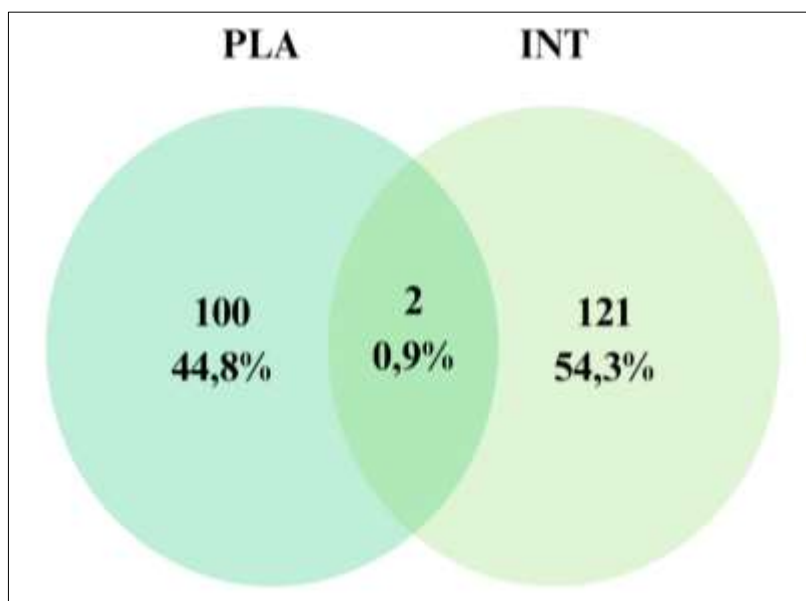
Tabela 20 - Vias metabólicas relacionadas aos genes hipometilados em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e excesso de peso após suplementação com vitamina B12 e ácido fólico.

KEEG	Via Metabólica	Razão de enriquecimento
hsa00450	Metabolismo do selenocomposto	31,4
hsa04966	Secreção ácida do ducto	19,7
hsa00630	Metabolismo de glioxilato e dicarboxilato	17,8
hsa00562	Metabolismo de fosfato de inositol	14,4
hsa00260	Metabolismo de glicina, serina e treonina	13,3
hsa00380	Metabolismo do triptofano	13,3
hsa04070	Sistema de sinalização de fosfatidilinositol	10,8
hsa00190	Fosforilação oxidativa	8,0
hsa04971	Secreção de ácido gástrico	7,1
hsa04530	Junção aderente	6,3

KEEG: Enciclopédia de Kyoto de Genes e Genomas.

A Figura 24 demonstra o diagrama de Venn realizado com a intersecção dos conjuntos de CpGDMs nas pacientes com excesso de peso que receberam placebo ou suplementação com mix de vitaminas. Observou-se que apenas duas CpGs (cg06381088 e cg01725864) foram comuns entre ambas as comparações, evidenciando uma modificação no perfil de metilação do DNA diferente com placebo ou suplementação.

Figura 24 - Diagrama de Venn das CpGs diferentemente metiladas após uso de placebo ou suplementação com vitamina B12 e ácido fólico entre pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e excesso de peso.

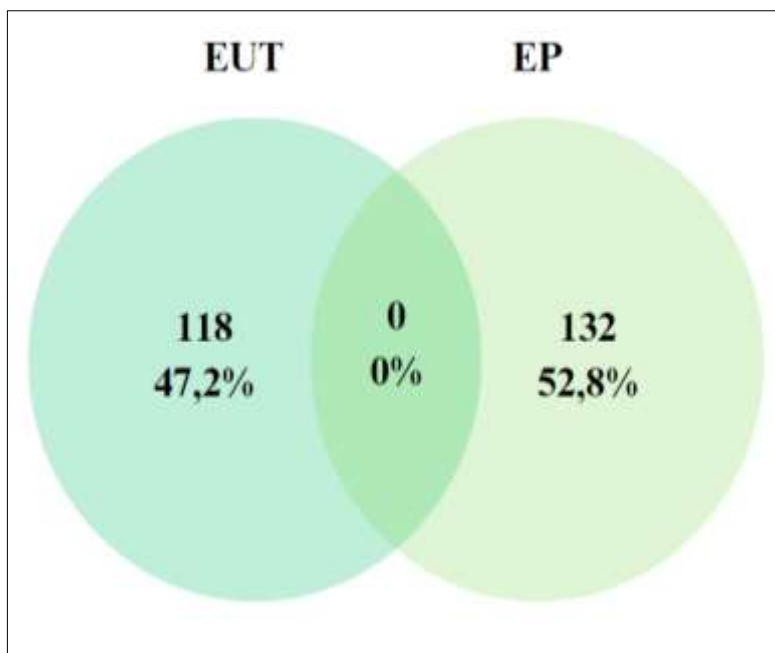


PLA: grupo placebo; INT: grupo intervenção.

5.8.3 Comparação entre grupos (EUT versus EP)

A Figura 25 demonstra o diagrama de Venn realizado com a intersecção dos conjuntos de CpGDMs nas pacientes com peso adequado ou excesso de peso que receberam a suplementação com mix de vitaminas. Não foi observada nenhuma CpGDM em comum.

Figura 25 - Diagrama de Venn das CpGs diferentemente metiladas após suplementação com vitamina B12 e ácido fólico entre pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e peso adequado ou excesso de peso.



EUT: grupo de pacientes com peso adequado; EP: grupo de pacientes com excesso de peso.

5.9. Expressão gênica no tecido adiposo

A Tabela 21 apresenta o efeito da intervenção na expressão dos genes alvos nos grupos EUT e EP. A intervenção (placebo ou suplementação) não modificou a expressão de nenhum dos genes avaliados em ambos os grupos.

Tabela 21 – Expressão de genes alvos após uso de placebo ou suplementação com vitamina B12 e ácido fólico nas pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e peso adequado ou excesso de peso.

Expressão gênica ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)			Pós	p^*	p^{**}
<i>DNMT1</i>	EUT	INT	3,6 (-0,5 - 7,7)	0,62	1,00
		PLA	5,9 (-2,4 - 14,2)		1,00
	EP	INT	3,1 (0,4 - 5,8)	0,51	0,78
		PLA	2,0 (0,6 - 3,5)		0,84
<i>STAT3</i>	EUT	INT	1,1 (0,3 - 1,8)	0,50	1,00
		PLA	0,73 (0,4 - 1,1)		0,72
	EP	INT	1,4 (0,3 - 2,6)	0,31	1,00
		PLA	0,8 (0,5 - 1,1)		1,00
<i>LEP</i>	EUT	INT	3,1 (0,3 - 5,9)	0,13	0,88
		PLA	0,9 (0,3 - 1,4)		1,00
	EP	INT	5,5 (-0,4 - 11,5)	0,68	0,83
		PLA	4,1 (0,9 - 7,2)		0,32
<i>TNF-α</i>	EUT	INT	1,5 (0,3 - 2,8)	0,10	1,00
		PLA	3,2 (1,6 - 4,8)		0,03
	EP	INT	0,6 (0,07 - 1,0)	0,62	0,47
		PLA	0,8 (0,1 - 1,4)		1,00
<i>IL-6</i>	EUT	INT	3,2 (0,7 - 5,8)	0,08	0,51
		PLA	0,9 (0,6 - 1,2)		1,00
	EP	INT	0,8 (0,3 - 1,3)	0,39	1,00
		PLA	1,5 (0,09 - 2,8)		1,00
<i>MTHFR</i>	EUT	INT	2,1 (0,5 - 3,7)	0,99	1,00
		PLA	2,1 (0,2 - 3,9)		1,00
	EP	INT	2,2 (-0,4 - 4,9)	0,27	1,00
		PLA	0,7 (0,2 - 1,2)		1,00

Dados apresentados em médias marginais estimadas e intervalo de confiança de 95%. DNMT1: DNA metiltransferase; STAT3: transdutor de sinal e ativador de transcrição 3; TNF: fator de necrose tumoral; IL-6: interleucina 6; MTHFR: metilenotetrahidrofolato redutase; LEP: leptina; EUT: grupo eutrofia; EP: grupo excesso de peso; PLA: placebo; INT: intervenção; p^* : interação entre grupos (PLA vs. INT); p^{**} : interação do tempo (pré vs. pós) dentro do grupo. Valores do momento pré correspondente a 1.

Discussão

6. DISCUSSÃO

Ao nosso conhecimento este é o primeiro estudo a testar o efeito de uma suplementação com nutrientes doadores de grupo metil no perfil de metilação do DNA de tecido adiposo em pacientes com LES em diferentes estados nutricionais. Após três meses, observou-se que a suplementação de ácido fólico e vitamina B12 promoveu mudanças nos níveis de metilação do DNA de pacientes com LES, entretanto, o efeito da suplementação foi diferente entre aquelas com peso adequado ou com excesso de peso. Apesar das mudanças no perfil de metilação do DNA, não foram observadas alterações da expressão gênica e das concentrações séricas de adipocinas e marcadores inflamatórios.

É importante destacar que foi possível selecionar grupos bem homogêneos em relação a características sociodemográficas, clínicas, antropométricas, de composição corporal e bioquímicas, ou seja, a maioria dos dados basais das pacientes que receberam placebo foi semelhante aos daquelas que receberam suplemento, tanto para o grupo EUT como para o grupo EP. A diferença de idade encontrada entre as pacientes do grupo EUT que receberam placebo ou suplementação talvez possa ser considerada uma limitação do estudo, sobretudo em termos de epigenética; entretanto, considerando que todas as pacientes incluídas estavam em idade fértil, acredita-se que a diferença encontrada não tenha tido um impacto relevante nos nossos achados. Além disso, as concentrações séricas de adiponectina nas pacientes com peso adequado que receberam placebo eram maiores daquelas que receberam suplementação. Apesar da adiponectina ser secretada pelo tecido adiposo¹²¹, não foram observadas diferenças no percentual de massa gorda entre as pacientes do grupo EUT que receberam as diferentes intervenções.

Curiosamente, nossos resultados revelaram um percentual de gordura elevado entre as pacientes do grupo EUT ($31,6 \pm 4,2\%$). Nesse sentido, parece que o LES está indiretamente associado a um volume aumentado de tecido adiposo independente do IMC. Nessa perspectiva, a literatura apresenta alguns fatores associados ao LES que podem contribuir com esse cenário, como a própria atividade da doença, mediadores inflamatórios ou o uso de determinados fármacos envolvidos no tratamento^{195,196}. Apesar da ampla associação entre os corticoides e o aumento de gordura corporal, poucas pacientes incluídas no presente estudo faziam uso desse tipo de medicamento, portanto acredita-se que o caráter inflamatório sistêmico da doença talvez pode estar mais fortemente associado a esse desfecho. Um estudo que objetivou avaliar o tecido adiposo em pacientes com LES no período pré-menopausa demonstrou que a presença de LES

se associava ao aumento do tecido adiposo visceral e que este aumento consequentemente se associava a um maior risco cardiovascular¹⁹⁷. Ainda, um ensaio clínico randomizado conduzido no mesmo ambulatório de reumatologia em que foi conduzido o presente estudo demonstrou um percentual de gordura basal elevado em pacientes com LES. Pacientes com LES que praticaram atividade física apresentaram um percentual de gordura de $33,5 \pm 5,4\%$, enquanto pacientes com LES sedentários apresentaram um valor de $34,9 \pm 4,5\%$, sugerindo que talvez essa seja uma característica comum nessa população¹⁹⁸.

Cabe aqui ressaltar que o padrão do consumo alimentar e da prática de atividade física se mantiveram ao longo do estudo, tanto nas pacientes que receberam placebo como naquelas que receberam suplemento, em ambos os grupos. Considerando que a alimentação e a prática de atividade física são fatores que modulam os processos epigenéticos^{199,200}, esses resultados mostram que as pacientes incluídas não modificaram seu estilo de vida e hábitos alimentares durante os três meses de intervenção.

A literatura a respeito dos efeitos da suplementação de nutrientes doadores de metil nas características fenotípicas e epigenéticas é vasta, principalmente devido a heterogeneidade dos protocolos de suplementação em relação ao tempo, quantidade do micronutriente suplementado e perfil dos pacientes^{154,155,201}. Considerando o LES, alguns estudos conduzidos com humanos avaliaram associações entre concentrações séricas ou consumo alimentar desses nutrientes com certos desfechos da doença^{202,203}. Já estudos em modelos animais associaram a suplementação à melhora dos sintomas do LES e ao aumento da expectativa de vida^{204,205}. Nenhum ensaio clínico randomizado e controlado por placebo avaliou anteriormente os efeitos de uma suplementação com nutrientes doadores do grupo metil nas características fenotípicas e maquinaria epigenética de pacientes com LES. Estudo *in vitro* com populações de células B CD19+ de pacientes com LES cultivadas em ácido fólico não demonstrou efeito do tratamento nos níveis de metilação do DNA²⁰⁶. Por outro lado, resultados de cultivo de células T CD4+ de pacientes com LES mostraram que baixos níveis de micronutrientes de transmetilação podem aumentar a expressão de genes de células T sensíveis à metilação²⁰⁷. Corroborando, baixos níveis de doadores de grupo metil, juntamente com sinalização de Erk prejudicada, promoveu uma hipometilação do gene CD40l em modelo animal transgênico de LES²⁰⁸. No entanto, um estudo de associação transversal conduzido com 61 mulheres com LES (média de idade $45,7 \pm 12,0$ anos) demonstrou que a ingestão de certos nutrientes se associou aos níveis de metilação do DNA e possivelmente à atividade da doença. Mais especificamente, os autores demonstraram que o perfil de metilação da CpG17 na região promotora do ligante CD40

(*CD40L*) de células T associou-se com o SLEDAI e com a ingestão de metionina, colina e cisteína²⁰².

Conforme esperado, observou-se aumento das concentrações séricas de vitamina B12 e ácido fólico em ambos os grupos (EUT e EP) após a ingestão do suplemento. Um estudo com homens com sobrepeso ou obesidade e DM2 mostrou que a suplementação diária de 5 mg de ácido fólico durante 8 semanas induziu um aumento das concentrações séricas de ácido fólico e vitamina B12 de 19% e 17,3%, respectivamente²⁰⁹. Um ensaio clínico que avaliou o efeito da suplementação de ácido fólico durante a gestação mostrou que as gestantes que fizeram uso de altas doses de ácido fólico (4 mg/dia) apresentaram maior folato sérico total em comparação com o grupo de dose baixa (1 mg/dia)²¹⁰. Um estudo que objetivou investigar os efeitos da suplementação de ácido fólico (400 µg) e vitamina B12 (500 µg) em idosos demonstrou um aumento das concentrações séricas de vitamina B12 e ácido fólico durante os dois anos de intervenção¹⁵⁹. Outro estudo demonstrou que homens e mulheres com adenoma colorretal e IMC médio de 25,3 kg/m² suplementados com 400 µg/dia de ácido fólico por dez semanas também tiveram as concentrações séricas de ácido fólico aumentadas após a intervenção¹⁵⁴.

Ainda, não foram observadas modificações nas medidas antropométricas e de composição corporal, assim como do perfil lipídico, glicemia e marcadores inflamatórios (expressão gênica e valores séricos) após a suplementação tanto nas pacientes com peso adequado como naquelas com excesso de peso. Uma recente revisão sistemática e meta-análise de 38 ensaios clínicos randomizados que avaliou os efeitos da suplementação de ácido fólico sobre triglicerídeos, colesterol total, LDL e HDL em uma coorte de 21.787 participantes mostrou que as concentrações séricas de triglicerídeos e colesterol total foram significativamente reduzidas após a suplementação de ácido fólico em comparação com o placebo²¹¹, tanto na população geral como em sub análises com indivíduos com síndrome metabólica. Em adição, uma meta-análise com 12 estudos clínicos randomizados mostrou que a suplementação de ácido fólico reduziu as concentrações séricas de PCR, mas sem efeitos significativos sobre IL-6 e TNF- α . Ressalta-se que a maioria dos estudos foi conduzida em pacientes de ambos os gêneros, sendo que a idade média dos participantes variou de 24,1 a 68,1 anos; o IMC basal médio variou de 23,2 a 30,7 kg/m²; o período de suplementação variou de 2 a 52 semanas e a dosagem diária de ácido fólico variou entre 0,8 e 10 mg/dia²¹². Em um outro estudo com indivíduos com excesso de peso no qual a suplementação de ácido fólico a curto prazo (2,5 mg/dia) também não alterou as concentrações séricas de IL-6, apesar da redução das concentrações de PCR, os autores sugerem que as modificações dos marcadores inflamatórios

podem ser mais diretamente dependentes da perda de massa gorda do que possíveis efeitos do ácido fólico²¹³.

A literatura aponta importantes características do ácido fólico na modulação da inflamação e do perfil lipídico. O primeiro fator seria devido às propriedades antioxidantes conhecidas do ácido fólico^{212,214} que promovem a supressão da peroxidação lipídica e do estresse oxidativo^{212,215}. A redução na concentração de homocisteína decorrente da suplementação de ácido fólico é o segundo fator possível. No ciclo de 1C, a homocisteína pode ser convertida em metionina no processo de remetilação, processo este que depende da disponibilidade de ácido fólico¹⁶². Na deficiência de ácido fólico, a homocisteína elevada (hiperhomocisteinemia) pode acarretar em piores desfechos inflamatórios e clínicos no LES, como um maior risco cardiovascular²¹⁶ e maior comprometimento renal nesses pacientes²¹⁷. O terceiro e principal fator seria na regulação do perfil de metilação do DNA, já que uma hipermetilação de genes envolvidos na cascata inflamatória ou em vias metabólicas de autoimunidade poderia refletir na menor expressão gênica e menor secreção de citocinas e/ou ativação de células imunes¹²⁸. Em busca de razões que justificassem tais efeitos não terem sido observados no presente estudo, foram levantadas algumas hipóteses. Como mencionado anteriormente, os estudos cuja intervenção foi baseada na suplementação de micronutrientes doadores de grupo metil são muito heterogêneos entre si no que se refere a dose e tempo de tratamento. Nesse sentido, a dose administrada de 400 mcg e o tempo de três meses talvez não tenham sido suficientes para que resultados nos marcadores inflamatórios fossem observados. Ainda, a concentração sérica de ácido fólico estava dentro na normalidade desde a análise basal, fator este que também pode ter influenciado no resultado em questão.

Como principal achado do presente estudo, observou-se modificações do perfil de metilação do DNA tanto em pacientes com LES e peso adequado, quanto naquelas com excesso de peso; assim como naquelas que receberam placebo ou suplemento. Da mesma maneira, o enriquecimento das vias metabólicas demonstrou diferentes vias associadas aos quatro grupos do estudo: 1) pacientes com peso adequado que receberam placebo; 2) pacientes com peso adequado que receberam suplementação; 3) pacientes com excesso de peso que receberam placebo e 4) pacientes com excesso de peso que receberam suplementação.

Considerando as pacientes com LES e peso adequado, observou-se que os genes diferentemente metilados depois da administração de placebo se relacionavam a vias metabólicas de sinalização do Wnt e de regulação de diversos tipos de câncer. Apesar da via de sinalização Wnt/ β -catenina desempenhar papel importante na imunidade, esta é relativamente pouco estudada em doenças com caráter autoimune²¹⁸. Estudos prévios

demonstraram que a via de sinalização Wnt/ β -catenina regula a proliferação de células pré-B, a resposta do IFN-1²¹⁹, além de bloquear o fator NF- κ B²²⁰, reduzindo o processo inflamatório²¹⁸. No LES, estudos prévios com modelo animal e humanos evidenciaram atividade transcricional diminuída de β -catenina em leucócitos²²¹ e no presente estudo observou-se que genes dessa via foram tanto hipo como hipermetilados após o uso de placebo. Ainda nesses pacientes, genes relacionados às vias metabólicas associadas ao câncer (câncer de mama e câncer gástrico) foram hipermetilados após o uso de placebo. A literatura demonstra resultados controversos e inconsistentes no que se refere ao LES e os riscos de desenvolvimento de câncer. Os resultados de uma revisão sistemática com meta-análise que incluiu 24 estudos com pacientes com LES sugeriram que essa doença pode ser associada ao risco aumentado para o desenvolvimento de 16 tipos de câncer em ambos os sexos, como o câncer gástrico e renal. Por outro lado, a revisão demonstrou que o LES foi associado a um menor risco para câncer de próstata e melanoma cutâneo, ao passo que não apresentou associações significativas com o câncer de mama, útero, ovário, pâncreas, cérebro e câncer colorretal²²². A literatura ainda é inconsistente e controversa no que se refere ao LES e aos diferentes tipos de câncer, entretanto nossos resultados fornecem sugestões de que mudanças no perfil de metilação realmente podem estar associadas ao metabolismo da carcinogênese, ainda que não se saiba se positivamente ou negativamente.

Por outro lado, no grupo de pacientes com LES e peso adequado que receberam suplemento de mix de vitaminas, observou-se que os genes hipermetilados se relacionavam a vias metabólicas como a de sinalização do câncer, metabolismo de xenobióticos pelo citocromo P450 e metabolismo de drogas. Curiosamente, as vias metabólicas anotadas englobam dois genes principais: família UDP glucuronosiltransferase 1 membro A9 (*UGT1A9*) e A10 (*UGT1A10*). Tais genes codificam enzimas da via de glicuronidação que transforma pequenas moléculas lipofílicas, como esteróides, bilirrubina, hormônios e medicamentos, em metabólitos excretáveis e solúveis em água²²³. O citocromo P450 se refere a uma família de enzimas (CYP450s) responsáveis por catalisar as reações do metabolismo de medicamentos e substâncias estranhas ao organismo (xenobióticos)^{224,225}. A ativação da via de metabolismo de xenobióticos pelo citocromo P450 pode ter tanto efeitos benéficos quanto adversos, dependendo do contexto. Por um lado, o metabolismo dos xenobióticos pelo citocromo P450 é uma parte crucial do sistema de desintoxicação do organismo, ajudando na eliminação de medicamentos, toxinas ambientais e produtos químicos sintéticos. Por outro lado, em certos casos, o metabolismo pelo citocromo P450 pode resultar na ativação de substâncias pró-drogas em formas tóxicas ou na produção de metabólitos reativos que podem causar danos às células

e tecidos. Além disso, a atividade aumentada do citocromo P450 pode influenciar a eficácia e a segurança de medicamentos, potencialmente levando a interações medicamentosas indesejadas ou à redução da eficácia terapêutica de certos medicamentos. Evidências muito antigas reportam a possibilidade de que metabólitos resultantes de reações catalisadas pelo P450 estejam envolvidos na geração de autoimunogênicos identificado no LES²²⁶, fato esse pouco estudado recentemente. Não foram encontrados estudos que investigassem a relação entre os efeitos da suplementação de micronutrientes sobre o metabolismo de xenobióticos no LES. Assim, sugere-se que a hipermetilação do DNA de genes relacionados a essa via após a suplementação possa estar associada a menor produção de metabólitos secundários reativos a autoimunidade.

São limitados os estudos que visam investigar o efeito da suplementação com micronutrientes doadores de metil no metabolismo do câncer, embora esteja claro na literatura que o processo de metilação do DNA por meio do metabolismo de 1C e da regulação da expressão gênica podem influenciar de diferentes maneiras na carcinogênese²²⁷⁻²³⁰. Um ensaio clínico randomizado duplo-cego controlado por placebo, no qual suplementou-se ácido fólico na dosagem de 400 µg/dia durante 10 semanas não mostrou resultados significativos ao determinar se a suplementação com ácido fólico poderia alterar o perfil de metilação do gene receptor de estrogênio alfa 1 (*ESR1*) e homólogo de MutL 1 (*MLH1*) em indivíduos com adenoma colorretal²⁰¹. Por outro lado, um estudo conduzido com camundongos com câncer gástrico demonstrou que a suplementação com ácido fólico alternada entre 2 mg/kg (dieta padrão) e 8 mg/kg (dieta suplementada) em diferentes momentos dentro de 36 semanas pareceu ter um efeito quimiopreventivo por meio da supressão da inflamação advinda da prevenção de perda da metilação global do DNA²³¹. Nesse sentido, nosso estudo sugere que a suplementação com nutrientes doadores de grupo metil talvez possa modular positivamente o perfil de metilação nesses pacientes de forma que haja uma hipermetilação de genes envolvidos na carcinogênese.

Além disso, foi observada uma hipometilação nos genes envolvidos na via de sinalização dos receptores do tipo domínio de oligomerização e ligação a nucleotídeos (NOD ou NLRs do inglês *NOD-like receptors*) após uso de suplemento entre pacientes com peso adequado. Os receptores do tipo NOD são proteínas que agem a nível intracelular e possuem papel estabelecido na imunidade inata e adaptativa e no metabolismo do inflamassoma, um complexo formado por uma molécula de receptor nuclear, uma molécula efetora e moléculas de acoplamento. Dentre a família dos NLRs, o NLRC4, NLRP1, NLRP3, NLRP6 e NLRP12 são alguns dos receptores mais comumente abordados pela literatura no que se refere à

participação na formação de inflamassomas²³². Portanto os NLRs são capazes de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ao passo que ativam vias de sinalização envolvidas na resposta inflamatória, como a via do NF- κ B caracterizada pela produção de citocinas como o TNF- α e [IL]- 6 e 1 β ^{233,234}. Em comparação a controles saudáveis, alguns autores demonstraram expressão de NOD2 aumentada em monócitos e células dendríticas em pacientes com LES²³⁵. Ainda, um número considerável de estudos investigou a relação dessa via metabólica com a nefrite lúpica, uma vez que os NLRs são expressos em diferentes tecidos renais no LES^{232,236–239}. De modo geral, evidências associaram uma maior ativação do inflamassoma NLRP3 à patogênese da nefrite lúpica por meio da produção de citocinas pró-inflamatórias^{236,237,240,241}. Em contrapartida, um ensaio clínico conduzido com pacientes com LES e controles saudáveis demonstrou um padrão de baixa expressão de NLRP12 em células mononucleares de pacientes doentes, padrão este associado a maior expressão de IFN- α , exacerbação da produção de autoanticorpos, maior atividade da doença e consequente comprometimento da função renal, sugerindo que uma baixa expressão do NLRP12 associa-se a piores desfechos no LES²³⁸. De fato, os estudos que investigaram a relação desses receptores com o LES ainda são muito controversos, ao passo que não existem estudos que associaram a suplementação de micronutrientes, metilação do DNA e a via metabólica dos NLRs.

As análises realizadas no grupo de pacientes com LES e excesso de peso que receberam placebo evidenciaram que os genes hipermetilados se relacionavam a vias metabólicas da secreção de insulina e de DM2. A literatura demonstra que o excesso de peso pode induzir ao quadro de resistência à insulina, com consequente hiperglicemia e maior secreção de insulina pelas células β pancreáticas por consequência (hiperinsulinemia compensatória). Esse cenário poderia resultar em disfunção das células β , ou seja, menor secreção de insulina e possibilidade de desenvolvimento de DM2^{242,243}.

Ainda, analisando as modificações no perfil de metilação do DNA dos pacientes com excesso de peso, foi evidenciado uma hipermetilação de genes associados a via da secreção da insulina e de sinalização do TNF- α após a suplementação com mix de nutrientes. Dentre a via de sinalização da insulina destaca-se os genes domínio FXYD contendo regulador de transporte de íons 2 (*FXYD2*) e canal ativado por potássio e cálcio subfamília N membro 2 (*KCNN2*). Estudo *in vivo* mostrou que camundongos sem o gene *Fxyd2* são mais tolerantes à glicose devido ao aumento na massa de células β pancreáticas e nos níveis circulantes de insulina²⁴⁴. A hipermetilação desse gene em nossa casuística poderia levar a uma menor expressão gênica, corroborando com esses achados de maior secreção de insulina. Visto que, como já mencionado anteriormente, maiores quantidades de ácidos graxos não esterificados, glicerol, hormônios e

citocinas pró-inflamatórias decorrentes do excesso de tecido adiposo podem levar a resistência insulina²⁴⁵ e no LES isso é mais prevalente²⁴⁶, pode-se considerar esse efeito como um efeito positivo da suplementação nas pacientes com LES e excesso de peso.

Sabe-se que o LES e a obesidade per se associam-se a maior produção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α ^{1,5}. Nesse sentido, talvez a suplementação com ácido fólico e vitamina B12 possa ter exercido um papel “protetor” no que se refere à natureza inflamatória já conhecida nessas duas condições. Não foram encontrados estudos que abordassem a relação entre a metilação do DNA, LES e envolvimento metabólico ou expressão de TNF- α , contudo um ensaio clínico randomizado simples-cego (N=240) cujo objetivo era determinar os efeitos da suplementação isolada ou combinada com ácido fólico e vitamina B12 nos parâmetros inflamatórios demonstrou que, comparado ao grupo controle, a suplementação isolada ou combinada com 800 μ g de ácido fólico e 25 μ g de vitamina B12 durante seis meses pareceu melhorar a função cognitiva em idosos com comprometimento cognitivo leve através da redução dos níveis séricos de TNF- α , IL-6 e MCP-1. Ainda, o estudo demonstrou que a suplementação combinada foi significativamente mais eficaz do que a suplementação isolada com ácido fólico em todos os desfechos²⁴⁷.

Finalmente, genes relacionados a via metabólica da fosforilação oxidativa e do metabolismo de glicina, serina e treonina foram hipometilados nos pacientes com excesso de peso após uso de suplemento. Uma revisão da literatura sugeriu que vitaminas do complexo B como a vitamina B12 e o ácido fólico podem desempenhar papéis importantes no processo de fosforilação oxidativa e função mitocondrial por meio da transferência de grupo metil já conhecida no metabolismo de 1C²⁴⁸. Essa mesma revisão associou o folato e a vitamina B12 à prevenção do estresse oxidativo e toxicidade mitocondrial e, ainda, demonstrou que 30 a 50% dos folatos celulares se localizam nas mitocôndrias e são cruciais no ciclo da serina e glicina. O que ocorre é que o folato é necessário na síntese de glicina por meio da enzima serina hidroximetil transferase (SHMT) e na clivagem de serina para formação de 5,10-metileno THF^{248,249}. Em outras palavras, o metabolismo do folato, da vitamina B12, glicina e serina são interligados entre si no que se refere ao metabolismo de 1C, sendo cruciais no processo de produção de energia celular (fosforilação oxidativa). De fato, os resultados de uma revisão sistemática com meta-análise que incluiu 13 estudos envolvendo 1.013 indivíduos sugeriram que a suplementação com ácido fólico pode melhorar os parâmetros de defesa antioxidante de forma significativa, sobretudo em mulheres quando o período de intervenção foi menor ou igual a oito semanas devido aos maiores impactos observados²¹². Dessa vez, um ensaio clínico randomizado, duplo-cego e controlado por placebo que incluiu adultos saudáveis (mulheres e

homens) de 30 a 65 anos após suplementação durante seis meses com vitaminas do complexo B (incluindo B12, ácido fólico, tiamina, riboflavina, niacina, ácido pantotênico, piridoxina e biotina) sugeriu que a suplementação com altas doses de vitaminas no complexo B pode reduzir o estresse oxidativo por meio do aumento do metabolismo oxidativo²⁵⁰. Uma vez que o estresse oxidativo presente no LES e na obesidade já é bem elucidado pela literatura^{251–257}, a maior expressão dos genes envolvidos na via metabólica associada à fosforilação oxidativa encontrada no grupo EP intervenção talvez possa sugerir que a suplementação é capaz de modular positivamente os mecanismos de respiração celular, contribuindo para a diminuição do estresse oxidativo que permeia o LES e o excesso de peso por meio dos mecanismos epigenéticos.

É imprescindível destacar que o uso de placebo modificou o perfil de metilação do DNA no presente estudo, mesmo que de maneira diferente entre os pacientes com peso adequado e com excesso de peso. Nesse sentido, ressalta-se que são inúmeros os fatores que podem interferir na maquinaria epigenética^{258–260}. Embora não tenha sido observada modificações da alimentação e da prática atividade física, outros fatores ambientais e comportamentais não puderam ser controlados no desenho do estudo, como por exemplo estímulos ao estresse^{258,261}, uso de fármacos²⁶⁰ e exposição a toxinas²⁵⁹. Assim, é importante ressaltar que a modulação do perfil de metilação do DNA encontrada após a suplementação de ácido fólico e vitamina B12 foi diferente das modificações após uso de placebo. Análises conjuntas mostraram apenas duas regiões CpGs em comum entre as modificações após placebo ou suplemento em ambos os grupos (EUT e EP). Ainda, maiores porcentagens de CpGDMs foram identificadas entre as pacientes que receberam suplementação (55,7% no grupo EUT e 54,3 no grupo EP) em comparação às que receberam placebo.

Nessa mesma perspectiva, análises conjuntas demonstraram não haver nenhuma região CpG em comum ao comparar somente os grupos (EUT e EP) após a suplementação, o que significa dizer que um padrão de metilação diferente foi observado entre as pacientes com peso adequado e excesso de peso. Notou-se que as vias metabólicas identificadas na análise de enriquecimento entre as pacientes com peso adequado foram mais associadas aos desfechos da doença (LES), enquanto as vias metabólicas identificadas entre as pacientes com excesso de peso foram mais associadas aos distúrbios metabólicos consequentes desse estado nutricional. Assim, presume-se a ideia de que a metilação do DNA possa ter agido de maneira mais benéfica entre as pacientes com excesso de peso de forma a modular positivamente vias metabólicas associadas à inflamação, as quais são amplamente relatadas nesse perfil de pacientes.

A dosagem e o tempo de administração da suplementação implementados no presente estudo foram baseados em ensaios anteriores cuja intervenção foi a mesma, mas que incluíram diferentes perfis de pacientes, doenças, tecidos analisados e técnicas de análise de metilação do DNA. Devido a essa heterogeneidade dos estudos prévios e partindo do princípio de que esse estudo é o pioneiro nessa investigação, estabelecer um protocolo de suplementação totalmente eficaz se torna difícil. Como já discutido, apesar de não observar diferenças fenotípicas, principalmente em relação a marcadores inflamatórios, observou-se uma modulação epigenética após a suplementação em ambos os grupos (EUT e EP). Sabe-se que o momento da intervenção e a janela de exposição podem afetar os efeitos da suplementação no perfil de metilação do DNA¹⁶². Alterações nos níveis de metilação do DNA foram reportadas em estudos com intervenção a longo prazo^{154,155,159} ao passo que alterações no perfil metabólico também foram evidenciadas^{211,212}. Portanto, acredita-se que a suplementação de ácido fólico e vitamina B12 a longo prazo poderia acarretar em mudanças transcricionais (a nível de expressão gênica) e fenotípicas.

Nas pacientes com LES e peso adequado, a suplementação promoveu a hipermetilação de vias associadas ao metabolismo de drogas e xenobióticos pelo citocromo P450, ao passo que promoveu a hipometilação de genes da via de sinalização dos receptores tipo NOD (NLRs). Nas pacientes com LES e excesso de peso, a suplementação promoveu a hipermetilação da via metabólica associada ao TNF- α e promoveu a hipometilação de genes das vias metabólicas relacionadas à fosforilação oxidativa. Nossos achados demonstraram uma modulação epigenética após o protocolo de suplementação, apesar de não terem sido observadas alterações fenotípicas. Tal modulação poderia de fato exercer um papel “protetor” no LES, de forma que estímulos às vias da cascata de inflamação, do estresse oxidativo e de reativos autoimunes sejam minimizados, principalmente nos pacientes com excesso de peso associado ao LES.

Dessa forma, a nutrição de precisão parece ter um efeito crucial no manejo do LES de forma que a suplementação com ácido fólico e vitamina B12 possa ser implementada como uma importante estratégia no tratamento coadjuvante da doença por meio da modulação do perfil de metilação do DNA. Assim, uma melhor compreensão das interações entre a epigenética e a nutrição pode ser fundamental para que novas abordagens nutricionais sejam projetadas e personalizadas a fim de que uma melhor qualidade de vida seja garantida ao paciente com LES.

Conclusão

7. CONCLUSÃO

A suplementação com vitamina B12 e ácido fólico durante três meses promoveu mudanças no perfil de metilação do DNA em diversos genes e vias metabólicas, as quais foram diferentes de acordo com o estado nutricional. Apesar da modulação epigenética promovida pela suplementação, não foram observadas diferenças nos marcadores inflamatórios (expressão gênica ou concentrações séricas). Dada a natureza exploratória desse estudo, sugere-se que pesquisas futuras que explorem o potencial terapêutico da suplementação com vitamina B12 e ácido fólico no tratamento do excesso de peso associado ao LES sejam desenvolvidas, a fim de que o conhecimento sobre os efeitos da nutrição de precisão no que tange a metilação do DNA e o perfil epigenético em humanos seja ampliado.

Referências bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. Rafael-Vidal C, Pérez N, Altabás I, Garcia S, Pego-Reigosa JM. Blocking IL-17: A Promising Strategy in the Treatment of Systemic Rheumatic Diseases. *Int J Mol Sci*. 2020 Sep 26;21(19):7100.
2. Lvovich S, Goldsmith DP. Neurological Complications of Rheumatic Disease. *Semin Pediatr Neurol*. 2017 Feb;24(1):54–9.
3. Gutierrez-Arcelus M, Rich SS, Raychaudhuri S. Autoimmune diseases — connecting risk alleles with molecular traits of the immune system. *Nat Rev Genet*. 2016 Mar 15;17(3):160–74.
4. Versini M, Jeandel PY, Rosenthal E, Shoenfeld Y. Obesity in autoimmune diseases: Not a passive bystander. *Autoimmun Rev*. 2014 Sep;13(9):981–1000.
5. Martí A, Marcos A, Martínez JA. Obesity and immune function relationships. *Obesity Reviews*. 2001 May 7;2(2):131–40.
6. 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*. 2014 Nov;73(11):1914–22.
7. 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*. 2014 Jun;43(3):843–55.
8. Liu Y, Hazlewood GS, Kaplan GG, Eksteen B, Barnabe C. Impact of Obesity on Remission and Disease Activity in Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2017 Feb;69(2):157–65.
9. Li Y. Modern epigenetics methods in biological research. *Methods*. 2021 Mar;187:104–13.
10. Hoffman RW, Merrill JT, Alarcón-Riquelme MME, Petri M, Dow ER, Nantz E, et al. Gene Expression and Pharmacodynamic Changes in 1,760 Systemic Lupus Erythematosus Patients From Two Phase III Trials of BAFF Blockade With Tabalumab. *Arthritis and Rheumatology*. 2017 Mar 1;69(3):643–54.
11. Glant TT, Mikecz K, Rauch TA. Epigenetics in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *BMC Med*. 2014 Dec 26;12(1):35.
12. Desiderio A, Spinelli R, Ciccarelli M, Nigro C, Miele C, Beguinot F, et al. Epigenetics: spotlight on type 2 diabetes and obesity. *J Endocrinol Invest*. 2016 Oct 14;39(10):1095–103.
13. Ballestar E, Li T. New insights into the epigenetics of inflammatory rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2017 Oct 14;13(10):593–605.
14. Carnero-Montoro E, Alarcón-Riquelme ME. Epigenome-wide association studies for systemic autoimmune diseases: The road behind and the road ahead. *Clinical Immunology*. 2018 Nov;196:21–33.
15. 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*. 1998 Jul;128(7):1204–12.
16. Niculescu MD, Craciunescu CN, Zeisel SH. Dietary choline deficiency alters global and gene-specific DNA methylation in the developing hippocampus of mouse fetal brains. *The FASEB Journal*. 2006 Jan;20(1):43–9.
17. 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*. 2024 Feb 19;

18. Claycombe KJ, Brissette CA, Ghribi O. Epigenetics of Inflammation, Maternal Infection, and Nutrition1–3. *J Nutr*. 2015 May;145(5):1109S-1115S.
19. Anderson OS, Sant KE, Dolinoy DC. Nutrition and epigenetics: an interplay of dietary methyl donors, one-carbon metabolism and DNA methylation. *J Nutr Biochem*. 2012 Aug;23(8):853–9.
20. Prevalence of self reported musculoskeletal diseases is high [Internet]. Available from: www.annrheumdis.com
21. Frazzei G, van Vollenhoven RF, de Jong BA, Siegelaar SE, van Schaardenburg D. Preclinical Autoimmune Disease: a Comparison of Rheumatoid Arthritis, Systemic Lupus Erythematosus, Multiple Sclerosis and Type 1 Diabetes. Vol. 13, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2022.
22. Wahren-Herlenius M, Dörner T. Immunopathogenic mechanisms of systemic autoimmune disease. Vol. 382, *The Lancet*. Elsevier B.V.; 2013. p. 819–31.
23. Goldblatt F, O'Neill SG. Clinical aspects of autoimmune rheumatic diseases. *The Lancet*. 2013 Aug;382(9894):797–808.
24. Zielinski MR, Systrom DM, Rose NR. Fatigue, Sleep, and Autoimmune and Related Disorders. *Front Immunol*. 2019 Aug 6;10.
25. Pan W, Zhu S, Yuan M, Cui H, Wang L, Luo X, et al. MicroRNA-21 and MicroRNA-148a Contribute to DNA Hypomethylation in Lupus CD4⁺ T Cells by Directly and Indirectly Targeting DNA Methyltransferase 1. *The Journal of Immunology*. 2010 Jun 15;184(12):6773–81.
26. Foster MH, Ord JR. Emerging immunotherapies for autoimmune kidney disease. Vol. 15, *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. Taylor and Francis Inc.; 2019. p. 876–90.
27. Szekanecz Z, McInnes IB, Schett G, Szamosi S, Benkő S, Szűcs G. Autoinflammation and autoimmunity across rheumatic and musculoskeletal diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2021 Oct 2;17(10):585–95.
28. Zian Z, Maamar M, Aouni M El, Barakat A, Naima Ghailani Nourouti, El Aouad R, et al. Immunological and Clinical Characteristics of Systemic Lupus Erythematosus: A Series from Morocco. *Biomed Res Int*. 2018 Sep 30;2018:1–5.
29. Tian J, Zhang D, Yao X, Huang Y, Lu Q. Global epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comprehensive systematic analysis and modelling study. *Ann Rheum Dis*. 2023 Mar;82(3):351–6.
30. Ameer MA, Chaudhry H, Mushtaq J, Khan OS, Babar M, Hashim T, et al. An Overview of Systemic Lupus Erythematosus (SLE) Pathogenesis, Classification, and Management. *Cureus*. 2022 Oct 15;
31. Barber MRW, Drenkard C, Falasinnu T, Hoi A, Mak A, Kow NY, et al. Global epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol*. 2021 Sep 3;17(9):515–32.
32. Pedro EM, da Rosa Franchi Santos LF, Scavuzzi BM, Iriyoda TMV, Peixe TS, Lozovoy MAB, et al. Trace Elements Associated with Systemic Lupus Erythematosus and Insulin Resistance. *Biol Trace Elem Res*. 2019 Sep 2;191(1):34–44.
33. Kaul A, Gordon C, Crow MK, Touma Z, Urowitz MB, van Vollenhoven R, et al. Systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Dis Primers*. 2016 Jun 16;2(1):16039.
34. Fortuna G, Brennan MT. Systemic Lupus Erythematosus. *Dent Clin North Am*. 2013 Oct;57(4):631–55.
35. Liu W, Li M, Wang Z, Wang J. IFN- γ Mediates the Development of Systemic Lupus Erythematosus. *Biomed Res Int*. 2020 Oct 17;2020:1–10.

36. Richter P, Macovei LA, Mihai IR, Cardoneanu A, Burlui MA, Rezus E. Cytokines in Systemic Lupus Erythematosus—Focus on TNF- α and IL-17. *Int J Mol Sci*. 2023 Sep 22;24(19):14413.
37. Wang R, Lu YL, Huang HT, Qin HM, Lan Y, Wang JL, et al. Association of interleukin 13 gene polymorphisms and plasma IL 13 level with risk of systemic lupus erythematosus. *Cytokine*. 2018 Apr;104:92–7.
38. Wu Y, Hsing C, Chiu C, Huang H, Hsu Y. Roles of <scp>IL</scp> -1 and <scp>IL</scp> -10 family cytokines in the progression of systemic lupus erythematosus: Friends or foes? *IUBMB Life*. 2022 Feb 19;74(2):143–56.
39. López P, de Paz B, Rodríguez-Carrio J, Hevia A, Sánchez B, Margolles A, et al. Th17 responses and natural IgM antibodies are related to gut microbiota composition in systemic lupus erythematosus patients. *Sci Rep*. 2016 Apr 5;6(1):24072.
40. Imgenberg-Kreuz J, Almlöf JC, Leonard D, Sjöwall C, Syvänen AC, Rönnblom L, et al. Shared and Unique Patterns of DNA Methylation in Systemic Lupus Erythematosus and Primary Sjögren's Syndrome. *Front Immunol*. 2019 Jul 30;10.
41. Rao AP, Raghuram J. Systemic lupus erythematosus. *Indian Journal of Practical Pediatrics*. 2016 Oct 1;18(4):313–9.
42. Canny SP, Jackson SW. B Cells in Systemic Lupus Erythematosus. *Rheumatic Disease Clinics of North America*. 2021 Aug;47(3):395–413.
43. Deng Y, Tsao BP. Genetics of Human SLE. In: Dubois' Lupus Erythematosus and Related Syndromes. Elsevier; 2019. p. 54–68.
44. Tsokos GC, Lo MS, Reis PC, Sullivan KE. New insights into the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol*. 2016 Dec 22;12(12):716–30.
45. Hedrich CM, Rauen T, Apostolidis SA, Grammatikos AP, Rodriguez Rodriguez N, Ioannidis C, et al. Stat3 promotes IL-10 expression in lupus T cells through *trans*-activation and chromatin remodeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014 Sep 16;111(37):13457–62.
46. Houssiau F, Lefebvre C, Vanden Berghe M, Lambert M, Devogelaer JP, Renauld JC. Serum interleukin 10 titers in systemic lupus erythematosus reflect disease activity. *Lupus*. 1995 Oct 2;4(5):393–5.
47. Peng H, Wang W, Zhou M, Li R, Pan HF, Ye DQ. Role of interleukin-10 and interleukin-10 receptor in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol*. 2013 Sep 25;32(9):1255–66.
48. Hofmann SR, Rösen-Wolff A, Tsokos GC, Hedrich CM. Biological properties and regulation of IL-10 related cytokines and their contribution to autoimmune disease and tissue injury. *Clinical Immunology*. 2012 May;143(2):116–27.
49. Llorente L, Richaud-Patin Y, García-Padilla C, Claret E, Jakez-Ocampo J, Cardiel MH, et al. Clinical and biologic effects of anti-interleukin-10 monoclonal antibody administration in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2000 Aug;43(8):1790–800.
50. Lauwerys BR, Garot N, Renauld JC, Houssiau FA. Interleukin-10 blockade corrects impaired in vitro cellular immune responses of systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Rheum*. 2000 Sep;43(9):1976–81.
51. Siegel AM, Heimal J, Freeman AF, Hsu AP, Brittain E, Brenchley JM, et al. A Critical Role for STAT3 Transcription Factor Signaling in the Development and Maintenance of Human T Cell Memory. *Immunity*. 2011 Nov;35(5):806–18.
52. Zhang CJ, Wang C, Jiang M, Gu C, Xiao J, Chen X, et al. Act1 is a negative regulator in T and B cells via direct inhibition of STAT3. *Nat Commun*. 2018 Jul 16;9(1):2745.
53. 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*. 2011 Dec;286(50):43437–46.
54. Subramanyam SH, Tenbrock K. The cAMP responsive element modulator (CREM) is a regulator of CD4⁺ T cell function. *Biol Chem*. 2021 Nov 25;402(12):1591–6.
 55. Xu WD, Zhang YJ, Wang W, Li R, Pan HF, Ye DQ. Role of CREM in systemic lupus erythematosus. *Cell Immunol*. 2012 Mar;276(1–2):10–5.
 56. He J, Zhang R, Shao M, Zhao X, Miao M, Chen J, et al. Efficacy and safety of low-dose IL-2 in the treatment of systemic lupus erythematosus: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Rheum Dis*. 2020 Jan;79(1):141–9.
 57. Mak A. T Cells, Interleukin-2 and Systemic Lupus Erythematosus—From Pathophysiology to Therapy. *Cells*. 2022 Mar 12;11(6):980.
 58. Junttila IS. Tuning the Cytokine Responses: An Update on Interleukin (IL)-4 and IL-13 Receptor Complexes. *Front Immunol*. 2018 Jun 7;9.
 59. Zusen X, Yanlei C. Determination of serum interleukin-13 and nerve growth factor in patients with systemic lupus erythematosus and clinical significance. *Curr Med Sci*. 2005 Jun 1;25(3):360–1.
 60. Lazar S, Kahlenberg JM. Annual Review of Medicine Systemic Lupus Erythematosus: New Diagnostic and Therapeutic Approaches. *Annu Rev Med* 2023 [Internet]. 2022;74:339–52. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev-med-043021->
 61. Kwon OC, Park MC. Risk of systemic lupus erythematosus flares according to autoantibody positivity at the time of diagnosis. *Sci Rep*. 2023 Dec 1;13(1).
 62. Lou H, Ling GS, Cao X. Autoantibodies in systemic lupus erythematosus: From immunopathology to therapeutic target. *J Autoimmun*. 2022 Oct;132:102861.
 63. Chang LS, Huang PY, Kuo HC, Tu YK, Tseng PT, Liang CS, et al. Diagnostic accuracy of the American College of Rheumatology-1997, the Systemic Lupus International Collaborating Clinics-2012, and the European League Against Rheumatism-2019 criteria for juvenile systemic lupus erythematosus: A systematic review and network meta-analysis. Vol. 21, *Autoimmunity Reviews*. Elsevier B.V.; 2022.
 64. Petri M, Orbai A, Alarcón GS, Gordon C, Merrill JT, Fortin PR, et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2012 Aug 27;64(8):2677–86.
 65. 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. *Arthritis & Rheumatology*. 2019 Sep 6;71(9):1400–12.
 66. Alexander RV, Rey DS, Conklin J, Domingues V, Ahmed M, Qureshi J, et al. A multianalyte assay panel with cell-bound complement activation products demonstrates clinical utility in systemic lupus erythematosus. *Lupus Sci Med*. 2021 Jul 12;8(1).
 67. Ayano M, Horiuchi T. Complement as a Biomarker for Systemic Lupus Erythematosus. Vol. 13, *Biomolecules*. MDPI; 2023.
 68. Hui-Yuen JS, Gartshteyn Y, Ma M, O'Malley T, Conklin J, Eichenfield AH, et al. Cell-bound complement activation products (CB-CAPs) have high sensitivity and specificity in pediatric-onset systemic lupus erythematosus and correlate with disease activity. *Lupus*. 2018 Dec 1;27(14):2262–8.
 69. Putterman C, Furie R, Ramsey-Goldman R, Askanase A, Buyon J, Kalunian K, et al. Cell-bound complement activation products in systemic lupus erythematosus: comparison with anti-double-stranded DNA and standard complement measurements.
 70. Gladman DD, Ibañez D, Urowitz MB. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. *J Rheumatol*. 2002 Feb;29(2):288–91.

71. Sokka T, Toloza S, Cutolo M, Kautiainen H, Makinen H, Gogus F, et al. Women, men, and rheumatoid arthritis: Analyses of disease activity, disease characteristics, and treatments in the QUEST-RA Study. *Arthritis Res Ther*. 2009 Jan 14;11(1).
72. Stone JH, McDowell PJ, Jayne DRW, Merkel PA, Robson J, Patel NJ, et al. The glucocorticoid toxicity index: Measuring change in glucocorticoid toxicity over time. Vol. 55, *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. W.B. Saunders; 2022.
73. Jorge AM, Mancini C, Zhou B, Ho G, Zhang Y, Costenbader K, et al. Hydroxychloroquine Dose per Ophthalmology Guidelines and the Risk of Systemic Lupus Erythematosus Flares. *JAMA*. 2022 Oct 11;328(14):1458.
74. Arachchillage DJ, Laffan M, Pericleous C. Hydroxychloroquine as an Immunomodulatory and Antithrombotic Treatment in Antiphospholipid Syndrome. Vol. 24, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2023.
75. Marmor MF, Kellner U, Lai TYY, Melles RB, Mieler WF, Lum F. Recommendations on Screening for Chloroquine and Hydroxychloroquine Retinopathy (2016 Revision). *Ophthalmology*. 2016 Jun 1;123(6):1386–94.
76. Mayoral LC, Andrade G, Mayoral EC, Huerta T, Canseco S, Rodal Canales F, et al. Obesity subtypes, related biomarkers & heterogeneity. *Indian Journal of Medical Research*. 2020;151(1):11.
77. Saúde M DA. VIGITEL BRASIL 2023 V E N D A P R O I B I D A V E N D A P R O I B I D A [Internet]. Available from: www.saude.gov.br/svs
78. Wright SM, Aronne LJ. Causes of obesity. *Abdominal Radiology*. 2012 Oct 18;37(5):730–2.
79. Mozaffarian D. Dietary and Policy Priorities for Cardiovascular Disease, Diabetes, and Obesity. *Circulation*. 2016 Jan 12;133(2):187–225.
80. San-Cristobal R, Navas-Carretero S, Martínez-González MÁ, Ordovas JM, Martínez JA. Contribution of macronutrients to obesity: implications for precision nutrition. *Nat Rev Endocrinol*. 2020 Jun 31;16(6):305–20.
81. Goodarzi MO. Genetics of obesity: what genetic association studies have taught us about the biology of obesity and its complications. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2018 Mar;6(3):223–36.
82. Yu GI, Song DK, Shin DH. Associations of IL1RAP and IL1RL1 gene polymorphisms with obesity and inflammation mediators. *Inflammation Research*. 2020 Feb 2;69(2):191–202.
83. Hay P, Mitchison D. Eating Disorders and Obesity: The Challenge for Our Times. *Nutrients*. 2019 May 11;11(5):1055.
84. Antoniak K, Hansdorfer-Korzon R, Mrugacz M, Zorena K. Adipose Tissue and Biological Factors. Possible Link between Lymphatic System Dysfunction and Obesity. *Metabolites*. 2021 Sep 11;11(9):617.
85. Reilly SM, Saltiel AR. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. *Nat Rev Endocrinol*. 2017 Nov 11;13(11):633–43.
86. Croca S, Rahman A. Atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2017 Jun;31(3):364–72.
87. Sun C, Qin W, Zhang Y, Wu Y, Li Q, Liu M, et al. Prevalence and risk of metabolic syndrome in patients with systemic lupus erythematosus: A meta-analysis. *Int J Rheum Dis*. 2017 Aug 29;20(8):917–28.
88. Mok CC. Metabolic syndrome and systemic lupus erythematosus: the connection. *Expert Rev Clin Immunol*. 2019 Jul 3;15(7):765–75.
89. Boutens L, Stienstra R. Adipose tissue macrophages: going off track during obesity. *Diabetologia*. 2016 May 3;59(5):879–94.

90. Santos FMM, Telles RW, Lanna CCD, Teixeira AL, Miranda AS, Rocha NP, et al. Adipokines, tumor necrosis factor and its receptors in female patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2017 Jan 11;26(1):10–6.
91. Wensveen FM, Valentić S, Šestan M, Turk Wensveen T, Polić B. The “Big Bang” in obese fat: Events initiating obesity-induced adipose tissue inflammation. *Eur J Immunol*. 2015 Sep;45(9):2446–56.
92. Zhang X, Meng J, Shi X, Quinet RJ, Davis W, Zakem J, et al. Lupus pathogenesis and autoimmunity are exacerbated by high fat diet-induced obesity in MRL/lpr mice. *Lupus Sci Med*. 2023 Apr 11;10(1):e000898.
93. 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*. 2021 Feb 4;13(2):504.
94. La Cava A. The Influence of Diet and Obesity on Gene Expression in SLE. *Genes (Basel)*. 2019 May 27;10(5):405.
95. Bartel DP. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*. 2009 Jan;136(2):215–33.
96. 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*. 2021 Feb 4;13(2):504.
97. Correa-Rodríguez M, Pocovi-Gerardino G, Callejas Rubio JL, Ríos Fernández R, Martín Amada M, Cruz Caparrós M, et al. The impact of obesity on disease activity, damage accrual, inflammation markers and cardiovascular risk factors in systemic lupus erythematosus. *Panminerva Med*. 2020 Jun;62(2).
98. Bondia-Pons I, Ryan L, Martinez JA. Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity. *J Physiol Biochem*. 2012 Dec 17;68(4):701–11.
99. Kawai T, Autieri M V., Scalia R. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2021 Mar 1;320(3):C375–91.
100. Cheng L, Wang J, Dai H, Duan Y, An Y, Shi L, et al. Brown and beige adipose tissue: a novel therapeutic strategy for obesity and type 2 diabetes mellitus. *Adipocyte*. 2021 Jan 1;10(1):48–65.
101. Villarroya F, Cereijo R, Gavaldà-Navarro A, Villarroya J, Giralt M. Inflammation of brown/beige adipose tissues in obesity and metabolic disease. *J Intern Med*. 2018 Nov 16;284(5):492–504.
102. Fontana L, Eagon JC, Trujillo ME, Scherer PE, Klein S. Visceral Fat Adipokine Secretion Is Associated With Systemic Inflammation in Obese Humans. *Diabetes*. 2007 Apr 1;56(4):1010–3.
103. Carobbio S, Pellegrinelli V, Vidal-Puig A. Adipose Tissue Function and Expandability as Determinants of Lipotoxicity and the Metabolic Syndrome. In 2017. p. 161–96.
104. Unamuno X, Gómez-Ambrosi J, Rodríguez A, Becerril S, Frühbeck G, Catalán V. Adipokine dysregulation and adipose tissue inflammation in human obesity. *Eur J Clin Invest*. 2018 Sep 3;48(9).
105. Saltiel AR, Olefsky JM. Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. *Journal of Clinical Investigation*. 2017 Jan 3;127(1):1–4.
106. Sinicato NA, Postal M, Peres FA, Peliçari K de O, Marini R, dos Santos A de O, et al. Obesity and Cytokines in Childhood-Onset Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol Res*. 2014;2014:1–6.
107. Pan Y, Hui X, Hoo RLC, Ye D, Chan CYC, Feng T, et al. Adipocyte-secreted exosomal microRNA-34a inhibits M2 macrophage polarization to promote obesity-induced adipose inflammation. *Journal of Clinical Investigation*. 2019 Jan 22;129(2):834–49.

108. Li X, Ren Y, Chang K, Wu W, Griffiths HR, Lu S, et al. Adipose tissue macrophages as potential targets for obesity and metabolic diseases. *Front Immunol.* 2023 Apr 19;14.
109. Kracht M, Müller-Ladner U, Schmitz ML. Mutual regulation of metabolic processes and proinflammatory NF- κ B signaling. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2020 Oct;146(4):694–705.
110. Catrysse L, van Loo G. Inflammation and the Metabolic Syndrome: The Tissue-Specific Functions of NF- κ B. *Trends Cell Biol.* 2017 Jun;27(6):417–29.
111. Engin A. Human Protein Kinases and Obesity. In 2017. p. 111–34.
112. Schmidt V, Hogan AE, Fallon PG, Schwartz C. Obesity-Mediated Immune Modulation: One Step Forward, (Th)2 Steps Back. *Front Immunol.* 2022 Jun 30;13.
113. Aisike G, Kuerbanjiang M, Muheyati D, Zaibibuli K, Lv MX, Han J. Correlation analysis of obesity phenotypes with leptin and adiponectin. *Sci Rep.* 2023 Oct 18;13(1):17718.
114. Zhao S, Kusminski CM, Scherer PE. Adiponectin, Leptin and Cardiovascular Disorders. *Circ Res.* 2021 Jan 8;128(1):136–49.
115. 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).* 2021 May 18;12.
116. Sáinz N, González-Navarro CJ, Martínez JA, Moreno-Aliaga MJ. Leptin signaling as a therapeutic target of obesity. *Expert Opin Ther Targets.* 2015 Jul 3;19(7):893–909.
117. Izquierdo AG, Crujeiras AB, Casanueva FF, Carreira MC. Leptin, Obesity, and Leptin Resistance: Where Are We 25 Years Later? *Nutrients.* 2019 Nov 8;11(11):2704.
118. Woods SC, Schwartz MW, Baskin DG, Seeley RJ. Food Intake and the Regulation of Body Weight. *Annu Rev Psychol.* 2000 Feb;51(1):255–77.
119. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, et al. Serum Immunoreactive-Leptin Concentrations in Normal-Weight and Obese Humans. *New England Journal of Medicine.* 1996 Feb;334(5):292–5.
120. Izquierdo AG, Crujeiras AB, Casanueva FF, Carreira MC. Leptin, Obesity, and Leptin Resistance: Where Are We 25 Years Later? *Nutrients.* 2019 Nov 8;11(11):2704.
121. Ghadge AA, Khaire AA, Kuvalekar AA. Adiponectin: A potential therapeutic target for metabolic syndrome. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2018 Feb;39:151–8.
122. Kurotani K, Sato M, Yasuda K, Kashima K, Tanaka S, Hayashi T, et al. Even- and odd-chain saturated fatty acids in serum phospholipids are differentially associated with adipokines. *PLoS One.* 2017 May 26;12(5):e0178192.
123. Araki Y, Mimura T. Epigenetic Dysregulation in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. *Int J Mol Sci.* 2024 Jan 13;25(2):1019.
124. Zhang L, Lu Q, Chang C. Epigenetics in Health and Disease. In 2020. p. 3–55.
125. Suárez R, Chapela SP, Álvarez-Córdova L, Bautista-Valarezo E, Sarmiento-Andrade Y, Verde L, et al. Epigenetics in Obesity and Diabetes Mellitus: New Insights. *Nutrients.* 2023 Feb 4;15(4):811.
126. Zatterale F, Raciti GA, Prevezano I, Leone A, Campitelli M, De Rosa V, et al. Epigenetic Reprogramming of the Inflammatory Response in Obesity and Type 2 Diabetes. *Biomolecules.* 2022 Jul 14;12(7):982.
127. Ehtesham N, Habibi Kavashkoghie MR, Mazhari SA, Azhdari S, Ranjbar H, Mosallaei M, et al. DNA methylation alterations in systemic lupus erythematosus: A systematic review of case-control studies. *Lupus.* 2023 Mar 27;32(3):363–79.
128. Meng H, Cao Y, Qin J, Song X, Zhang Q, Shi Y, et al. DNA Methylation, Its Mediators and Genome Integrity. *Int J Biol Sci.* 2015;11(5):604–17.
129. Mahmood N, Rabbani SA. Targeting DNA Hypomethylation in Malignancy by Epigenetic Therapies. In 2019. p. 179–96.

130. Correa LO, Jordan MS, Carty SA. DNA Methylation in T-Cell Development and Differentiation. *Crit Rev Immunol*. 2020;40(2):135–56.
131. Del Castillo Falconi VM, Torres-Arciga K, Matus-Ortega G, Díaz-Chávez J, Herrera LA. DNA Methyltransferases: From Evolution to Clinical Applications. *Int J Mol Sci*. 2022 Aug 12;23(16):8994.
132. Goyal R. Accuracy of DNA methylation pattern preservation by the Dnmt1 methyltransferase. *Nucleic Acids Res*. 2006 Feb 13;34(4):1182–8.
133. Tomkova M, Schuster-Böckler B. DNA Modifications: Naturally More Error Prone? *Trends in Genetics*. 2018 Aug;34(8):627–38.
134. Gorelik GJ, Yarlagadda S, Richardson BC. Protein kinase C δ oxidation contributes to ERK inactivation in lupus T cells. *Arthritis Rheum*. 2012 Sep;64(9):2964–74.
135. Zhao M, Sun Y, Gao F, Wu X, Tang J, Yin H, et al. Epigenetics and SLE: RFX1 downregulation causes CD11a and CD70 overexpression by altering epigenetic modifications in lupus CD4⁺ T cells. *J Autoimmun*. 2010 Aug;35(1):58–69.
136. 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*. 2020 Jun;
137. Coit P, Roopnarinesingh X, Ortiz-Fernández L, McKinnon-Maksimowicz K, Lewis EE, Merrill JT, et al. Hypomethylation of miR-17-92 cluster in lupus T cells and no significant role for genetic factors in the lupus-associated DNA methylation signature. *Ann Rheum Dis*. 2022 Oct;81(10):1428–37.
138. Zhao M, Tang J, Gao F, Wu X, Liang Y, Yin H, et al. Hypomethylation of *IL10* and *IL13* Promoters in CD4⁺ T Cells of Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:1–9.
139. Mi X bin, Zeng F qin. Hypomethylation of interleukin-4 and -6 promoters in T cells from systemic lupus erythematosus patients. *Acta Pharmacol Sin*. 2008 Jan;29(1):105–12.
140. Ehtesham N, Mosallaei M, Zaboli Mahdiabadi M, Kenarangi T, Farhadi A, Heidari MF, et al. Significant hypomethylation of *MMP9* gene promoter in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2023 Aug 23;32(9):1056–65.
141. Jeffries M, Dozmorov M, Tang Y, Merrill JT, Wren JD, Sawalha AH. Genome-wide DNA methylation patterns in CD4⁺ T cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Epigenetics*. 2011 May 27;6(5):593–601.
142. Surace AEA, Hedrich CM. The Role of Epigenetics in Autoimmune/Inflammatory Disease. *Front Immunol*. 2019 Jul 4;10.
143. Hedrich CM, Crispin JC, Tsokos GC. Epigenetic regulation of cytokine expression in systemic lupus erythematosus with special focus on T cells. *Autoimmunity*. 2014 Jun 24;47(4):234–41.
144. Imam MH, Koriem HK, Hassan MM, El-Hadidi AS, Ibrahim NA. Serum matrix metalloproteinase-9 level in systemic lupus erythematosus with peripheral neuropathy. *Egyptian Rheumatology and Rehabilitation*. 2019 Oct 1;46(4):211–20.
145. Jiang Z, Sui T, Wang B. Relationships between MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 levels and their pathogenesis in patients with lupus nephritis. *Rheumatol Int*. 2010 Jul 25;30(9):1219–26.
146. Januchowski R, Wudarski M, Chwalińska-Sadowska H, Jagodzinski PP. Prevalence of ZAP-70, LAT, SLP-76, and DNA methyltransferase 1 expression in CD4⁺ T cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol*. 2008 Jan 11;27(1):21–7.
147. 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*. 2011 Jun 20;50(6):697–704.

148. Aslibekyan S, Demerath EW, Mendelson M, Zhi D, Guan W, Liang L, et al. Epigenome-wide study identifies novel methylation loci associated with body mass index and waist circumference. *Obesity*. 2015 Jul;23(7):1493–501.
149. Xu X, Su S, Barnes VA, De Miguel C, Pollock J, Ownby D, et al. A genome-wide methylation study on obesity. *Epigenetics*. 2013 May 27;8(5):522–33.
150. Dick KJ, Nelson CP, Tsaprouni L, Sandling JK, Aïssi D, Wahl S, et al. DNA methylation and body-mass index: a genome-wide analysis. *The Lancet*. 2014 Jun;383(9933):1990–8.
151. Wang C, Wang M, Ma J. Analysis of genome-wide DNA methylation patterns in obesity. *Endocr J*. 2021;68(12):EJ20-0734.
152. Patel DR, Richardson BC. Epigenetic mechanisms in lupus. *Curr Opin Rheumatol*. 2010 Sep;22(5):478–82.
153. Hedrich CM, Tsokos GC. Epigenetic mechanisms in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Trends Mol Med*. 2011 Dec;17(12):714–24.
154. Pufulete M. Effect of folic acid supplementation on genomic DNA methylation in patients with colorectal adenoma. *Gut*. 2005 May 1;54(5):648–53.
155. Ellingrod VL, Grove TB, Burghardt KJ, Taylor SF, Dalack G. The effect of folate supplementation and genotype on cardiovascular and epigenetic measures in schizophrenia subjects. *NPJ Schizophr*. 2015 Nov 11;1(1):15046.
156. Cho CE, Pannia E, Huot PSP, Sánchez-Hernández D, Kubant R, Dodington DW, et al. Methyl vitamins contribute to obesogenic effects of a high multivitamin gestational diet and epigenetic alterations in hypothalamic feeding pathways in Wistar rat offspring. *Mol Nutr Food Res*. 2015 Mar;59(3):476–89.
157. Cui S, Li W, Lv X, Wang P, Gao Y, Huang G. Folic Acid Supplementation Delays Atherosclerotic Lesion Development by Modulating MCP1 and VEGF DNA Methylation Levels In Vivo and In Vitro. *Int J Mol Sci*. 2017 May 5;18(5):990.
158. Irwin RE, Thursby SJ, Ondičová M, Pentieva K, McNulty H, Richmond RC, et al. A randomized controlled trial of folic acid intervention in pregnancy highlights a putative methylation-regulated control element at ZFP57. *Clin Epigenetics*. 2019 Dec 18;11(1):31.
159. Kok DEG, Dhonukshe-Rutten RAM, Lute C, Heil SG, Uitterlinden AG, van der Velde N, et al. The effects of long-term daily folic acid and vitamin B12 supplementation on genome-wide DNA methylation in elderly subjects. *Clin Epigenetics*. 2015 Dec 14;7(1):121.
160. Miousse IR, Pathak R, Garg S, Skinner CM, Melnyk S, Pavliv O, et al. Short-term dietary methionine supplementation affects one-carbon metabolism and DNA methylation in the mouse gut and leads to altered microbiome profiles, barrier function, gene expression and histomorphology. *Genes Nutr*. 2017 Dec 6;12(1):22.
161. Yadav DK, Shrestha S, Lillycrop KA, Joglekar C V, Pan H, Holbrook JD, et al. Vitamin B₁₂ supplementation influences methylation of genes associated with Type 2 diabetes and its intermediate traits. *Epigenomics*. 2018 Jan;10(1):71–90.
162. 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*. 2023;16(1):192–213.
163. Radziejewska A, Muzsik A, Milagro FI, Martínez JA, Chmurzynska A. One-Carbon Metabolism and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: The Crosstalk between Nutrients, Microbiota, and Genetics. *Lifestyle Genom*. 2020;13(2):53–63.
164. Choi SW, Friso S. Modulation of DNA methylation by one-carbon metabolism: a milestone for healthy aging. *Nutr Res Pract*. 2023;17(4):597.

165. COPPOLA A, DAVI G, DE STEFANO V, MANCINI FP, CERBONE AM, DI MINNO G. Homocysteine, Coagulation, Platelet Function, and Thrombosis. *Semin Thromb Hemost.* 2000;Volume 26(Number 03):243–54.
166. Friso S, Udali S, De Santis D, Choi SW. One-carbon metabolism and epigenetics. Vol. 54, *Molecular Aspects of Medicine*. Elsevier Ltd; 2017. p. 28–36.
167. Nash AJ, Mandaviya PR, Dib MJ, Uitterlinden AG, Meurs J, Heil SG, et al. Interaction between plasma homocysteine and the *MTHFR C.677C > T* polymorphism is associated with site-specific changes in DNA methylation in humans. *The FASEB Journal.* 2019 Jan 6;33(1):833–43.
168. Lyon P, Strippoli V, Fang B, Cimmino L. B Vitamins and One-Carbon Metabolism: Implications in Human Health and Disease. *Nutrients.* 2020 Sep 19;12(9):2867.
169. 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.* 2023 Feb 6;24(4):3171.
170. Ratajczak AE, Szymczak-Tomczak A, Rychter AM, Zawada A, Dobrowolska A, Krela-Kaźmierczak I. Does Folic Acid Protect Patients with Inflammatory Bowel Disease from Complications? *Nutrients.* 2021 Nov 12;13(11):4036.
171. Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. Washington, D.C.: National Academies Press; 1998.
172. Wu CH, Huang TC, Lin BF. Folate deficiency affects dendritic cell function and subsequent T helper cell differentiation. *J Nutr Biochem.* 2017 Mar;41:65–72.
173. Fragkioudaki S, Nezos A, Souliotis VL, Chatziandreou I, Saetta AA, Drakoulis N, et al. MTHFR gene variants and non-MALT lymphoma development in primary Sjogren's syndrome. *Sci Rep.* 2017 Aug 4;7(1):7354.
174. Watanabe F. Vitamin B₁₂ Sources and Bioavailability. *Exp Biol Med.* 2007 Nov 26;232(10):1266–74.
175. Obeid R, Heil SG, Verhoeven MMA, van den Heuvel EGHM, de Groot LCPGM, Eussen SJPM. Vitamin B12 Intake From Animal Foods, Biomarkers, and Health Aspects. *Front Nutr.* 2019 Jun 28;6.
176. González-Muniesa, Martínez. Precision Nutrition and Metabolic Syndrome Management. *Nutrients.* 2019 Oct 9;11(10):2411.
177. Li X, Qi L. Epigenetics in Precision Nutrition. *J Pers Med.* 2022 Mar 28;12(4):533.
178. 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.* 2021 Oct 20;30(11):1773–80.
179. Lu Q, Wu A, Tesmer L, Ray D, Yousif N, Richardson B. Demethylation of *CD40LG* on the Inactive X in T Cells from Women with Lupus. *The Journal of Immunology.* 2007 Nov 1;179(9):6352–8.
180. Moulton VR, Holcomb DR, Zajdel MC, Tsokos GC. Estrogen Upregulates Cyclic AMP Response Element Modulator α Expression and Downregulates Interleukin-2 Production by Human T Lymphocytes. *Molecular Medicine.* 2012 Mar 24;18(3):370–8.
181. Tiniakou E, Costenbader KH, Kriegel MA. Sex-specific environmental influences on the development of autoimmune diseases. *Clinical Immunology.* 2013 Nov;149(2):182–91.
182. 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.* 2013 Jul;65(7):1872–81.

183. Wright NJ, Fedor JG, Zhang H, Jeong P, Suo Y, Yoo J, et al. Methotrexate recognition by the human reduced folate carrier SLC19A1. *Nature*. 2022 Sep 29;609(7929):1056–62.
184. Karcioğlu O, Zengin S, Ozkaya B, Ersan E, Yılmaz S, Afacan G, et al. Direct (New) Oral Anticoagulants (DOACs): Drawbacks, Bleeding and Reversal. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. 2022 Jul;20(2):103–13.
185. Bacchetti P. Current sample size conventions: Flaws, harms, and alternatives. *BMC Med*. 2010 Dec 22;8(1):17.
186. Bacchetti P, McCulloch CE, Segal MR. Simple, Defensible Sample Sizes Based on Cost Efficiency. *Biometrics*. 2008 Jun;64(2):577–85.
187. Durnin JVGA, Womersley J. Body fat assessed from total body density and its estimation from skinfold thickness: measurements on 481 men and women aged from 16 to 72 Years. *British Journal of Nutrition*. 1974 Jul 9;32(01):77–97.
188. Siri WE. Body composition from fluid spaces and density: analysis of methods. 1961. *Nutrition*. 1993;9(5):480–91; discussion 480, 492.
189. Monteiro CA, Cannon G, Moubarac JC, Levy RB, Louzada MLC, Jaime PC. The UN Decade of Nutrition, the NOVA food classification and the trouble with ultra-processing. *Public Health Nutr*. 2018 Jan 21;21(1):5–17.
190. Sember V, Meh K, Sorić M, Starc G, Rocha P, Jurak G. Validity and Reliability of International Physical Activity Questionnaires for Adults across EU Countries: Systematic Review and Meta Analysis. *Int J Environ Res Public Health*. 2020 Sep 30;17(19):7161.
191. Benedetti TRB, Antunes P de C, Rodriguez-Añez CR, Mazo GZ, Petroski ÉL. Reprodutibilidade e validade do Questionário Internacional de Atividade Física (IPAQ) em homens idosos. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. 2007 Feb;13(1):11–6.
192. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_t$ Method. *Methods*. 2001 Dec 25(4):402–8.
193. Assenov Y, Müller F, Lutsik P, Walter J, Lengauer T, Bock C. Comprehensive analysis of DNA methylation data with RnBeads. *Nat Methods*. 2014 Nov 28;11(11):1138–40.
194. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res*. 2015 Apr 20;43(7):e47–e47.
195. Shi H, Wu H, Winkler MA, Belin de Chantemèle EJ, Lee R, Kim HW, et al. Perivascular adipose tissue in autoimmune rheumatic diseases. *Pharmacol Res*. 2022 Aug;182:106354.
196. Li Z, Shang J, Zeng S, Wu H, Zhou Y, Xu H. Altered body composition and increased visceral adipose tissue in premenopausal and late postmenopausal patients with SLE. *Clin Rheumatol*. 2019 Nov 30;38(11):3117–27.
197. Seguro LPC, Paupitz JA, Caparbo VF, Bonfa E, Pereira RMR. Increased visceral adipose tissue and altered adiposity distribution in premenopausal lupus patients: correlation with cardiovascular risk factors. *Lupus*. 2018 May 16;27(6):1001–6.
198. Benatti FB, Miyake CNH, Dantas WS, Zambelli VO, Shinjo SK, Pereira RMR, et al. Exercise Increases Insulin Sensitivity and Skeletal Muscle AMPK Expression in Systemic Lupus Erythematosus: A Randomized Controlled Trial. *Front Immunol*. 2018 Apr 27;9.
199. Di Liegro, Schiera, Proia, Di Liegro. Physical Activity and Brain Health. *Genes (Basel)*. 2019 Sep 17;10(9):720.
200. Georgel PT, Georgel P. Where Epigenetics Meets Food Intake: Their Interaction in the Development/Severity of Gout and Therapeutic Perspectives. *Front Immunol*. 2021 Sep 17;12.

201. Al-Ghnaniem Abbadi R, Emery P, Pufulete M. Short-Term Folate Supplementation in Physiological Doses Has No Effect on ESR1 and MLH1 Methylation in Colonic Mucosa of Individuals with Adenoma. *Lifestyle Genom.* 2012;5(6):327–38.
202. 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.* 2021 Oct 20;30(11):1773–80.
203. Minami Y, Hirabayashi Y, Nagata C, Ishii T, Harigae H, Sasaki T. Intakes of Vitamin B6 and Dietary Fiber and Clinical Course of Systemic Lupus Erythematosus: A Prospective Study of Japanese Female Patients. *J Epidemiol.* 2011;21(4):246–54.
204. Varghese B, Haase N, Low PS. Depletion of Folate-Receptor-Positive Macrophages Leads to Alleviation of Symptoms and Prolonged Survival in Two Murine Models of Systemic Lupus Erythematosus. *Mol Pharm.* 2007 Oct 1;4(5):679–85.
205. Bradyanova S, Manoylov I, Boneva G, Kechidzhieva L, Tchorbanov A, Nikolova-Ganeva K. Methyl-supplemented nutrition delays the development of autoimmune disease in pristane-induced murine lupus. *Immunology.* 2024 Mar 2;
206. Nikolova-Ganeva K, Vasilev V, Kerezieva S, Tchorbanov A. Impact of folic acid on regulatory B lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus in vitro. *Int J Rheum Dis.* 2023 Feb 17;26(2):298–304.
207. Ray D, Strickland FM, Richardson BC. Oxidative stress and dietary micronutrient deficiencies contribute to overexpression of epigenetically regulated genes by lupus T cells. *Clinical Immunology.* 2018 Nov;196:97–102.
208. 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.* 2013 Jul 2;65(7):1872–81.
209. Gargari BP, Aghamohammadi V, Aliasgharzadeh A. Effect of folic acid supplementation on biochemical indices in overweight and obese men with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011 Oct;94(1):33–8.
210. Murphy MS, Muldoon KA, Sheyholislami H, Behan N, Lamers Y, Rybak N, et al. Impact of high-dose folic acid supplementation in pregnancy on biomarkers of folate status and 1-carbon metabolism: An ancillary study of the Folic Acid Clinical Trial (FACT). *Am J Clin Nutr.* 2021 May;113(5):1361–71.
211. Asbaghi O, Ashtary-Larky D, Bagheri R, Nazarian B, Pourmirzaei Olyaei H, Rezaei Kelishadi M, et al. Beneficial effects of folic acid supplementation on lipid markers in adults: A GRADE-assessed systematic review and dose-response meta-analysis of data from 21,787 participants in 34 randomized controlled trials. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2022 Oct 24;62(30):8435–53.
212. Asbaghi O, Ashtary-Larky D, Bagheri R, Moosavian SP, Nazarian B, Afrisham R, et al. Effects of Folic Acid Supplementation on Inflammatory Markers: A Grade-Assessed Systematic Review and Dose–Response Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Nutrients.* 2021 Jul 6;13(7):2327.
213. Solini A, Santini E, Ferrannini E. Effect of short-term folic acid supplementation on insulin sensitivity and inflammatory markers in overweight subjects. *Int J Obes.* 2006 Aug 21;30(8):1197–202.
214. Joshi R, Adhikari S, Patro BS, Chattopadhyay S, Mukherjee T. Free radical scavenging behavior of folic acid: evidence for possible antioxidant activity. *Free Radic Biol Med.* 2001 Jun;30(12):1390–9.

215. Kostyuk VA, Potapovich AI, Suhan TO, de Luca C, Korkina LG. Antioxidant and signal modulation properties of plant polyphenols in controlling vascular inflammation. *Eur J Pharmacol.* 2011 May;658(2–3):248–56.
216. Tsai TY, Lee TH, Wang HH, Yang TH, Chang IJ, Huang YC. Serum Homocysteine, Folate, and Vitamin B₁₂ Levels in Patients with Systemic Lupus Erythematosus: A Meta-Analysis and Meta-Regression. *J Am Coll Nutr.* 2021 Jul 4;40(5):443–53.
217. Duan S, Liu S, Sun X, Zheng Y, Liu L, Yao F, et al. Potential association of hyperhomocysteinemia with the progression of IgA nephropathy: a retrospective study. *Chin Med J (Engl).* 2014;127(10):1849–52.
218. Orme JJ, Du Y, Vanarsa K, Wu T, Satterthwaite AB, Mohan C. Leukocyte Beta-Catenin Expression Is Disturbed in Systemic Lupus Erythematosus. *PLoS One.* 2016 Aug 22;11(8):e0161682.
219. Yang P, An H, Liu X, Wen M, Zheng Y, Rui Y, et al. The cytosolic nucleic acid sensor LRRFIP1 mediates the production of type I interferon via a β -catenin-dependent pathway. *Nat Immunol.* 2010 Jun 9;11(6):487–94.
220. Deng J, Miller SA, Wang HY, Xia W, Wen Y, Zhou BP, et al. β -catenin interacts with and inhibits NF- κ B in human colon and breast cancer. *Cancer Cell.* 2002 Oct;2(4):323–34.
221. Tveita AA, Rekvig OP. Alterations in Wnt pathway activity in mouse serum and kidneys during lupus development. *Arthritis Rheum.* 2011 Feb 28;63(2):513–22.
222. Song L, Wang Y, Zhang J, Song N, Xu X, Lu Y. The risks of cancer development in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: a systematic review and meta-analysis. *Arthritis Res Ther.* 2018 Dec 6;20(1):270.
223. Hu DG, Meech R, McKinnon RA, Mackenzie PI. Transcriptional regulation of human UDP-glucuronosyltransferase genes. *Drug Metab Rev.* 2014 Nov 22;46(4):421–58.
224. Waring RH. Cytochrome P450: genotype to phenotype. *Xenobiotica.* 2020 Jan 2;50(1):9–18.
225. Gao B, Tan T, Cao X, Pan M, Yang C, Wang J, et al. Relationship of cytochrome P450 gene polymorphisms with blood concentrations of hydroxychloroquine and its metabolites and adverse drug reactions. *BMC Med Genomics.* 2022 Dec 8;15(1):23.
226. McKinnon RA, Nebert DW. Possible Role of Cytochromes P450 in Lupus Erythematosus and Related Disorders. *Lupus.* 1994 Dec 2;3(6):473–8.
227. Figueiredo JC, Levine AJ, Grau M V., Midttun Ø, Ueland PM, Ahnen DJ, et al. Vitamins B2, B6, and B12 and Risk of New Colorectal Adenomas in a Randomized Trial of Aspirin Use and Folic Acid Supplementation. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention.* 2008 Aug 1;17(8):2136–45.
228. Mahmoud A, Ali M. Methyl Donor Micronutrients that Modify DNA Methylation and Cancer Outcome. *Nutrients.* 2019 Mar 13;11(3):608.
229. Liu J, Huang B, Ding F, Li Y. Environment factors, DNA methylation, and cancer. *Environ Geochem Health.* 2023 Nov 16;45(11):7543–68.
230. Bhootra S, Jill N, Shanmugam G, Rakshit S, Sarkar K. DNA methylation and cancer: transcriptional regulation, prognostic, and therapeutic perspective. *Medical Oncology.* 2023 Jan 5;40(2):71.
231. Gonda TA, Kim Y, Salas MC, Gamble M V., Shibata W, Muthupalani S, et al. Folic Acid Increases Global DNA Methylation and Reduces Inflammation to Prevent Helicobacter-Associated Gastric Cancer in Mice. *Gastroenterology.* 2012 Apr;142(4):824–833.e7.
232. Chen L, Cao S qi, Lin Z min, He S jun, Zuo J ping. NOD-like receptors in autoimmune diseases. *Acta Pharmacol Sin.* 2021 Nov 15;42(11):1742–56.

233. Zhou Y, Yu S, Zhang W. NOD-like Receptor Signaling Pathway in Gastrointestinal Inflammatory Diseases and Cancers. *Int J Mol Sci*. 2023 Sep 25;24(19):14511.
234. Platnich JM, Muruve DA. NOD-like receptors and inflammasomes: A review of their canonical and non-canonical signaling pathways. *Arch Biochem Biophys*. 2019 Jul;670:4–14.
235. Yu SL, Wong CK, Wong PTY, Chen DP, Szeto CC, Li EK, et al. Down-Regulated NOD2 by Immunosuppressants in Peripheral Blood Cells in Patients with SLE Reduces the Muramyl Dipeptide-Induced IL-10 Production. *PLoS One*. 2011 Aug 19;6(8):e23855.
236. Jin J, Zhou T jie, Ren G ling, Cai L, Meng X ming. Novel insights into NOD-like receptors in renal diseases. *Acta Pharmacol Sin*. 2022 Nov 1;43(11):2789–806.
237. Oliveira CB, Lima CAD, Vajgel G, Sandrin-Garcia P. The Role of NLRP3 Inflammasome in Lupus Nephritis. *Int J Mol Sci*. 2021 Nov 19;22(22):12476.
238. Tsao YP, Tseng FY, Chao CW, Chen MH, Yeh YC, Abdulkareem BO, et al. NLRP12 is an innate immune checkpoint for repressing IFN signatures and attenuating lupus nephritis progression. *Journal of Clinical Investigation*. 2023 Feb 1;133(3).
239. Valiño-Rivas L, Cuarental L, Nuñez G, Sanz AB, Ortiz A, Sanchez-Niño MD. Loss of NLRP6 expression increases the severity of acute kidney injury. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2020 Apr 1;35(4):587–98.
240. Guo C, Fu R, Zhou M, Wang S, Huang Y, Hu H, et al. Pathogenesis of lupus nephritis: RIP3 dependent necroptosis and NLRP3 inflammasome activation. *J Autoimmun*. 2019 Sep;103:102286.
241. Elsayed MS, Abu-Elsaad NM, Nader MA. The NLRP3 inhibitor dapansutril attenuates folic acid induced nephrotoxicity via inhibiting inflammasome/caspase-1/IL axis and regulating autophagy/proliferation. *Life Sci*. 2021 Nov;285:119974.
242. Zhang AMY, Wellberg EA, Kopp JL, Johnson JD. Hyperinsulinemia in Obesity, Inflammation, and Cancer. *Diabetes Metab J*. 2021 May 31;45(3):285–311.
243. Rohm T V., Meier DT, Olefsky JM, Donath MY. Inflammation in obesity, diabetes, and related disorders. *Immunity*. 2022 Jan;55(1):31–55.
244. Arystarkhova E, Liu YB, Salazar C, Stanojevic V, Clifford RJ, Kaplan JH, et al. Hyperplasia of Pancreatic Beta Cells and Improved Glucose Tolerance in Mice Deficient in the FXD2 Subunit of Na,K-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*. 2013 Mar;288(10):7077–85.
245. Wondmunkun YT. <p>Obesity, Insulin Resistance, and Type 2 Diabetes: Associations and Therapeutic Implications</p>. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2020 Oct;Volume 13:3611–6.
246. 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*. 2023 Apr;23(4):503–14.
247. Ma F, Zhou X, Li Q, Zhao J, Song A, An P, et al. Effects of Folic Acid and Vitamin B12, Alone and in Combination on Cognitive Function and Inflammatory Factors in the Elderly with Mild Cognitive Impairment: A Single-blind Experimental Design. *Curr Alzheimer Res*. 2019 Sep 4;16(7):622–32.
248. Depeint F, Bruce WR, Shangari N, Mehta R, O'Brien PJ. Mitochondrial function and toxicity: Role of B vitamins on the one-carbon transfer pathways. *Chem Biol Interact*. 2006 Oct;163(1–2):113–32.
249. Locasale JW. Serine, glycine and one-carbon units: cancer metabolism in full circle. *Nat Rev Cancer*. 2013 Aug 4;13(8):572–83.

250. Ford T, Downey L, Simpson T, McPhee G, Oliver C, Stough C. The Effect of a High-Dose Vitamin B Multivitamin Supplement on the Relationship between Brain Metabolism and Blood Biomarkers of Oxidative Stress: A Randomized Control Trial. *Nutrients*. 2018 Dec 1;10(12):1860.
251. Yan Z, Chen Q, Xia Y. Oxidative Stress Contributes to Inflammatory and Cellular Damage in Systemic Lupus Erythematosus: Cellular Markers and Molecular Mechanism. *J Inflamm Res*. 2023 Feb;Volume 16:453–65.
252. Yang J, Yang X, Zou H, Li M. Oxidative Stress and Treg and Th17 Dysfunction in Systemic Lupus Erythematosus. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:1–9.
253. Shah D, Mahajan N, Sah S, Nath SK, Paudyal B. Oxidative stress and its biomarkers in systemic lupus erythematosus. *J Biomed Sci*. 2014 Dec 17;21(1):23.
254. Perl A. Oxidative stress in the pathology and treatment of systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol*. 2013 Nov;9(11):674–86.
255. Bonnefont-Rousselot D. Obesity and Oxidative Stress: Potential Roles of Melatonin as Antioxidant and Metabolic Regulator. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets*. 2014 Jun 4;14(3):159–68.
256. de Mello AH, Costa AB, Engel JDG, Rezin GT. Mitochondrial dysfunction in obesity. *Life Sci*. 2018 Jan;192:26–32.
257. Jakubiak GK, Osadnik K, Lejawa M, Kasperczyk S, Osadnik T, Pawlas N. Oxidative Stress in Association with Metabolic Health and Obesity in Young Adults. *Oxid Med Cell Longev*. 2021 Jun 26;2021:1–19.
258. Trollope AF, Gutiérrez-Mecinas M, Mifsud KR, Collins A, Saunderson EA, Reul JMHM. Stress, epigenetic control of gene expression and memory formation. *Exp Neurol*. 2012 Jan;233(1):3–11.
259. Tomkova M, Schuster-Böckler B. DNA Modifications: Naturally More Error Prone? *Trends in Genetics*. 2018 Aug;34(8):627–38.
260. Rocha MA, de Campos Vidal B, Mello MLS. Sodium Valproate Modulates the Methylation Status of Lysine Residues 4, 9 and 27 in Histone H3 of HeLa Cells. *Curr Mol Pharmacol*. 2023 Apr;16(2):197–210.
261. Rahman MF, McGowan PO. Cell-type-specific epigenetic effects of early life stress on the brain. *Transl Psychiatry*. 2022 Aug 10;12(1):326.

APÊNDICE A – Ficha de anamnese.

Paciente:

RGHC:

CÓD:

Responsável pela aplicação:

Data:

DADOS PESSOAIS E DE MEDICAÇÃO

1. Data de nascimento:

2. Raça declarada:

3. Idade atual:

4. Profissão:

5. Estado civil:

6. Escolaridade:

7. Tabagismo prévio: [] SIM [] NÃO

Obs.:

8. Data diagnóstico LES:

Obs.:

9. Tempo da doença (anos):

Obs.:

10. Dose atual HCQ/dia:

Obs.:

11. No vezes por semana HCQ:

Obs.:

12. Tempo atual do uso de HCQ:

Obs.:

13. Dose cumulativa HCQ:

Obs.:

14. Dose atual PREDS/dia:

Obs.:

15. No vezes por semana PREDS:

Obs.:

16. Tempo atual do uso de PREDS:

Obs.:

17. Dose cumulativa PREDS:

Obs.:

18. Horário PREDS:

Obs.:

19. Horário HCQ:

Obs.:

20. SLEDAI atual:

Obs.:

APÊNDICE B – Questionário Internacional de Atividade Física.

1a. Em quantos dias da última semana você caminhou por pelo menos 10 minutos contínuos em casa ou no trabalho, como forma de transporte?							
0 dias	1 dia	2 dias	3 dias	4 dias	5 dias	6 dias	7 dias
1b. Nos dias que você caminhou por pelo menos 10 minutos contínuos, quanto tempo (minutos) você gastou caminhando por dia?							
2a. Em quantos dias da última semana você realizou atividades moderadas por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo pedalar leve na bicicleta, nadar, dançar, jogar vôlei recreativo, carregar pesos leves, fazer serviços domésticos na casa, no quintal ou no jardim como varrer, aspirar, cuidar do jardim, ou qualquer atividade que fez aumentar moderadamente sua respiração ou batimentos do coração?							
0 dias	1 dia	2 dias	3 dias	4 dias	5 dias	6 dias	7 dias
2b. Nos dias em que você fez essas atividades moderadas por pelo menos 10 minutos contínuos, quanto tempo no total (minutos) você gastou fazendo essas atividades por dia?							
3a. Em quantos dias da última semana você realizou atividades vigorosas por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo correr, fazer ginástica aeróbica, jogar futebol, pedalar rápido na bicicleta, jogar basquete, fazer serviços domésticos pesados em casa, no quintal ou cavoucar no jardim, carregar pesos elevados ou qualquer atividade que fez aumentar muito a sua respiração ou batimentos do coração?							
0 dias	1 dia	2 dias	3 dias	4 dias	5 dias	6 dias	7 dias
3b. Nos dias em que você fez essas atividades vigorosas por pelo menos 10 minutos contínuos, quanto tempo no total (minutos) você gastou fazendo essas atividades por dia?							
4a. Quanto tempo no total (minutos) você gasta sentado durante um dia de semana?							
4b. Quanto tempo no total (minutos) você gasta sentado durante um dia de final de semana?							

ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

1

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DA PESQUISA

Título da pesquisa - Efeito da suplementação ácido fólico e vitamina B12 no perfil epigenético de pacientes com lúpus e obesidade
 Pesquisador principal – Carolina Nicoletti Ferreira Fino
 Departamento/Instituto - Divisão de Reumatologia / Faculdade de Medicina

Convite à participação

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

Justificativa e objetivos do estudo

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

Procedimentos que serão realizados e métodos que serão empregados

Abaixo estão descritos os exames que serão feitos por você.

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

Atualizado dezembro 2019

2

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

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

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

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

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

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

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

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

Explicitação de possíveis desconfortos e riscos decorrentes da participação na pesquisa

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

Atualizado dezembro 2019

3

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

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

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

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

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

Benefícios esperados para o participante

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

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

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

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

Atualizado dezembro 2019

4

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Nome resumido do projeto: Epigenética, obesidade e lúpus	Confidencial	
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido versão 1.0 de 17 de maio de 2021		
Nome do pesquisador: Carolin Nicoletti Ferreira Fato Hospital Das Clínicas Da Faculdade De Medicina Da USP		
	Rubrica do Participante da Pesquisa/Representante legal	Rubrica do Investigador Responsável
	Atualizado-dezembro 2019	

5
ocasionalmente revistas científicas ou a agência que financia nossa pesquisa pode nos pedir análises adicionais ou esclarecimentos. Dentro desse período, caso haja necessidade ou interesse do nosso grupo de pesquisa ou de outros em realizar análises adicionais com suas amostras já coletadas e armazenadas, o Pesquisador Principal entrará em contato com você para explicar os motivos da nova análise e solicitar a sua aprovação. Caso você autorize o uso das suas amostras para eventuais novas análises, pediremos que você assine um novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, o qual deverá ter sido aprovado pelo comitê de ética.

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

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

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

_____ Data ____/____/____

Assinatura do participante /representante legal

Nome do participante/representante legal

_____ Data ____/____/____

Assinatura do responsável pelo estudo

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

Atualizado-dezembro 2019