

RAFAEL SILVA LIMA

**AVALIAÇÃO E ASSOCIAÇÃO DOS PARÂMETROS METABÓLICOS,
INFLAMATÓRIOS E EPIGENÉTICOS NA OBESIDADE INFANTIL**

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Fevereiro/2019

RAFAEL SILVA LIMA

**AVALIAÇÃO E ASSOCIAÇÃO DOS PARÂMETROS METABÓLICOS,
INFLAMATÓRIOS E EPIGENÉTICOS NA OBESIDADE INFANTIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientadora: Profa. Dra. Juliana de Assis Silva
Gomes Estanislau

Co-orientadora: Profa. Dra. Paula Rocha Moreira

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais

Fevereiro/2019

“O que prevemos raramente ocorre; o que menos esperamos geralmente acontece”

Benjamin Disraeli

*Dedico esse trabalho aos meus pais, Celso e Maria
Aparecida, por sempre ter acreditado em mim e no poder
transformador da educação.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e pela oportunidade de viver e aprender a cada dia.

Aos meus amados pais, Celso e Maria Aparecida, por sempre estarem ao meu lado, por me mostrarem por meio do exemplo a ser um ser humano melhor e por me mostrarem desde os primeiros anos que a educação é o caminho a ser seguido.

Aos meus amados irmãos, João Paulo, Matheus e Celso Jr., por me mostrarem que a vida pode ser divertida e que todas as pessoas são, à sua maneira, especiais.

Ao meu primo Alexandre e à sua esposa, Fernanda, por me acolherem em sua casa quando o futuro era para mim uma incógnita.

À minha orientadora, a Prof^ª. Dr^ª. Juliana, pela acolhida, orientação e conselhos que com certeza ajudaram muito nas escolhas que fiz. Agradeço especialmente o jeito meigo que sempre tratou a mim e a todos. Obrigado por ter sempre uma palavra de ânimo quando precisei.

À minha co-orientadora, a Prof^ª. Dr^ª. Paula, por abrir as portas, pelo exemplo de profissionalismo, de dedicação e, sobretudo, pelo exemplo de calma para lidar com as situações mais adversas. Agradeço imensamente por sempre ter acreditado em mim e no meu trabalho, mesmo quando os experimentos insistiam em dar errado, quando eu falhava ou mostrava que tinha também fraquezas.

À minha querida amiga e companheira de infortúnios e alegrias científicas, Grazielle, pelo exemplo de humildade e companheirismo.

Às minhas companheiras de bancada, Fabiana e Julya, pelo companheirismo e por me mostrarem, mesmo que involuntariamente, no que eu deveria melhorar.

À Nayágara, Luiz Paulo, Fabiana, Julya, Mayara, Tereza, Bruna, Nayara e Rafael, alunos dos grupos de pesquisa das professoras Paula e Juliana, pelo auxílio e companheirismo.

A todos os colegas e professores do LABIC pelo convívio sempre harmonioso e por sempre estarem dispostos a ajudar.

Aos pacientes participantes do projeto e toda a equipe de acompanhamento do SEMPRE – Aracaju.

A todos que de alguma forma contribuíram para que este estudo pudesse ser feito.

RESUMO

A obesidade é definida como peso corporal desproporcional para a altura, com excessivo acúmulo de tecido adiposo. A desregulação no perfil metabólico e a ocorrência da inflamação crônica de baixa intensidade se destacam. Os mecanismos inflamatórios, particularmente, parecem estar implicados no desenvolvimento das doenças que podem aparecer com o aumento do nível de adiposidade. Em crianças, a obesidade parece seguir o padrão inflamatório, embora a literatura sobre o tema seja ainda difusa. É necessário também considerar que a obesidade é de origem multifatorial, com determinantes genéticos e ambientais. Nesse sentido, destacam-se os mecanismos epigenéticos, que participam no controle da expressão gênica e podem responder a alterações ambientais. A metilação de DNA é um desses mecanismos. É, de forma geral, responsável por promover repressão na transcrição gênica por impedir a ligação de fatores de transcrição aos promotores gênicos. Os estudos sobre metilação de DNA na obesidade infantil são ainda incipientes. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar a obesidade infantil sob o ponto de vista metabólico, inflamatório e epigenético por meio da avaliação de parâmetros bioquímicos, dentre eles o perfil lipídico e os níveis de enzimas hepáticas; dos níveis das citocinas IL-8 e TGF- β e das adipocinas leptina e adiponectina; e da metilação de DNA nos genes desses mediadores inflamatórios. Os parâmetros bioquímicos apontaram a ocorrência de dislipidemia e elevação de enzimas hepáticas no grupo de crianças com obesidade, a técnica de citometria de fluxo revelou maior expressão de TGF- β e menor de IL-8 na obesidade infantil e a de ELISA mostrou elevação dos níveis séricos de leptina e redução nos níveis de adiponectina. A análise de metilação de DNA por meio da técnica de PCR metilação-específica revelou diminuição nos níveis de metilação no promotor de IL-8 em crianças com obesidade. Os níveis de adipocinas e a expressão de citocinas se mostraram correlacionados. Da mesma forma, a metilação no promotor de IL-8 e a concentração sérica de enzimas hepáticas também estavam correlacionadas. Esses dados reforçam o quadro de desregulação metabólica, de mudanças na produção de citocinas e adipocinas e do envolvimento da metilação de DNA na obesidade mostrados pela literatura. As alterações particularmente vinculadas à citocina IL-8 são surpreendentes, uma vez que boa parte da literatura mostra que essa citocina se encontra regulada positivamente em quadros inflamatórios. É possível, porém, que a diminuição nos seus níveis na obesidade seja uma tentativa de conter o processo inflamatório.

Palavras-chave: adipocinas, citocinas, enzimas hepáticas, expressão, metilação de DNA

ABSTRACT

Obesity is defined as disproportional body weight for length with accumulation of adipose tissue. Dysregulation in the metabolic profile and the occurrence of low-grade inflammation are hallmarks of this condition. Inflammatory mechanisms, particularly, seem to be involved in the development of diseases that may appear with higher levels of adiposity. In children, obesity seems to follow the inflammatory pattern, although the literature about this theme is diffuse yet. In addition, it is necessary to consider that obesity has a multifactorial origin, with both genetic and environmental determinants. In this regard, it is important to give emphasis on epigenetic mechanisms, which contribute to the control of gene expression and can elicit a response to environmental changes. DNA methylation is one of such mechanisms. Generally speaking, it is important to promote transcription repression as it impedes the binding of transcription factors to gene promoters. The studies about DNA methylation on childhood obesity are incipient yet. In this sense, the objective of this study was to characterize childhood obesity under the perspective of metabolism, inflammation, and epigenetics through the evaluation of biochemical parameters, such as the lipidic profile and the level of hepatic enzymes; of the expression of the cytokines IL-8 and TGF- β and of the adipokines leptin and adiponectin; and of the DNA methylation in the genes of these inflammatory mediators. The biochemical parameters pointed out the occurrence of dyslipidemia and elevation of the levels of hepatic enzymes in the group of children with obesity, flow cytometry revealed higher expression of TGF- β and lower expression of IL-8 in childhood obesity, and ELISA showed elevation in the serum levels of leptin and decreased serum levels of adiponectin. DNA methylation analysis through methylation-specific PCR technique revealed reduced methylation levels in IL8 promoter in children with obesity. The levels of adipokines and the expression of cytokines were correlated. In the same way, methylation in IL8 promoter and the serum concentration of hepatic enzymes were also correlated. These data reinforce the picture showed by the literature of metabolic dysregulation, of changes in the expression of cytokines and adipokines, and of participation of DNA methylation in obesity. The alterations reported for IL-8 are surprising due to the literature depicting this cytokine as upregulated in inflammatory settings. However, it may be possible that its decreased levels in obesity might be an attempt to downregulate the inflammatory process.

Key words: adipokines, cytokines, DNA methylation, expression, hepatic enzymes

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Tecido adiposo magro vs. tecido adiposo obeso | 18 |
| Figura 2: Estados de metilação de DNA, da cromatina e a relação com a transcrição | 31 |
| Figura 3: Desenho experimental do estudo | 38 |
| Figura 4: Estratégia de análise das citocinas expressas pelos leucócitos | 40 |
| Figura 5: Condições de amplificação para cada gene | 42 |
| Figura 6: Níveis séricos de adiponectina e leptina em crianças dos grupos controle (C; n=9) e com obesidade infantil (O; n=11) | 45 |
| Figura 7: MIF e frequência de citocinas determinados por citometria de fluxo | 46 |
| Figura 8: Análise semi-quantitativa da metilação nos genes de citocinas e adipocinas na obesidade infantil | 48 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Sequências de primers usadas para avaliar a metilação nos promotores gênicos de IL8, TGFB1 e LEP e na região do enhancer de ADIPOQ | 42 |
| Tabela 2: Características clínicas e bioquímicas dos indivíduos envolvidos nos experimentos de ELISA, citometria de fluxo e metilação de DNA | 44 |
| Tabela 3: Correlações entre os níveis séricos de adipocinas, MIF e frequência de IL-8 e TGF- β | 47 |
| Tabela 4: Resultado qualitativo da técnica de MSP para os genes estudados | 48 |
| Tabela 5: Correlação entre os parâmetros clínicos e metilação de IL-8 | 49 |
| Tabela 6: Correlação entre parâmetros bioquímicos e metilação de IL-8 | 49 |
| Tabela 7: Correlação entre MIF de IL-8 e enzimas hepáticas | 49 |

LISTA DE ABREVIATURAS

- 5caC – 5carboxilcitosina
5fC – 5formilcitosina
5hmC – 5hidroximetilcitosina
 α -MSH – *α -melanocyte-stimulating hormone* (Hormônio α -estimulante de melanócito)
AdipoQ – Adiponectina
ADIPOQ – Gene de adiponectina
ALT – Alanina aminotransferase
AMPK – *5' AMP-activated protein kinase* (Cinase ativada por 5'AMP)
AP-1 – *Activatin Protein-1* (Proteína ativadora-1)
APC – *Allophycocyanin* (Aloficocianina)
APPL1 – *Adaptor protein, phosphotyrosine interacting with PH domain and leucine zipper 1* (Proteína adaptadora, fosfotirosina que interage com um domínio PH e zíper de leucina 1)
AST – Aspartato aminotransferase
C – Grupo controle
CaMKK – *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase* (Proteína cinase-cinase dependente de cálcio/calmodulina)
CDC – *Centers for Disease Control and Prevention* (Centro para Controle e Prevenção de Doenças)
CGI – Ilha CpG
CLS – *Crown-like structure* (Estrutura semelhante a coroa)
CpG – Dinucleotídeo citosina-guanina
CT – Colesterol total
DAMPs – *Damage associated molecular patterns* (Padrões moleculares associados a danos)
DHGNA – Doença hepática gordurosa não-alcóolica
Dnmt – DNA metiltransferase
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay* (Ensaio imunossorvente ligado a enzima)
FAK – *Focal adhesion kinase* (Cinase de adesão focal)
FSC – *Forward scatter* (Tamanho)
GGT – Gama-glutamil transferase
GJ – Glicemia de jejum
H19 – RNA longo não-codificante H19
HDL – Lipoproteína de alta densidade
HIF – *Hypoxia-inducible factor* (Fator induzível por hipóxia)
 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ – *Inhibitor of NF- κ B alpha* (Inibidor de NF- κ B alfa)
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IGF2 – *Insulin-like growth factor-2* (Fator semelhante à insulina-2)
IGFBP3 – *IGF-binding protein-3* (Proteína de ligação 3 a IGF)
IL8 – Gene de interleucina-8
IMC – Índice de Massa Corporal

IOTF – *International Obesity Task Force* (Força Tarefa Internacional de Obesidade)
 IRS – *Insulin receptor substrate* (Substrato do receptor de insulina)
 Jak – *Janus kinase* (Cinase Janus)
 KCP – *Kielin/chordin-like protein* (Proteína semelhante a kielin/cordina)
 LDL – Lipoproteína de baixa densidade
 LDL-ox – Lipoproteína de baixa densidade oxidada
 Lep – Leptina
 LEP – Gene de leptina
 LKB1 – *Liver kinase B1* (Cinase hepática B1)
 LPS – Lipopolissacarídeo
 LTBP – *Latent TGF- β -binding protein* (Proteína de ligação a TGF- β latente)
 NF- κ B – *Nuclear factor- κ B* (Fator nuclear- κ B)
 MAGP1 – *Microfibrils associated glycoprotein-1* (Glicoproteína associada a microfibrilas-1)
 MAPK – *Mitogen-activated protein kinase* (Proteína cinase ativada por mitógeno)
 MCP-1 – *Monocyte chemotactic protein-1* (Proteína quimiotática de monócitos 1)
 MeCP2 – *Methyl-CpG binding protein-2* (Proteína de ligação ao metil-CpG 2)
 MIF – *Mean intensity of fluorescence* (Intensidade média de fluorescência)
 MSP – *Methylation-specific PCR* (PCR metilação-específica)
 mTOR – *mammalian target of rapamycin* (Alvo mamífero de rapamicina)
 O – Grupo com obesidade
 OMS – Organização Mundial da Saúde
 PAMPs – *Pathogen associated molecular patterns* (Padrões moleculares associados a patógenos)
 PCR – Proteína C reativa
 PE – *Phycoerithrin* (Ficoeritrina)
 PI3K – *Phosphatidylinositol 3-kinase* (Fosfatidilinositol-3 cinase)
 PKA – *Protein kinase A* (Proteína cinase A)
 PKB – *Protein kinase B* (Proteína cinase B)
 PKC – *Protein kinase C* (Proteína cinase C)
 PLC – *Phospholipase C* (Fosfolipase C)
 PP2A – *Phosphatase 2A* (Fosfatase 2A)
 PPAR – *Peroxisome proliferator activated receptor* (Receptor ativado por proliferador de peroxissomo)
 PRRs – *Pattern recognition receptors* (Receptores de reconhecimento de padrão)
 ROS – Espécies reativa de oxigênio
 RXR- α – *Retinol X receptor- α* (Receptor X de retinol alfa)
 SEMPRE – Serviço de Medicina Preventiva
 Smad – *Mothers Against Decapentaplegic Homolog*
 SOCS3 – *Suppressor of cytokine signaling-3* (Supressor da sinalização de citocina-3)
 SSC – *Side scatter* (Granulosidade)
 STAT – *Signal transducer and activator of transcription* (Transdutor de sinal e ativador da transcrição)
 Tet – *Ten-eleven translocase* (Translocase dez-onze)
 TGFB1 – Gene do fator de transformação do crescimento β
 TGF- β – *Transforming growth factor- β 1* (Fator de transformação do crescimento beta 1)

TLR – *Toll-like receptor* (Receptor do tipo toll)

TNF – *Tumor necrosis factor* (Fator de necrose tumoral)

TRIG – Triglicérides

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 – INTRODUÇÃO | 13 |
| 1.1 – Obesidade infantil..... | 13 |
| 1.2 – Síndrome metabólica..... | 14 |
| 1.3 – Tecido adiposo | 16 |
| 1.4 – Inflamação na obesidade | 18 |
| 1.5 – Citocinas, quimiocinas e obesidade | 22 |
| 1.5.1 – Interleucina-8 (IL-8)..... | 23 |
| 1.5.2 – <i>Transforming growth factor-β1</i> (TGF-β1)..... | 24 |
| 1.5.3 – Leptina (Lep)..... | 26 |
| 1.5.4 – Adiponectina (AdipoQ) | 28 |
| 1.6 – Mecanismos epigenéticos de expressão gênica: metilação de DNA | 29 |
| 1.7 – Metilação de DNA e obesidade infantil..... | 33 |
| 2 – OBJETIVOS | 36 |
| 2.1 – Objetivo Geral | 36 |
| 2.2 – Objetivos Específicos | 36 |
| 3 – MATERIAIS E MÉTODOS | 37 |
| 3.1 – Seleção amostral..... | 37 |
| 3.2 – Coleta de amostras de sangue | 38 |
| 3.3 – Determinação dos parâmetros bioquímicos | 38 |
| 3.4 – Determinação dos níveis séricos de leptina e adiponectina..... | 39 |
| 3.5 – Citometria de fluxo do sangue periférico..... | 39 |
| 3.6 – Extração de DNA | 40 |
| 3.7 – Tratamento do DNA com bissulfito de sódio | 40 |
| 3.8 – PCR metilação específica (MSP)..... | 41 |
| 3.9 – Avaliação qualitativa e semi-quantitativa da técnica de MSP..... | 42 |
| 3.10 – Análise estatística | 43 |
| 4 – RESULTADOS | 44 |
| 4.1 – Características dos sujeitos | 44 |
| 4.2 – Níveis séricos de leptina e adiponectina e expressão de IL-8 e TGF-β em leucócitos ... | 44 |
| 4.3 – Correlação entre os níveis de adipocinas e expressão de citocinas | 46 |
| 4.4 – Metilação de LEP, ADIPOQ, IL8 e TGFB1 | 47 |
| 4.5 – Correlações entre parâmetros clínicos e bioquímicos com a metilação de IL8 | 48 |
| 5 – DISCUSSÃO | 50 |
| 6 - CONCLUSÕES | 59 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 60 |

| | |
|--|-----------|
| ANEXO I – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido..... | 84 |
| ANEXO II – Parecer do Comitê de Ética | 86 |

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Obesidade infantil

A obesidade é definida como peso corporal desproporcional para a altura, com excessivo acúmulo de tecido adiposo. Esse estado é normalmente acompanhado por um estado inflamatório crônico, sistêmico e de baixa intensidade (GONZÁLEZ-MUNIESA et al., 2017). A obesidade e o sobrepeso atingiram proporções pandêmicas, afetando quase 2 bilhões de indivíduos acima de 18 anos, 41 milhões de crianças com idade abaixo de 5 anos e 340 milhões na faixa etária entre 5 e 19 anos (OMS, 2016). Além disso, o impacto na economia mundial da doença é estimado em U\$ 2,0 trilhões de dólares (TREMMELE et al., 2016). Em crianças e adolescentes, em um período de 41 anos (1975 a 2016), a prevalência média de obesidade para a faixa etária de 5 a 19 anos no mundo saltou de 0,7% para 5,6% no sexo feminino, enquanto que os índices no sexo masculino considerando a mesma idade subiram de 0,9% para 7,8%. No Brasil, especificamente, estima-se que a prevalência de obesidade em crianças e adolescentes é de 9,4% para garotas e de 12,7% para garotos. Esses índices superam a estimativa de crianças e adolescentes subnutridos no país, que atualmente se encontra em 2,4% (ABARCA-GOMES et al., 2017; NCD-Risc, 2017). Dados de 2009 apurados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) apontam que uma em cada três crianças com idade entre 5 e 9 anos estão acima do peso de acordo com o critério da Organização Mundial da Saúde (OMS) (IBGE, 2010).

Para os adultos, a classificação da obesidade se dá mais comumente pela medida do índice de massa corpórea (IMC). Segundo este parâmetro, os indivíduos acima de 18 anos de idade são classificados como tendo sobrepeso (obesidade classe I), obesidade (obesidade classe II) ou obesidade extrema quando apresentam IMC entre 25,0 e 29,9 kg/m², entre 30,0 e 40,0 kg/m² e acima de 40,0 kg/m², respectivamente (DE LORENZO et al., 2016). Para os indivíduos menores de 18 anos de idade, vários são os critérios que tentam estabelecer a obesidade. Nos Estados Unidos, por exemplo, a obesidade infantil é definida pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) como IMC acima do 95º percentil (OWENS, 2013). Já a *International Obesity Task Force* (IOTF), utilizando dados de seis países (Brasil, Reino Unido, Hong Kong, Holanda, Singapura e Estados Unidos) e de diversas etnias, estabelece curvas ajustadas usando uma extrapolação dos valores de IMC de 25kg/m² e 30kg/m² para o sexo e idade. Dessa forma, valores de corte

de IMC diferentes para o sobrepeso e obesidade em cada sexo e idade são determinados (VALERIO et al., 2017). A OMS, por sua vez, se baseia em curvas de IMC para sexo e idade criadas tendo como referência a população de seis países (Brasil, Gana, Índia, Noruega, Omã e Estados Unidos). Por esse critério, a obesidade é caracterizada por IMC para o sexo e idade acima de dois desvios padrão da média (OMS, 2007). No Brasil, o critério preconizado para o diagnóstico da obesidade infantil, segundo o Ministério da Saúde, é baseado nas curvas de crescimento e IMC por idade da OMS (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Na comparação entre os critérios, aquele estabelecido pelo CDC apresenta maior especificidade que o critério da OMS e alta concordância com o critério da IOTF (HAJIAN-TILAKI & HEIDARI, 2013; BANJADE, NAIK, NARASANNAVAR, 2015; MEDEHOUEYOU et al., 2015).

De forma geral, a obesidade está atrelada à interação de fatores genéticos, ambientais e psicossociais que agem através de vários mediadores fisiológicos de consumo de alimento e gasto de energia, o que afeta a deposição de gordura (GONZÁLES-MUNIESA et al., 2017). Quando o consumo de energia na forma de calorias derivadas da comida e da bebida excede o gasto energético, que compreende uma combinação de taxa metabólica basal, energia necessária para absorção e atividade física, ocorre um balanço energético positivo e armazenamento de energia no tecido adiposo. Em contraste, quando o gasto energético supera o consumo, ocorre um balanço energético negativo e mobilização de energia do tecido adiposo (GARVER et al., 2013).

Nas crianças, especificamente, a relação de gasto e consumo de calorias é crítica para o desenvolvimento. Os hábitos alimentares, por exemplo, estabelecidos desde os primeiros anos de idade têm um impacto significativo sobre as preferências alimentares, crescimento e risco subsequente para o desenvolvimento de obesidade (WEN et al., 2012; PAUL et al., 2014; BOMBERG et al., 2017). Além disso, uma alta porcentagem de crianças e, principalmente, adolescentes com obesidade mantém o perfil de adiposidade para a vida adulta (GUO et al., 1994; KUMAR & KELLY, 2017).

1.2 – Síndrome metabólica

A síndrome metabólica é um conjunto de fatores metabólicos que predis põem à ocorrência de doenças. O diagnóstico da síndrome se dá através dos parâmetros de obesidade abdominal – dada pela circunferência de cintura –, dislipidemia, hiperglicemia e hipertensão (SHERLING, PERUMAREDDI, HENNEKENS, 2017). A inflamação

parece ser um fator importante associado à síndrome metabólica (SALTIEL & THOMAS, 2017; THOMAS et al., 2018). A sobrecarga crônica de ácidos graxos livres e de glicose, por exemplo, pode acionar vias inflamatórias diretamente, no caso de ácidos graxos livres, ou indiretamente por meio da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), no caso de ambos (INOBUCHI et al., 2000; KIM et al., 2007; NGUYEN et al., 2007; INGRAM & DIOTALLEVI, 2017; GRANDL & WOLFRUN, 2018).

Especificamente em relação à dislipidemia que acompanha a síndrome metabólica e a obesidade, observam-se maiores níveis de colesterol total, triglicérides e de lipoproteína de baixa densidade (LDL), enquanto que os níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL) se encontram diminuídos em relação a indivíduos saudáveis (HERTELYOVA et al., 2016; MATTOS et al., 2016; WOLFFENBUTTEL et al., 2017). É notável a associação do perfil lipídico com as doenças que acompanham a síndrome metabólica. O aumento da razão de triglicérides por HDL, por exemplo, parece ser um bom preditor de diabetes, hipertensão, de eventos cardiovasculares e mesmo de mortalidade (BITTNER et al., 2009; ONAT et al., 2010; McLAUGHLIN et al., 2003). Menção deve ser feita também ao LDL oxidado (LDL-ox), que surge da oxidação tanto de lipídeos quanto da apolipoproteína B que compõem a lipoproteína e que aumenta de concentração na obesidade (PARTHASARANTI et al., 2012). Além disso, o aumento da concentração de LDL-ox parece estar associado com todos os componentes da síndrome metabólica e de forma independente de parâmetros antropométricos e da resistência à insulina (HURTADO-ROCA et al., 2017). É fato que essa lipoproteína pode se ligar aos receptores scavenger, dos quais CD36 talvez seja o membro mais significativo (GOYAL et al. 2012). Em macrófagos, especificamente, o reconhecimento de LDL-ox mediada por CD36 promove a formação de células espumosas, importantes no desenvolvimento de aterosclerose (RAHAMAN et al., 2006; GOYAL et al., 2012).

A doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA) é a manifestação hepática da síndrome metabólica (DELLA CORTE, MAZZOTTA, NOBILI, 2016). Essa condição, que pode assumir formas desde a esteatose simples até a cirrose hepática, parece ser provocada por diversas vias desencadeadas pela complexa interação entre os fatores genéticos e ambientais sob a possível regulação de fatores epigenéticos (BUSH, GOLABI, YOUNOSSI, 2017; LEE et al., 2017). A obesidade parece ter papel preponderante no desenvolvimento da doença. Particularmente a circunferência de pescoço e a o IMC estão relacionados com o desenvolvimento de doença hepática em crianças (SCHUSTEROVA et al., 2013; HATIPOGLU et al., 2016). Além dessas

observações, já foi encontrado maior risco de desenvolvimento de doença hepática na idade adulta em crianças com obesidade, apontando que os danos podem se desenvolver de forma gradual (YAN et al., 2017).

Uma das manifestações de acometimento hepático é a elevação dos níveis de enzimas teciduais. Alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) são representantes usualmente dosados para tal diagnóstico. Enquanto que AST é encontrada no compartimento mitocondrial e citosólico catalisando a reação de conversão reversível de aspartato e α -cetogluturato em glutamato e oxalacetato, ALT é citosólica e catalisa a conversão de alanina e α -cetogluturato em glutamato e ácido pirúvico (KARMEN, WRÓBLEWSKI, LADUE, 1955; GOWDA et al., 2009). Tais enzimas atuam como marcadores de injúria hepatocelular, pois são liberadas por células em processo de necrose, mas também pelo estresse oxidativo (CONTRERAS-ZENTELLA & HÉRNANDEZ-MUÑOZ, 2016; KNUDSEN et al., 2016). Um ponto em comum entre elas, é a elevação na obesidade: quanto maior o IMC, maiores os níveis das duas e também de γ -glutamil transpeptidase (GGT) (SALVAGGIO et al., 1991). De forma semelhante, a redução de peso corporal provoca queda nos níveis desses marcadores (PALMER & SCHAFFNER, 1990; PARK, KIM, SHIN, 1995).

1.3 – Tecido adiposo

O tecido adiposo é um tipo de tecido conjuntivo no qual as células mais proeminentes, os adipócitos, são capazes de armazenar gordura (SUL et al., 1998). Há cerca de duas décadas, o tecido adiposo era reconhecido apenas como um reservatório de energia na forma de lipídeos, no caso do tecido adiposo branco, e como um tecido termogênico, no caso do tecido adiposo marrom presente em maior extensão em recém-nascidos (KUROSHIMA, 1993; ABERNATHY & BLACK, 1994). No entanto, com a descoberta das moléculas de leptina, adiponectina e de outros mediadores produzidos pelo tecido adiposo, a visão do tecido como apenas reserva energética, foi desafiada (MAFFEI et al., 1995; SCHERER et al., 1995). Atualmente, sabe-se que além das funções tradicionais, o tecido adiposo tem uma importante função endócrina, por meio da secreção de diversos hormônios e adipocinas – citocinas derivadas do tecido adiposo (RÀFOLS, 2014). Além disso, a existência de um novo tipo de adipócito foi reconhecida: o adipócito “bege”, com propriedades similares ao adipócito marrom, porém pode ser encontrado em meio a adipócitos brancos e possui origem diferente do marrom (RUI, 2017). Menção

deve ser feita também aos diferentes depósitos de tecido adiposo branco: visceral e subcutâneo; ambos com diferentes propriedades, distribuição, perfis metabólico e secretório e significados clínicos quando há alterações de um ou de outro (IBRAHIM, 2010).

Além dos adipócitos, é importante considerar as outras células que compõem o tecido adiposo e que são agrupadas sob a denominação fração vascular estromal. É composta por pré-adipócitos, células do endotélio vascular, fibroblastos e um repertório de células do sistema imune, dentre as quais células dendríticas, macrófagos, células T, células B, células NK, eosinófilos e mastócitos (BECKER, LEVINGS, DANIEL, 2017). Além das células, a matriz extracelular também tem papel importante. Destaca-se a presença de fibronectina e dos colágenos tipo I e VI e das diversas metaloproteinasas de matriz que modulam o comportamento desta (SUN et al., 2013). É interessante notar que as populações celulares e a matriz extracelular não são estáticas no tecido e que diversos fatores podem estimular alterações no perfil dos adipócitos, na contagem e função das células imunes que infiltram o tecido adiposo e na organização da matriz extracelular (SUN et al., 2013; BECKER, LEVINGS, DANIEL, 2017). Essas modificações levam, em última análise, a mudanças profundas no comportamento metabólico e secretório deste tecido (MARTINEZ-SANTIBAÑEZ & LUMENG, 2014).

Quanto ao perfil endócrino, sabe-se que o tecido adiposo é importante produtor de moléculas bioativas. Até o momento, mais de 600 moléculas diferentes foram identificadas sendo secretadas pelo tecido adiposo e tendo as mais diferentes funções: regulação da resposta imune e da inflamação, regulação metabólica, modulação da função vascular, crescimento, adipogênese e morfogênese óssea (BLÜHER & MANTZOROS, 2015). Além dos papéis desempenhados individualmente por cada adipocina, talvez seja necessário compreender também o painel conjunto das mesmas: alguns trabalhos propõem que a mensuração dos níveis de um conjunto delas ajude a discriminar os diversos estados metabólicos (KLÖTING et al., 2010; BLÜHER et al., 2012). Apesar das importantes funções desempenhadas pelas adipocinas, a translação do conhecimento advindo da pesquisa básica para a prática clínica ainda é bastante limitada (BLÜHER, 2016).

Por fim, um dos fatores para a modificação do comportamento do tecido adiposo é a obesidade. Além da evidente expansão do tecido adiposo, verificam-se alterações no perfil secretório dos adipócitos, na composição e organização da matriz e nos perfis de células imunes que povoam o tecido. Os adipócitos por vezes sofrem hipertrofia, estão

mais sujeitos à morte celular e alteram a expressão de adipocinas; a matriz tende a se tornar mais densa, com o acúmulo de colágeno – especialmente colágeno do tipo VI –, elastina e fibronectina; e ocorre aumento do número de neutrófilos, macrófagos do tipo I, células T CD8⁺, células T_H1, com a concomitante diminuição de eosinófilos, macrófagos do tipo II e linfócitos Treg (Figura 1) (SUN, KUMINSKI, SCHERER, 2011; MATHIS, 2013; MARTINEZ-SANTIBAÑEZ & LUMENG, 2014).

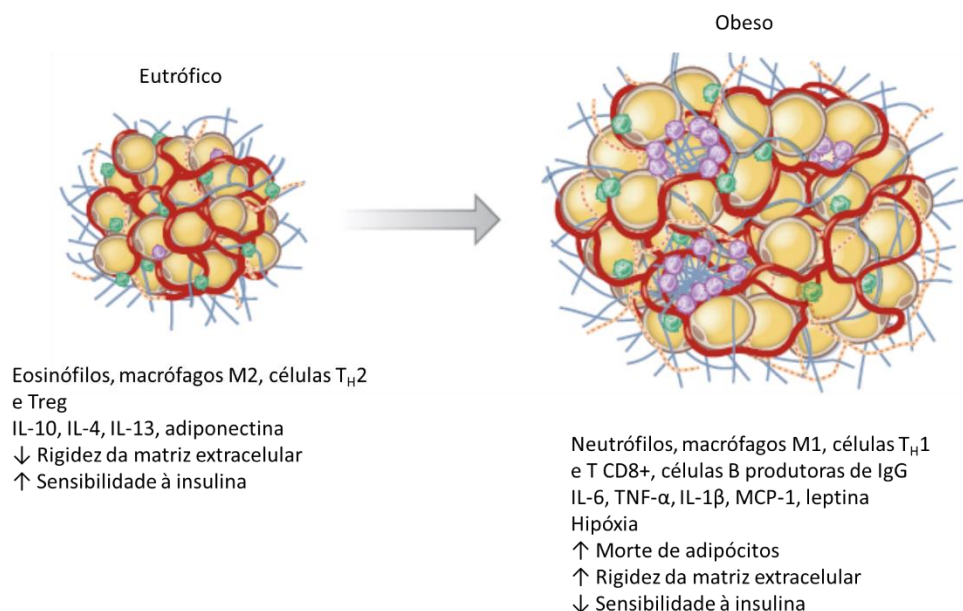


Figura 1: Tecido adiposo magro vs. tecido adiposo obeso. No tecido adiposo eutrófico predominam células e citocinas com perfil anti-inflamatório, a matriz extracelular apresenta menor deposição de colágeno, elastina e fibronectina e a sensibilidade à ação da insulina se encontra normal. No tecido adiposo obeso, por outro lado, predominam células e citocinas com perfil pró-inflamatório, há a ocorrência de hipóxia e morte de adipócitos, a matriz extracelular se encontra mais rígida com a maior deposição de componentes fibrilares e ocorre resistência à insulina (adaptado de MARTINEZ-SANTIBAÑEZ & LUMENG, 2014).

1.4 – Inflamação na obesidade

A inflamação pode ser definida como uma resposta à infecção, desafio antigênico ou lesão tecidual cujo objetivo é erradicar o agente agressor e potencializar a reparação tecidual (SHERWOOD & TOLIVER-KINSKY, 2004). O agente agressor pode ser um microrganismo ou dano tecidual com a consequente liberação de produtos intracelulares, que não são encontrados no meio extracelular. Tais agentes possuem padrões moleculares

– *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) e *Damage associated molecular patterns* (DAMPs) – que são reconhecidos por *Pattern recognition receptors* (PRRs) nas células da imunidade inata (NEWTON & DIXIT, 2012). Em resposta à ativação desses receptores, são produzidas citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos (NETEA et al., 2017).

Na obesidade e na síndrome metabólica, porém, se observa que os sinais clássicos da inflamação não são perceptíveis (HOTAMISLIGIL, 2006). Nesse sentido, a obesidade pode ser caracterizada por uma inflamação de baixa intensidade, definida como um aumento sustentado e sensível, mas significativo, nos níveis de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas e proteínas de fase aguda, que são usualmente associados à imunidade inata (ZELECHOWSKA et al., 2018). Além disso, esse quadro inflamatório é sistêmico, sendo suas consequências sentidas em diversos órgãos e é, por isso, fator de risco para o desenvolvimento de comorbidades (HOTAMISLIGIL, 2006; SALTIEL & OLEFSKY, 2017). Uma associação importante, por exemplo, é a ligação entre a obesidade e o desenvolvimento de diversos tipos de câncer (RENEHAN et al., 2008; SJÖSTRÖM et al., 2009; LIU et al., 2017). Além da relação epidemiológica, tem sido proposto que alterações no perfil celular do sistema imune, como aumento da população de células mieloides produtoras de espécies reativas de oxigênio (ROS), e a liberação de mediadores inflamatórios pelo tecido adiposo na obesidade possa liberar sinais mitogênicos e promover aumento da instabilidade genômica (LENGYEL et al., 2018).

O evento causador da inflamação na obesidade, no entanto, não está claro. Não se sabe exatamente se o excesso de gordura corporal é causa ou consequência do processo inflamatório, uma vez que a maioria dos estudos explorando esta relação tem desenho transversal e que a obesidade não mantém uma relação necessária com a inflamação (KLÖTING et al., 2010; BLÜHER, 2016). Todavia, vários mecanismos têm sido propostos para explicar o início da inflamação associada à obesidade: aumento da permeabilidade intestinal e consequentemente passagem de produtos bacterianos, em particular lipopolissacarídeo (LPS), para a circulação; aumento de certos ácidos graxos com perfil pró-inflamatório devido provavelmente à dieta; hipóxia, evento comum na expansão do tecido adiposo, com o consequente acionamento da via do *Hypoxia-inducible factor-1 α* (HIF-1 α) e aumento de mediadores inflamatórios; liberação de conteúdo intracelular em função da morte de adipócitos; alterações na matriz com a expansão do tecido adiposo, as quais podem aumentar o estresse mecânico e fazer com que os adipócitos passem a ter um perfil de expressão gênica alterado, contribuindo para

inflamação (CREWE, AN, SCHERER, 2017; SALTIEL & OLEFSKY, 2017; REILLY & SALTIEL, 2017). Além desses fatores, pode haver uma programação para o quadro inflamatório: há evidência de que o período pré-natal/perinatal e a infância podem moldar a susceptibilidade à inflamação no tecido adiposo (ALFARADHI et al., 2016; SINGER & LUMENG, 2017). Tal programação pode ser devida a regulação por meio de mecanismos epigenéticos (ALFARADHI et al., 2016).

Como já mencionado, as populações celulares derivadas do sistema imune no tecido adiposo sofrem mudanças acentuadas com a obesidade. É importante ressaltar que, além da imunidade inata, componentes da imunidade adaptativa também sofrem alterações importantes, principalmente no tecido adiposo visceral: a infiltração de linfócitos T parece um evento inicial na inflamação; as subpopulações predominantes de linfócitos T variam em cada estado metabólico; linfócitos B passam a produzir anticorpos IgG (SELL, HABICH, ECKEL, 2012). Além disso, a expansão clonal, dada pela redução no repertório de receptor de células T (TCR), e o aumento do número de células T de memória no tecido adiposo visceral sugerem que o processo possa ser guiado por um antígeno, embora tal não tenha sido identificado com clareza (YANG et al., 2010; CHNG et al., 2015).

De forma geral, pode-se dividir os tipos celulares que ocorrem no tecido adiposo em pró-inflamatórios e anti-inflamatórios, segundo a sua secreção de mediadores. Nesse sentido, macrófagos do tipo M1, mastócitos, células T_{H1}, células B, neutrófilos e células dendríticas são associadas a um perfil inflamatório do tecido adiposo; enquanto que macrófagos do tipo M2, células T_{H2}, Treg e eosinófilos secretam um painel de citocinas anti-inflamatórias e são associadas com a homeostase do tecido adiposo (MATHIS, 2013; McLAUGHLIN et al., 2017).

Dentre os tipos celulares citados, os macrófagos têm o seu perfil bem caracterizado na obesidade. Em camundongos, essas células representam de 10 a 15% do total de células imunes no tecido adiposo, enquanto que num quadro de obesidade, há um salto para até 60% (McLAUGHLIN et al., 2017). Além da quantidade, é importante destacar o subtipo que prevalece em cada um dos casos: em eutróficos predominam os macrófagos de perfil M2, ou alternativamente ativados, e nos obesos há maior ocorrência de células com perfil M1, ou classicamente ativadas. Em camundongos, os macrófagos com perfil M2 expressam na sua membrana CD11b, F4/80, CD301 e CD206, e produzem altos níveis de arginase, enzima que inibe a produção de óxido nítrico (LUMENG, BODZIN, SALTIEL, 2007). Além disso, essas células apresentam maior secreção de

citocinas com característica anti-inflamatória, como IL-4, IL-10, IL-13 e antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra), que induzem um estado de sensibilidade à ação da insulina (PIRZGALSKA & DOMINGOS, 2018). Os macrófagos M2 parecem ser induzidos especialmente por eosinófilos através das citocinas interleucina-4 (IL-4) e IL-13 (WU et al., 2011). Topologicamente, as células M2 estão presentes no interstício, entre os adipócitos, e raramente estão localizados nas *Crown-like structure* (CLS) que ocasionalmente se formam no indivíduo magro (CATRYSSSE & VAN LOO, 2018).

Por outro lado, os macrófagos M1, em camundongos, expressam CD11b e F4/80, mas são caracterizados pela expressão do marcador CD11c, de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e pela marcada produção de mediadores inflamatórios, como óxido nítrico (NO) e das citocinas IL-1 β , IL-6 e *Tumor necrosis factor- α* (TNF- α), as quais promovem um ambiente inflamatório e conduzem à resistência à insulina (LUMENG, BODZIN, SALTIEL, 2007; NGUYEN et al., 2007; McLAUGHLIN et al., 2017). Essas células, são frequentemente encontradas nas CLS, que correspondem a um adipócito necrótico rodeado por macrófagos do tipo I. Esse evento parece ocorrer quando o adipócito chega ao máximo do seu tamanho e não mais consegue armazenar o seu conteúdo lipídico (CINTI et al., 2005). Nesse sentido, a hiperplasia do tecido adiposo tem sido considerada, até certo grau, benéfica, pois expande a capacidade de armazenamento do tecido adiposo; enquanto a hipertrofia dos adipócitos parece ser um evento que conduz a um perfil mais inflamatório com a consequente produção de mediadores que concorrem para esse processo (KLÖTING & BLÜHER, 2014).

Como é de se esperar em uma condição inflamatória, ocorrem pronunciadas alterações hematológicas na obesidade. Além das variações nos níveis séricos de citocinas e de proteínas de fase aguda, o próprio perfil das células circulantes é afetado. Uma das mudanças é na contagem das células sanguíneas: indivíduos obesos apresentam maior contagem total de leucócitos, que é revertida, pelo menos parcialmente, com a perda de peso (FISCH & FREEDMAN, 1975; DIXON, PAUL, O'BRIEN, 2006). A expressão gênica nas células sanguíneas também é afetada pela obesidade, sendo que os genes com expressão diferente entre obesos e eutróficos podem estar relacionados com o metabolismo de ácidos graxos e aminoácidos e com a sinalização de linfócitos T_H (BERISHA et al., 2012). Outro achado interessante é a diferença na produção de citocinas, quimiocinas e expressão de moléculas de apresentação de antígenos e co-estimulatórias em monócitos e neutrófilos de indivíduos obesos (MATTOS et al., 2016; MEDEIROS et al., 2017). É provável que essas alterações sejam, pelo menos em parte,

derivada de modificações na medula óssea com a obesidade: a taxa de proliferação aumenta em uma dieta hiperlipídica e a expressão gênica em células-tronco mesenquimais medulares é alterada (DA SILVA et al., 2016; LIU et al., 2018). Além disso, o *Toll-like receptor-4* (TLR4) parece ser importante para algumas dessas mudanças, uma vez que camundongos nocaute para esse receptor não apresentam as alterações quando desafiados com LPS ou dieta hiperlipídica (LIU et al., 2018).

Apesar do corpo da literatura disponível apontar a inflamação como sendo deletéria na obesidade, conduzindo a diversas alterações metabólicas negativas, uma hipótese provocante, mas plausível, é que a inflamação representa uma tentativa de restabelecimento da homeostase metabólica (SALTIEL & OLEFSKI, 2017). É possível que a inflamação no tecido adiposo seja essencial para o remodelamento do mesmo no quadro de obesidade para comportar a sua expansão (YE & MCGUINNESS, 2013).

1.5 – Citocinas, quimiocinas e obesidade

Citocinas são pequenas proteínas secretadas por vários tipos celulares e que têm papéis específicos nas interações e comunicação entre as células (ZHANG & AN, 2007). Além disso, são mediadores-chave na inflamação, agindo nos processos agudos e crônicos via uma rede complexa e, por vezes, aparentemente contraditória de interações (TURNER et al., 2014).

As quimiocinas, por sua vez, são citocinas com característica quimiotática e que controlam os padrões de migração e de posicionamento de células imunes, tanto no estado de homeostase, quanto no estado de patologia (GRIFFITH, SOKOL, LUSTER, 2014). Compreendem cerca de 50 moléculas que possuem em comum o fato de terem cisteínas que formam ligações dissulfeto na porção N-terminal que mantêm a estrutura de cada monômero de uma quimiocina. Variações nas configurações dessas cisteínas dão origem às diferentes famílias dessas moléculas. Dessa forma, pode-se dividir as quimiocinas nas famílias CC, CXC (em que C é cisteína e X é um aminoácido qualquer), CX₃C e XC (HUGHES & NIBBS, 2018). De forma geral, as quimiocinas agem em receptores de sete passos transmembrana, acoplados ou não à proteína G, que desencadeiam vias que além de culminar com a migração celular, estão envolvidas com uma série de outros fenômenos celulares (HUGHES & NIBBS, 2018). Uma quimiocina fundamental no desenvolvimento da obesidade parece ser *Monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1). Sabe-se que tem papel chave no recrutamento de macrófagos do tipo M1 para o tecido

adiposo e seus níveis são correlacionados com o desenvolvimento de resistência à ação da insulina (KANDA et al., 2006; XU et al., 2015). Outra quimiocina que parece ter papel importante é CCL5, cujos níveis estão aumentados na obesidade. Além disso, a infiltração de macrófagos e a formação de CLS é reduzida em camundongos nocaute para CCR5 e há uma reversão de um perfil M1 de macrófagos para um perfil M2 (KITADE et al., 2012; OTA, 2013).

De forma geral, ocorre na obesidade, tanto em crianças quanto em adultos, desregulação da expressão de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias e nos níveis de certas quimiocinas, caracterizando o já referido estado de inflamação crônica sistêmica de baixo grau (GILBERT & SINGERLAND, 2012; MATTOS et al., 2016). Além disso, é achado comum na doença a alteração da concentração de adipocinas, citocinas produzidas e secretadas pelo tecido adiposo e que incluem resistina, leptina e adiponectina (MAFFEI et al., 1995; YANG et al., 2001; DUPONT et al., 2015). Essa alteração traz consequências sistêmicas, pois as adipocinas possuem efeitos no metabolismo de lipídeos e carboidratos. Leptina, em particular, age no sistema nervoso central sobre os centros hipotalâmicos de controle da saciedade (KURYSZKO, SLAWUTA, SAPIKOWSKI, 2016). Em crianças obesas, especificamente, há evidências de que ocorrem mudanças nos níveis circulantes de leptina e adiponectina, bem como na expressão das citocinas IL-8 e *Transforming growth factor-β1* (TGF-β) em monócitos e neutrófilos (NAGEL et al., 2006; MATTOS et al., 2016; MEDEIROS et al., 2017).

1.5.1 – Interleucina-8 (IL-8)

A quimiocina pró-inflamatória IL-8 (ou CXCL8) em humanos é um dos 15 membros da família de quimiocinas CXC e é codificada pelo gene IL8, encontrado no braço curto do cromossomo 4 (JUNDI & GREENE, 2015). Estruturalmente, IL-8, é produzida como um peptídeo de 99 aminoácidos, mas sofre clivagem para estar na sua forma ativa, cujo tamanho é de 77 aminoácidos em células não-imunes e 72 em monócitos e macrófagos (LIU et al., 2016). Tal quimiocina é secretada por uma extensa gama de células, incluindo células epiteliais do mesotélio e do endotélio, células tumorais, neutrófilos, monócitos e macrófagos (DONG & ZHENG, 2015).

IL-8 é produzida em resposta a diferentes estímulos, incluindo mudanças no ambiente químico, esteroides e sinais inflamatórios, como as citocinas IL-1, IL-6, CXCL12 e TNF-α, partículas bacterianas e espécies reativas de oxigênio. Esses estímulos

ativam a via de *Nuclear factor- κ B* (NF- κ B), o que culmina com o aumento da expressão da quimiocina (HA, DEBNATH, NEAMATI, 2017; SAHIBZADA et al., 2017). A sinalização dependente de IL-8 se dá pela sua ligação aos receptores acoplados à proteína G CXCR1 e CXCR2, que são expressos, de forma geral, nos leucócitos, em queratinócitos, fibroblastos, neurônios, hepatócitos, melanócitos, células epiteliais e endoteliais (SINGH et al., 2013; RUSSO et al., 2014). Como consequência da ligação aos receptores, há o disparo de várias vias, incluindo a de *Phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K) / *Protein kinase B* (PKB ou Akt), de *Phospholipase C* (PLC) / *Protein kinase C* (PKC) e de *Mitogen-activated protein kinase* (MAPK), bem como a ativação da *Focal adhesion kinase* (FAK), de GTPases da família Rho e da via *Janus kinase/ Signal transducer and activator of transcription* (Jak/STAT) (GALES et al., 2013). Dentre os papéis fisiológicos de IL-8 estão a indução da quimiotaxia, primariamente em neutrófilos em direção à fonte produtora, fagocitose, aumento da produção de espécies reativas de oxigênio pelas células imunes, promoção da angiogênese e liberação de redes de DNA por neutrófilos que promovem a captura e morte de microrganismos invasores (DAVID et al., 2016).

Assim como outras citocinas pró-inflamatórias, há evidências de que IL-8 está aumentada na obesidade e que se correlaciona positivamente com o IMC e outros parâmetros antropométricos relacionados com o nível de adiposidade em adultos (STRACZKOWSKI et al., 2002; KIM et al., 2006). No entanto, há também relato de menor expressão de IL-8 em neutrófilos de crianças com obesidade (MEDEIROS et al., 2017). Além disso, sabe-se que o papel quimiotático de IL-8 é importante para recrutar neutrófilos, que se infiltram no tecido adiposo (ELGAZAR-CARMON et al., 2008). Essas células, particularmente, sofrem um aumento do seu número no tecido adiposo em três dias de dieta hiperlipídica em camundongos, o que sugere que tais células podem ser uma das primeiras a sofrer alterações na obesidade (TALUKDAR et al., 2012). Um fato interessante é que a secreção de IL-8 no tecido adiposo não parece ser devida aos adipócitos, mas sim às células sanguíneas que infiltraram e a secreção pode ser secundária a elevações nos níveis de IL-1 β e TNF- α (FAIN et al., 2004; FAIN, 2006).

1.5.2 – *Transforming growth factor- β 1* (TGF- β 1)

TGF- β 1 é um fator de crescimento e citocina relacionada a imunidade, diferenciação, supressão de tumores, formação de metástase, senescência, migração

celular, reparo de feridas, divisão celular, adipogênese e osteogênese (CHANG et al., 2016). A citocina é pertencente à superfamília TGF- β , que contém 33 membros em mamíferos, incluindo as isoformas de TGF β (TGF β 1-3), proteínas morfogenéticas do osso (BMPs), ativinas, inibinas, nodal e fatores de diferenciação do crescimento (GDFs) (AYYAS, ATTISANO, WRANA, 2017). Em comum, os membros dessa família compartilham um mesmo arranjo tridimensional e cisteínas na porção C-terminal que podem formar ligações dissulfeto (MOUSTAKAS & HELDIN, 2009). Das três isoformas de TGF β existentes, TGF β 1 é a mais abundante, sendo expressa por células epiteliais, endoteliais, hematopoiéticas e do tecido conjuntivo e é codificada pelo gene TGF β 1, localizado no braço longo do cromossomo 19 (PONIATOWSKI et al., 2015; ZHU et al., 2016). Estruturalmente, a citocina na sua forma ativa consiste de um homodímero com cada cadeia polipeptídica constituída por 112 aminoácidos e peso molecular de 25 kDa (PATIL, SABLE, KOTHARI, 2011).

TGF- β 1 é produzida como proteína com frações pré- e pró-, que após o seu processamento é ligada a uma partícula associada à latência, formada pela fração pró- que foi clivada no Golgi. Dessa forma, a citocina é secretada na sua forma inativa, a qual ainda pode formar um complexo com *Latent TGF- β -binding protein* (LTBP). A mudança da forma inativa para a ativa parece depender *in vivo* de ativação proteolítica por transglutaminases e metaloproteases de matriz, mudança conformacional por meio da ligação a trombospondina e tração mecânica através da interação com integrinas (LI et al., 2006; WANG et al., 2006). Na forma ativa, TGF- β 1 pode se ligar a três diferentes receptores: T β RI, T β RII e T β RIII, que são serina-treonina cinases. Na sua via canônica, TGF- β 1 se liga a T β RII, o que promove recrutamento e fosforilação de T β RI. T β RI, por sua vez, fosforila o fator *Mothers Against Decapentaplegic Homolog 2 and 3* (Smad2 e Smad3), que interagem então com Smad4 para regular a expressão gênica no núcleo. Além disso, TGF- β 1 pode sinalizar também por vias independentes de Smad, como as vias de PI3K e MAPK (ZHU et al., 2016). Os papéis de TGF- β 1 são multifacetados, dependendo de sua concentração e da presença de outros fatores, como outras citocinas (LI et al., 2006). Em vista disso, pode desempenhar funções ligadas à regulação da resposta imune, o que acontece em boa parte dos casos, mas também pode assumir papéis pró-inflamatórios. Em monócitos, potencializa a produção de IL-1 e IL-6 e representa um estímulo quimiotático para essas células, enquanto que em macrófagos parece ser um estímulo inibitório. Em linfócitos, inibe de forma geral a formação de células B, exceto as produtoras de IgA; é responsável pela geração de células Tregs por meio da indução

da expressão de FoxP3; inibe a atividade das células T_{H1}, T_{H2}, de linfócitos T CD8⁺ e de células NK. No entanto, ativa T_{H9} e T_{H17} (LI et al., 2006; HADASCHIK & ENK, 2015). Esta citocina possui também papel pró-fibrogênico, pois medeia a expressão de genes críticos envolvidos no processo fibrótico (ROSENBLOOM et al., 2017).

Em humanos, os níveis da citocina no tecido adiposo parecem estar correlacionados positivamente com o aumento de peso corporal (ALESSI et al., 2000). Além disso, já foi relatado que a secreção de TGF- β 1 é devida, principalmente, às células da fração vascular estromal no tecido adiposo, embora os adipócitos de camundongos obesos também apresentem aumento na expressão do fator (SAMAD et al., 1997; FAIN, TICHANSI, MADAN, 2005). Em camundongos, os níveis da citocina estão aumentados com o aumento do peso corporal. De forma marcante, camundongos nocaute para Smad3, molécula-chave na via de TGF- β 1, apresentam menor ganho de peso corporal, menor tamanho médio dos adipócitos, melhores índices de resistência à insulina e um perfil de expressão gênica anti-inflamatório, quando comparado a camundongos selvagens em uma dieta hiperlipídica (YADAV et al., 2011). TGF- β 1 parece ter também um efeito negativo sobre a diferenciação de pré-adipócitos, embora pareça promover a proliferação destas células (TSURUTANI et al., 2011). Uma observação interessante, nesse sentido, é que os níveis de mRNA de TGF- β 1 se encontram elevados nos adipócitos de camundongos obesos, embora não haja nenhum efeito inibitório nessas células (SAMAD et al., 1997). Essa observação aparentemente contrastante de que os níveis de mRNA de TGF- β 1 em adipócitos de camundongos obesos pode encontrar explicação no fato de que os altos níveis da citocina possam promover um suporte à população de adipócitos indiferenciados e ao mesmo tempo impedir a sua diferenciação (ZAMANI & BROWN, 2011).

1.5.3 – Leptina (Lep)

Leptina é uma adipocina composta por 146 aminoácidos na forma ativa e possui peso molecular de 16,7 kDa, sendo codificada pelo gene LEP, localizado no braço longo do cromossomo 7 (PARACCHINI, PEDOTI, TAIOLI, 2005; WASIM et al., 2015; KURYSZKO, SLAWUTA, SAPIKOWSKI, 2016). Estruturalmente, é formada por quatro α -hélices antiparalelas interconectadas e guarda marcante semelhança com a estrutura de IL-6, IL-11 e IL-12 (VADACCA et al., 2011). Lep é secretada pelo tecido adiposo branco, e em menores níveis pelo tecido adiposo marrom, pelos órgãos linfoides

primários e secundários, medula óssea, epitélio mamário, ovários, músculo esquelético e placenta (KHAN et al., 2012). Os níveis circulantes dessa adipocina apresentam variação circadiana, com os maiores níveis entre a meia-noite e o início da manhã, embora os indivíduos obesos apresentando maior amplitude de concentração dessa adipocina ao longo do dia. Outros fatores, predominantemente o sexo e a distribuição de tecido adiposo, também regulam os níveis de Lep (SINHA et al., 1996).

As ações de Lep são mediadas pela sua ligação às seis isoformas de receptores ObR (ObRa-f), todas geradas pelo *splicing* alternativo do mesmo gene, com maior destaque para ObRb (UDDIN & MOHAMMAD, 2015). ObRb, pertencente à classe I de receptores de citocinas – a mesma dos receptores de IL-6 e fator estimulante de colônias de granulócitos – é a isoforma com maior comprimento intracelular e a única capaz de realizar a transdução completa de sinal (VADACCA et al., 2011). Quando Lep se liga ao seu receptor, várias vias de sinalização são ativadas, incluindo as vias de Jak/STAT, MAPK/ERK1/2, PI3K e de *mammalian target of rapamycin* (mTOR) (HAN & WANG, 2015). A principal função da adipocina é a regulação do metabolismo, que se dá a nível periférico e central. No sistema nervoso central, leptina age por meio da ligação a ObRb presente nos neurônios secretores de neuropeptídeo Y e de proteína relacionada à Agouti e nos neurônios secretores de *α-melanocyte-stimulated hormone* (α -MSH) (WAUMAN, ZABEAU, TAVERNIER, 2017). Naqueles há a inibição da secreção dos fatores estimuladores de apetite, enquanto que nestes ocorre o estímulo para a secreção do fator inibidor de apetite. A nível periférico, Lep inibe a adipogênese, estimula a lipólise e a queima de ácidos graxos (KURYSZKO, SLAWUTA, SAPIKOWSKI, 2016). Outras ações mediadas por leptina são promoção do crescimento e reprodução, inibição da liberação de corticosteroides – ações essas mediadas através da ligação de leptina no sistema nervoso central – e aumento da função imune (PAN & MYERS, 2017). A esse respeito, leptina tem sido associada a um perfil mais pró-inflamatório, ativando tanto a imunidade inata quanto adaptativa (FERNÁNDEZ-RIEJOS et al., 2010).

Apesar de leptina representar um sinal de saciedade, é visto que os níveis circulantes de Lep, tanto em crianças e adultos, se correlacionam diretamente com o aumento da gordura corporal (MATTOS et al., 2016; MAFFEI et al., 1995). Nesse sentido, tem sido proposto que haja na obesidade um quadro de resistência à leptina, embora os mecanismos pelos quais tal resistência se dê não sejam ainda totalmente compreendidos (FLIER & MARATOS-FLIER, 2017). É possível que componentes que

interfiram com a via de leptina tenham a sua concentração alterada na obesidade (PAN & MYERS, 2017).

1.5.4 – Adiponectina (AdipoQ)

AdipoQ é uma adipocina/hormônio codificada pelo gene ADIPOQ, localizado no braço longo do cromossomo 3 e é formada por 244 aminoácidos. Estruturalmente, se assemelha muito à proteína do complemento C1q (GHOSHAL & BHATTACHARYYA, 2015). É o hormônio peptídico com os maiores níveis plasmáticos, representando cerca de 0,01% do conteúdo plasmático total de proteínas, e é encontrada sob três formas: trimérica (67 kDa), hexamérica (140 kDa) e uma forma de alto peso molecular (300 kDa) na qual de 12 a 18 moléculas de leptina se associam (KAWASHIMA et al., 2017). AdipoQ é produzida e secretada em maior quantidade por adipócitos, mas também é lançada no sangue em menores quantidades por cardiomiócitos, hepatócitos e placenta (BALSAN et al., 2015). A sua secreção é estimulada pela insulina e inibida por TNF- α e IL-6 (KURYSZKO, SLAWUTA, SAPIKOWSKI, 2016).

AdipoQ pode se ligar aos receptores AdipoR1 e AdipoR2 e também à T-caderina (ACHARI & JAIN, 2017). No caso da ativação de AdipoR1 e AdipoR2, AdipoQ se liga à porção C-terminal dos receptores, o que ativa *Adaptor protein, phosphotyrosine interacting with PH domain and leucine zipper 1* (APPL1), a qual interage com o N-terminal do mesmo (WANG, MA, LAU, 2017). APPL1 medeia então alterações em várias vias. APPL1 ativa *Phosphatase 2A* (PP2A) e inativa *Protein kinase C ζ* (PKC ζ), o que torna ativa *Liver kinase B1* (LKB1 ou STK11). Esta, e possivelmente *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase* (CaMKK), fosforila *5' AMP-activated protein kinase* (AMPK), a qual subsequentemente fosforila acetil-CoA carboxilase, inibindo-a. Dessa forma, há a promoção de oxidação de ácidos graxos. A proteína adaptadora também se liga à subunidade p38 de MAPK, o que promove ativação dessa via. Na via de *Peroxisome proliferator activated receptor* (PPAR), APPL1 aumenta a expressão de PPAR α , que promove a atividade de acetil-CoA oxidase e de proteína desacopladora (UCP), que promovem aumento de gasto energético. A inibição da via de NF- κ B depende da elevação dos níveis de AMP cíclico (cAMP), da consequente ativação de *Protein kinase A* (PKA) e da inativação de (IkB α), que ativa o fator de transcrição. Há ainda uma comunicação entre a via de sinalização de insulina e adiponectina: na presença de adiponectina, APPL1 se liga e ativa os *Insulin receptor substrates 1 and 2* (IRS1/2),

os quais interagem com o receptor de insulina e medeiam os efeitos do receptor ativado, como a ativação da via de PI3K/Akt. Os receptores em si possuem, ainda, atividade de ceramidases, convertendo ceramidas em esfingosina-1-fostato (S1P) (MAO, HONG, DONG, 2006). Os efeitos da interação adiponectina/T-caderina parecem ser especialmente importantes para mediar a ação cardioprotetora de adiponectina (DENZEL et al., 2010).

AdipoQ tem funções antidiabética, anti-inflamatória e anti-aterogênica. Tal adipocina atua regulando o metabolismo de carboidratos e lipídeos, estimulando a captação de glicose e oxidação de lipídeos e inibindo a gliconeogênese hepática. Além disso, inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias, a expressão de moléculas de adesão em neutrófilos e a produção de ROS (KOLEVA et al., 2016). No geral, os níveis de AdipoQ são inversamente proporcionais ao IMC (YANG et al., 2001; MEILLEUR et al., 2010; MUPPALA et al., 2017).

1.6 – Mecanismos epigenéticos de expressão gênica: metilação de DNA

O termo epigenética foi cunhado na década de 1940 pelo embriologista Conrad Waddington para explicar os mecanismos causais do desenvolvimento que ligam o aparecimento de um determinado fenótipo a um dado genótipo (WADDINGTON, 1942). Após a descoberta da estrutura da molécula de DNA e das observações de que células geneticamente idênticas podem ser fenotipicamente diferentes e que não apenas mecanismos genéticos podem estar envolvidos no desenvolvimento do câncer, tal termo passou a ser entendido como as mudanças mitótica e/ou meioticamente herdáveis na função do gene que não podem ser explicadas por mudanças na sequência de nucleotídeos (MARKERT, 1968; CHOUDHURI, 2011; HU & BARRET, 2017). A nível molecular, sabe-se atualmente que os mecanismos epigenéticos incluem a metilação de DNA, a modificação covalente em resíduos de aminoácidos de histonas e a regulação promovida por moléculas de RNA não-codificantes (INBAR-FEIGENBERG et al., 2013). Por não envolverem alterações na sequência de nucleotídeos e por serem adicionadas, lidas e apagadas por uma série de proteínas e enzimas cujas funções e expressão podem ser reguladas, as modificações epigenéticas são passíveis de mudanças (ALLEGRUCCI et al., 2011; CHEN et al., 2017; WU et al., 2017). Isso torna tais modificações, assim como as proteínas e enzimas que atuam no processo, alvos terapêuticos em potencial (DUNN & RAO, 2017).

A metilação de DNA, particularmente, foi o primeiro mecanismo a ser sugerido como regulatório da função dos genes, em meados da década de 1970, no contexto da inativação do cromossomo X e do desenvolvimento (HOLLIDAY & PUGH, 1975; RIGGS, 1975). A metilação de DNA é o mecanismo epigenético mais comumente estudado em mamíferos e corresponde à adição de um radical metil ao carbono 5 de bases de citosina seguidas no sentido 3' pelo nucleotídeo de guanina (CpG), embora também possa ocorrer em citosinas seguidas por outros nucleotídeos em neurônios e células-tronco embrionárias (ZHANG & PRADHAN, 2014; HE & ECKER, 2015). As funções da metilação no genoma são o controle da expressão gênica, inativação do cromossomo X, *imprinting* e o silenciamento de elementos genéticos móveis, como retrotransposons (BOCHTLER, KOLANO, XU, 2016). O genoma humano contém aproximadamente 3×10^7 dinucleotídeos CpG, cada um dos quais pode estar metilado ou não (EDWARDS et al., 2017). A distribuição e o padrão de metilação desses CpGs, no entanto, não é uniforme ao longo do genoma. Mais de 80% dos CpGs são metilados em células somáticas humanas, tendo a sua maior concentração em sequências repetitivas de regiões intergênicas e íntrons. Em outros locais, ocorrem as chamadas ilhas CpG (CGIs), que correspondem a regiões de comprimento maior que 200pb com quantidade de nucleotídeos de citosina e guanina maior que 50% e elevada de frequência de CpGs (PORTELA & ESTELLER, 2010; ZHANG & PRADHAN, 2014; MADAKASHIRA & SADLER, 2017).

Em células somáticas, observa-se que as CGIs estão normalmente protegidas de metilação. Os promotores gênicos são locais em que as CGIs normalmente ocorrem: estima-se que 70% deles estão localizados em regiões que contêm CGIs (MOORE, LE, FAN, 2013). Nos promotores, a metilação das CGIs está relacionada com a repressão da transcrição gênica: o DNA metilado em certo local do promotor pode interferir diretamente com a ligação de fatores de transcrição ou promover o recrutamento de proteínas repressoras. No primeiro caso, certos fatores de transcrição que reconhecem sequências ricas em CG não conseguem se ligar caso haja CpGs metilados. No segundo caso, certas proteínas são atraídas para os locais onde há CpGs metilados, impedindo que os fatores de transcrição se liguem (Figura 2) (LI & ZHANG, 2014). Adicionalmente, essas proteínas, como *Methyl-CpG binding protein-2* (MeCP2), podem promover modificações covalentes nas histonas características de um estado mais compacto da cromatina, o que reforça o efeito de repressão na transcrição (AJONIJEJU et al., 2017). No entanto, já foram descritos fatores de transcrição que se ligam com alta afinidade a

CpGs metilados e casos em que o promotor gênico hipermetilado não representava entrave para a transcrição, mas o contrário (HU et al., 2013; HALPERN, VANA, WALKER, 2014).

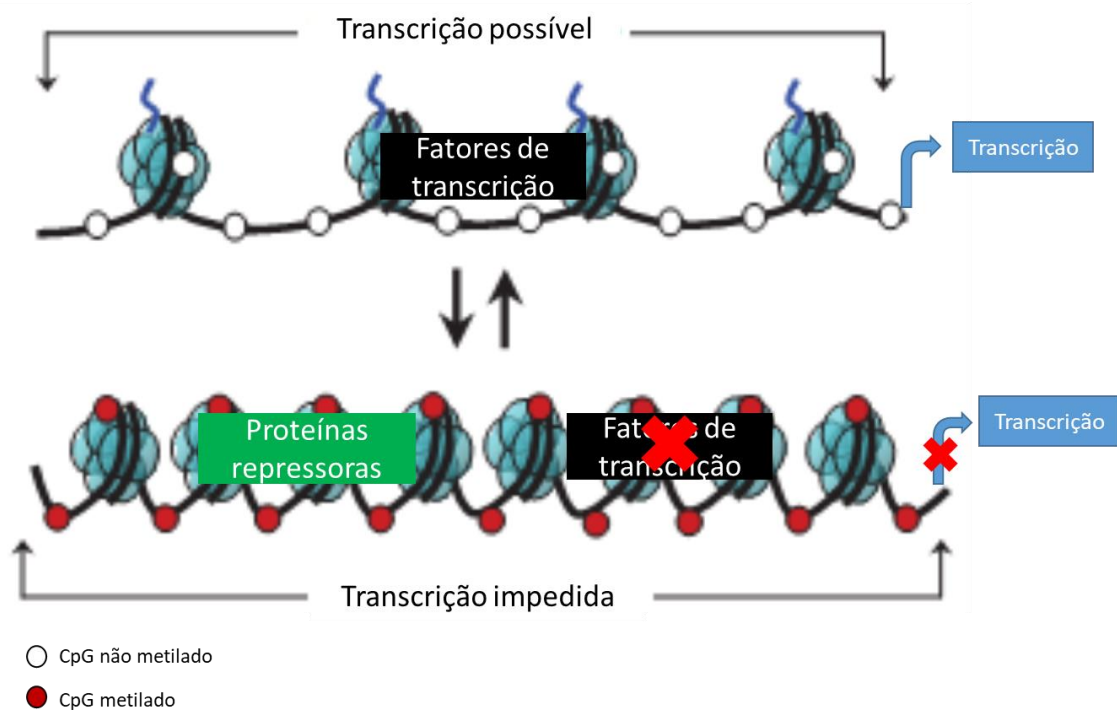


Figura 2: Estados de metilação de DNA, da cromatina e a relação com a transcrição. No primeiro caso, em que a transcrição gênica é possível, os CpGs estão em um estado não-metilado, as histonas possuem marcas associadas a um estado mais frouxo da cromatina e os fatores de transcrição podem se ligar. No segundo caso, em que a transcrição está impedida, os CpGs estão em um estado metilado, as histonas possuem marcas associadas a um estado mais compactado da cromatina, os fatores de transcrição não conseguem se ligar e proteínas repressoras, como MeCP2, mantêm esse estado repressivo à transcrição (Adaptado de JALILI et al., 2013).

O DNA é metilado por três enzimas em mamíferos: DNA metil-transferase-1 (Dnmt1), Dnmt3a e Dnmt3b. Além delas, há também Dnmt3L, a qual não possui um domínio catalítico, mas parece ser importante para a estabilidade e o direcionamento de Dnmt3a e Dnmt3b (HERVOUET et al., 2018). Essas enzimas são responsáveis pela transferência do grupo metil do doador de metil S-adenosil-L-metionina (SAM) para o carbono 5 da citosina (JIN & ROBERTSON, 2013). Embora sejam codificadas por genes diferentes, são altamente conservadas e possuem sequências de aminoácidos similares. O N-terminal dessas proteínas contém um domínio regulatório, que permite às Dnmts reconhecerem ácidos nucleicos e nucleoproteínas, e o C-terminal possui um domínio catalítico, que é responsável pela atividade enzimática (ZHANG & XU, 2017). Embora

todas empreendam a mesma ação, suas atividades são diferentes. Dnmt3a e Dnmt3b promovem a metilação de sítios não modificados no DNA e são responsáveis pela metilação *de novo* durante o desenvolvimento embrionário (RYAZANOVA et al, 2017). Dnmt1, por sua vez, é responsável pela metilação de manutenção do DNA, tendo maior afinidade por segmentos hemimetilados. Além disso, tem expressão aumentada na fase S do ciclo celular e se localiza na forquilha de replicação, onde promove a metilação na fita recém-sintetizada (BENETATOS & VARTHOLOMATOS, 2016). Apesar dessa classificação das Dnmts, os papéis que essas enzimas assumem não são sempre tão bem compartimentalizados: Dnmt1 pode em certos casos realizar metilação *de novo*, enquanto que Dnmt3a e Dnmt3b podem assumir o papel de manutenção (JELTSCH & JURKOWSKA, 2014).

Além das enzimas que promovem a metilação, é digno de nota também a maquinaria celular que remove essa marca epigenética. De forma geral, o processo de demetilação pode se dar de maneira passiva ou ativa. No modo passivo, a metilação se perde ao longo de sucessivas divisões celulares por falhas ou ausência de Dnmt1, como é o caso da demetilação do material genético materno no início do desenvolvimento embrionário. No modo ativo, a metilação é retirada pela ação da *Ten-eleven translocase* (Tet) e pela posterior ação da maquinaria celular de reparo por excisão de base do DNA, principalmente (WU & ZHANG, 2017). Neste caso, são gerados como produtos intermediários 5-hidroximetilcitosina (5hmC), 5-formilcitosina (5fC) e 5-carboxilcitosina (5caC). 5-hmC, particularmente, é o intermediário mais estável e pode carregar consigo uma informação epigenética que parece se contrapor àquela de 5-metilcitosina (MOEN et al., 2015). Já foi demonstrado, por exemplo, que as condições de alimentação materna parecem afetar a distribuição de citosinas metiladas e hidroximetiladas no promotor do gene do peptídeo anorexígeno pró-opiomelanocortina e isso parece contribuir para o desenvolvimento da obesidade por meio do silenciamento desse gene no núcleo arqueado de ratos filhos de mães alimentadas com dieta hiperlipídica (MARCO et al., 2016)

Assim como as outras modificações epigenéticas, a metilação de DNA também responde a alterações ambientais. Em gêmeos monozigóticos, por exemplo, foi mostrado que a divergência no padrão de metilação de DNA entre irmãos aumenta com o aumento da idade, o que sugere que mecanismos genéticos apenas, como polimorfismos, não fornecem a explicação para variações interindividuais (FRAGA et al., 2005). Apesar de todos os mecanismos ainda não terem sido totalmente elucidados, a atividade das Dnmts pode ser regulada por uma série de fatores, incluindo ligação a proteínas inibidoras ou

ativadoras, modificações pós-traducionais nas enzimas, ligação a moléculas de RNA não codificantes e a modificações pós-traducionais das histonas. No caso dos três últimos tipos de regulação citados, os diferentes mecanismos epigenéticos podem se relacionar e estabelecer uma comunicação, o que permite reforçar as modificações na cromatina e no perfil de expressão gênica frente aos estímulos ambientais (JELTSCH & JURKOWSKA, 2016; AMBROSI, MANZO, BAUBEC, 2017).

1.7 – Metilação de DNA e obesidade infantil

A obesidade é uma doença multifatorial, que envolve aspectos biológicos, históricos, ecológicos, políticos, socioeconômicos, psicossociais e culturais (WANDERLEY & FERREIRA, 2010). Os aspectos genéticos nessa doença já se provaram importantes para a sua caracterização, com vários polimorfismos já identificados como fatores de risco para o desenvolvimento da condição (RUPÉREZ, GIL, AGUILERA, 2014). De forma geral, as causas genéticas podem ser classificadas em monogênicas, causadas por uma única mutação, particularmente nas vias de leptina e melanocortina; sindrômicas, nas quais mutações induzem má-formações causando anormalidades no sistema nervoso ou em outros órgãos relevantes no controle de peso corporal; e poligênicas, as mais comuns, em que polimorfismos causam um efeito cumulativo no peso corporal (THAKER, 2017). No entanto, a herança genética parece explicar apenas 40-70% da variabilidade interindividual no peso corporal (WANG et al., 2015). Todavia, não devem ser descartados os fatores ambientais da equação, nem a interação destes com a genética individual, uma vez que podem contribuir para o aumento do consumo alimentar e diminuição do gasto energético (ABDELAAL, ROUX, DOCHERTY, 2017). Nesse sentido, tem-se estudado os mecanismos epigenéticos para cobrir a lacuna deixada pelos estudos genômicos (GARVER et al., 2013).

A quantidade de trabalhos sobre a metilação de DNA na obesidade infantil é menor do que a de estudos em indivíduos adultos. Estudar a metilação na infância, no entanto, é de especial importância, uma vez que há evidências, embora estas não sejam inequívocas, de que os padrões de metilação estabelecidos no início da vida são persistentes (HEIJMANS et al., 2008; TOBI et al., 2009; LUMEY et al., 2012; ZHENG et al., 2014). Além disso, fatores que podem impactar o perfil de expressão e metilação na idade adulta, como a ocorrência de comorbidades e de certos hábitos, como o fumo e o

consumo de bebida alcoólica, têm a sua importância minimizada ou não existem em crianças e adolescentes (TAM et al., 2010).

No conjunto, a literatura relacionada à metilação de DNA na obesidade infantil é recente e bastante heterogênea. Observa-se que a maioria dos estudos possuem característica transversal, e por isso mostram apenas associação das medidas antropométricas e a metilação de DNA (DAVÉ et al., 2015; DING et al., 2015; ÁCS et al., 2017; SAMBLAS et al., 2017). Outros, por outro lado, empregam análises longitudinais, mas que acompanham os indivíduos por um período curto de tempo ou que selecionam dados pontuais ao longo do tempo (GODFREY et al., 2011; PAN et al., 2015; RICHMOND et al., 2016). Os tipos de amostra utilizados para avaliar a metilação também são diversos: sangue periférico e subpopulações de leucócitos, saliva, cordão umbilical e células derivadas da placenta (ST-PIERRE et al., 2012; PAN et al., 2015; DUNSTAN et al., 2017; GARCÍA-CARDONA et al., 2017). O tecido adiposo, no entanto, não é utilizado devido à dificuldade de obtenção e por questões éticas (VAN DIJK et al., 2015). Quanto à abordagem metodológica para detecção de metilação, alguns utilizam metodologias voltadas para o estudo nos promotores de genes selecionados, ou fazem uma análise *genome wide*, na qual milhares de CpGs ao longo do genoma são interrogados quanto ao status de metilação (MICHELS et al., 2011; ALMÉN et al., 2012; ERIKSSON et al., 2015; ALI et al., 2016). Em relação aos achados reportados, também é possível observar grande diversidade. Estudos tendo como alvo o mesmo gene, por exemplo, relatam vários resultados e os estudos com característica *genome wide* raramente concordam nos CpGs diferencialmente metilados para diferentes grupos de crianças com obesidade (RASTOGI, SUZUKI, GREALLY, 2013; XU et al., 2013; DAVÉ et al., 2015; VOLBERG et al., 2017). No entanto, é necessário destacar que importantes relações já têm sido descritas. Aqueles utilizando a abordagem de escolha de alguns genes encontraram forte associação entre a metilação do *loci* de *imprinting* de *Insulin-like growth factor-2/RNA* longo não codificante H19 (IGF2/H19) e do gene de HIF3A, que codifica o *Hypoxia-inducible factor -3 α* (HIF-3 α), respectivamente, e os parâmetros antropométricos em crianças (PERKINS et al., 2012; DICK et al., 2014; WANG et al., 2015; ÁCS et al., 2017; LEE et al., 2017). Já os com característica *genome wide* por vezes relatam alterações na metilação de genes associados com metabolismo de lipídeos e adipogênese (FRYER et al., 2011; RELTON et al., 2012), ação da insulina (OELSNER et al., 2017; YANG et al., 2018), desenvolvimento embrionário (RELTON et al., 2012; DING et al., 2015), câncer (FRADIN et al., 2017; OELSNER et al., 2017) e

regulação do sistema imune (RELTON et al., 2012; MANSEGO et al., 2017; RZEHAK et al., 2017).

A metilação nos genes das citocinas tem sido pouco estudada na obesidade infantil, apesar dos seus níveis de expressão estarem alterados em monócitos e neutrófilos de crianças com obesidade (MATTOS et al., 2016; MEDEIROS et al., 2017). Embora estudos apontem alteração da metilação nos genes de algumas e sua associação com dados de peso corporal e adiposidade em crianças, nenhum deles se dedicou a analisar detalhadamente o perfil de metilação dos promotores destes genes, assim como sua correlação com a expressão gênica (HERMSDORFF et al., 2013; VAN DIJK et al., 2014; RASTOGI, SUZUKI, GREALLY, 2013). No caso de leptina e adiponectina, no entanto, há trabalhos relacionando a metilação nos promotores desses genes e parâmetros relacionados à adiposidade (GARCÍA-CARDONA et al., 2014; ALLARD et al., 2015; DUNSTAN et al., 2017; KADAKIA et al., 2017). Apesar disso, os resultados relatados não são congruentes, o que reforça a ideia de que mais estudos devem ser feitos. No caso de IL8 e TGFB1, ainda não foram feitos trabalhos investigando diretamente a relação da metilação desses genes com a expressão dos mesmos na obesidade infantil. Os únicos achados que sugerem a relação da metilação desses genes com a obesidade infantil são os maiores níveis de metilação no promotor de TGFB1 em crianças com asma e obesidade em relação a crianças com peso normal e as diferenças na metilação de vários genes na via de IL-8 em crianças nascidas após a realização de cirurgia bariátrica pelas mães em comparação com irmãos nascidos antes da cirurgia (GUÉNARD et al., 2013; RASTOGI, SUZUKI, GREALLY, 2013)

Em vista do que foi exposto, a hipótese do trabalho é que na obesidade infantil há alteração no perfil bioquímico – englobando os perfis lipídico, glicídico e de enzimas hepáticas – nos níveis intracelulares de citocinas (IL-8 e TGF- β 1) em leucócitos e na concentração sérica de adipocinas (Lep e AdipoQ) e que a metilação de DNA participa de tais alterações.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral

Estudar os marcadores bioquímicos, o padrão de expressão e metilação de citocinas e adipocinas na obesidade infantil.

2.2 – Objetivos Específicos

Avaliar os dados clínicos e bioquímicos em crianças eutróficas e com obesidade.

Avaliar os níveis séricos de leptina e adiponectina e a expressão de IL-8 e TGF- β em leucócitos de crianças eutróficas e com obesidade.

Avaliar nas células do sangue total os perfis de metilação dos promotores dos genes IL8, TGFB1, ADIPOQ e LEP em crianças eutróficas e com obesidade.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Seleção amostral

Os pacientes que concordaram em participar desse estudo foram identificados e selecionados junto ao Serviço de Medicina Preventiva (SEMPRE) em Aracaju (SE, Brasil). Os indivíduos foram avaliados antropometricamente utilizando a balança mecânica antropométrica Filizola M31 (FILIZOLA, Brasil), considerando peso (kg) e altura (cm) na posição vertical. O IMC (kg/m^2) foi calculado pela razão do peso pelo quadrado da altura em metros. O IMC de crianças e adolescentes foi expresso em percentis, os quais foram enquadrados em tabelas de crescimento elaboradas pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) (KUCZMARSKI, 2002). Segundo esse critério, a obesidade é definida como IMC igual ou superior ao do 95º percentil para crianças e adolescentes de mesma idade e sexo. Para inclusão no grupo com obesidade infantil, portanto, as crianças deveriam apresentar IMC maior que o 95º percentil, além de participar do programa de emagrecimento, apresentar idade entre 7 e 12 anos, nunca ter usado medicação anti-obesidade e consentir em participar do estudo (anexo I). Já para inclusão no grupo controle, as crianças deveriam ter IMC entre os percentis 10-85 e apresentar o consentimento em participar do estudo. Foram excluídas as crianças que: apresentavam doença psiquiátrica, como depressão e esquizofrenia; usaram medicação anti-obesidade anteriormente ou estavam em uso de algum medicamento no momento do estudo; apresentavam transtornos alimentares, como bulimia; receberam imunização nos 3 meses anteriores à coleta; recusaram participar do estudo. Seguindo tais critérios, 30 crianças (7 a 12 anos de idade) foram selecionadas para o grupo com obesidade infantil, enquanto que o grupo controle foi composto por 31 crianças (7 a 12 anos de idade). Todos os responsáveis legais, assim como as crianças, foram informados sobre os objetivos e protocolos deste estudo e assinaram um termo de consentimento aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais. Independente da participação, todos os indivíduos atendidos foram submetidos a um protocolo padrão de avaliação, acompanhamento e tratamento clínico. Esse estudo foi feito de acordo com todas as diretrizes brasileiras e internacionais e foi aprovado pelo Comitê de Ética na Plataforma Brasil (CAAE- 04065412.6.0000.5526) (anexo 2).

3.2 – Coleta de amostras de sangue

Após 12h de jejum, 12mL de sangue periférico foi coletado por punção venosa de cada sujeito dos grupos controle (n=31) e com obesidade infantil (n=30) usando três tubos estéreis Vacutainer®, cada um com 4mL. Tubos contendo ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) como anticoagulante foram usados para obter sangue total para os ensaios de citometria e de *Methylation-specific PCR* (MSP). Tubos sem anticoagulante foram utilizados para obter soro para a determinação dos níveis séricos dos marcadores bioquímicos, de leptina e adiponectina. A Figura 3 mostra o desenho experimental para este estudo. As amostras foram coletadas por uma enfermeira treinada no SEMPRE em Aracaju.

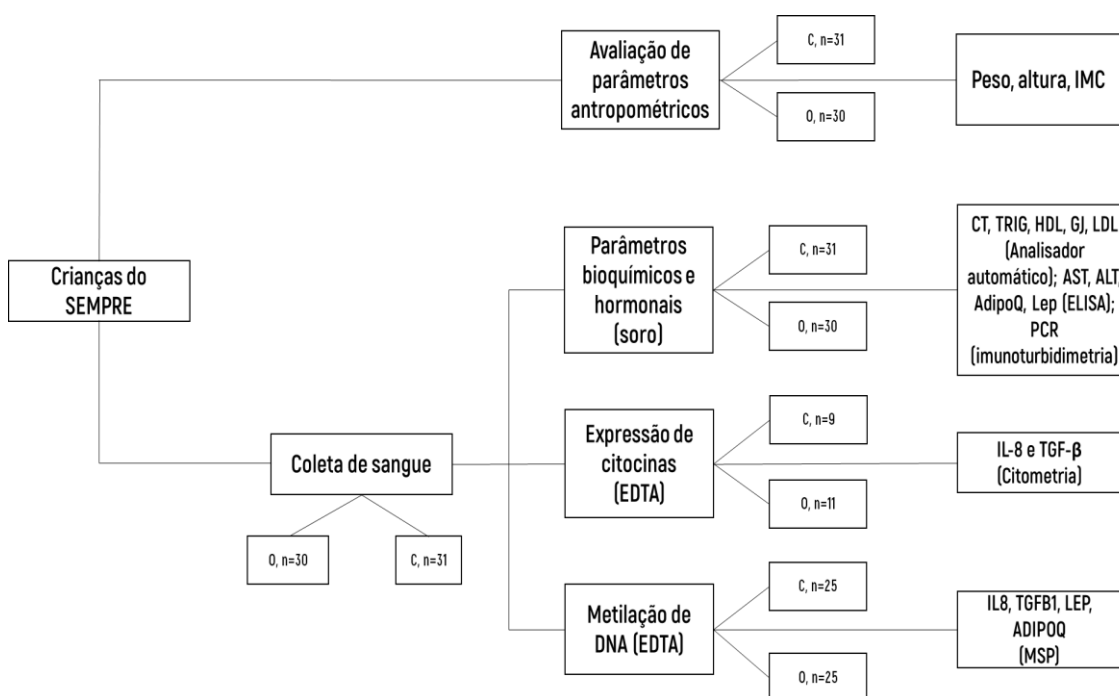


Figura 3: Desenho experimental do estudo. C: grupo controle; O: grupo com obesidade.

3.3 – Determinação dos parâmetros bioquímicos

Os parâmetros bioquímicos foram avaliados no soro das crianças do grupo controle (n=31) e do grupo com obesidade (n=30). Colesterol total (CT), triglicérides (TRIG), lipoproteína de alta densidade (HDL) e glicemia de jejum (GJ) foram mensurados através de ensaio enzimático colorimétrico usando o analisador bioquímico automático Roche-Hitachi 912 (Roche Diagnostics, Basileia, Suíça). Os valores de lipoproteína de densidade baixa (LDL) foram calculados através da fórmula de

Friedewald (FRIEDEWALD et al., 1972). Os níveis de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) foram auferidos usando kit para ensaio imunoenzimático (ELISA) conforme orientações do fabricante (Alexis Biochemical/BioAgency, São Paulo, Brasil). Os níveis de proteína C reativa (PCR) foram obtidos por imunoturbidimetria em espectrofotômetro Image (Beckman Coulter, USA).

3.4 – Determinação dos níveis séricos de leptina e adiponectina

A concentração de adiponectina e leptina foi determinada em amostras de soro de crianças do grupo com obesidade (n=11) e de crianças do grupo controle (n=9) por meio do ensaio imunoenzimático (ELISA), segundo as instruções do fabricante (Alexis Biochemical/Vender BioAgency, São Paulo, Brasil).

3.5 – Citometria de fluxo do sangue periférico

Alíquotas (100 μ L) de sangue periférico de pacientes do grupo com obesidade (n=11; mesmas amostras submetidas à técnica de ELISA) e de pacientes do grupo controle (n=9; mesmas amostras submetidas à técnica de ELISA) foram incubadas com 20 μ L Brefeldina-A na concentração final de 10 μ g/mL (SIGMA-EUA) por 4 horas em 5% de CO₂ a 37°C. Após o período de incubação, as células foram ressuspendidas e incubadas com anticorpos monoclonais para identificação de moléculas de superfície (não avaliadas no presente estudo) por 30 minutos à temperatura ambiente no escuro. Depois desse passo, foi adicionado 2mL de uma solução comercial de lise de eritrócitos (FACS Lysing Solution-BD, EUA) e deixado por 10 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram lavadas por centrifugação usando tampão PBS com 1% de albumina sérica bovina (BSA), permeabilizadas usando PBS e 0,5% de saponina e incubadas com 1 μ L de anticorpos monoclonais (BD PharmingenTM) não-diluídos anti-IL-8 (G265-8) conjugado com alofococianina (APC) e TGF- β (TW4-9E7) conjugado com ficoeritrina (PE) por 30 minutos no escuro. As amostras foram então lavadas por centrifugação, fixadas com solução de formaldeído 4% e analisadas no citômetro de fluxo FACSCantoTM II (BD Biosciences, Breda, Holanda). No total, 70000 eventos foram obtidos por amostra. As análises subsequentes foram feitas usando o software FlowJo 7.9.3 (Tree Star Inc., Ashland, OR, EUA). Para realizar a seleção de linfócitos, granulócitos e monócitos, foram utilizados os parâmetros de *Forward-scatter* (FSC) e *Side-scatter* (SSC). A partir da

seleção, foi possível determinar a frequência de células expressando cada um dos marcadores e o parâmetro de *Mean intensity of fluorescence* (MIF). A figura 3 é representativa do modo como foi feita a seleção e análise na população de células que foi investigada.

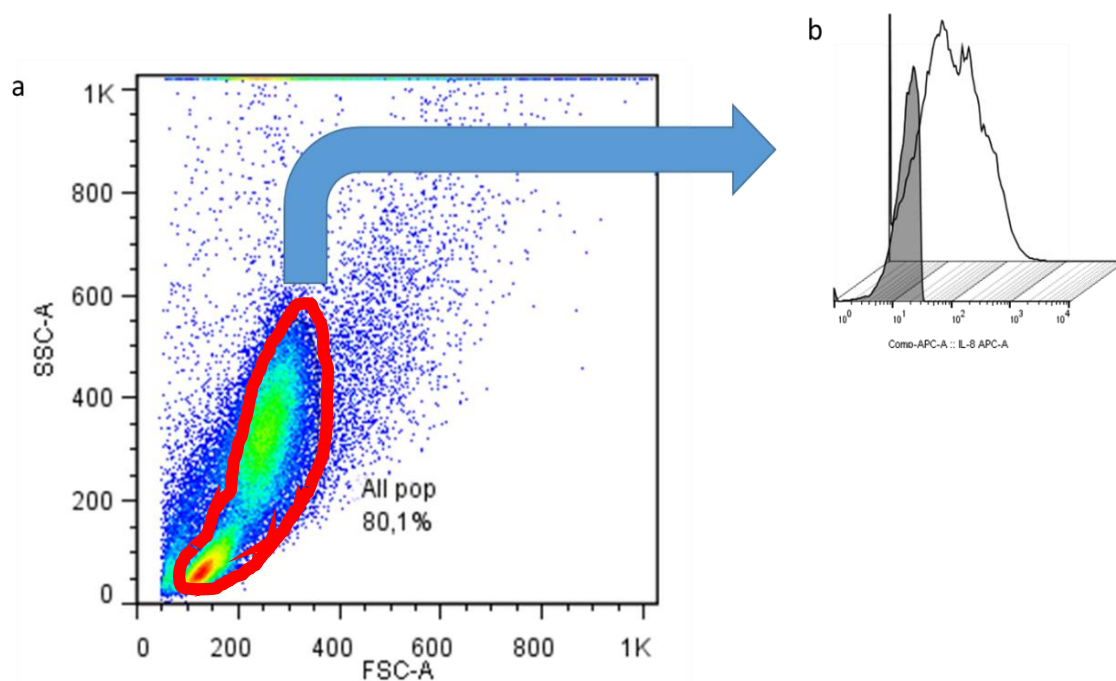


Figura 4: Estratégia de análise das citocinas expressas pelos leucócitos. (a) Gráfico de dispersão pontual de tamanho celular (FSC) versus granulosidade celular (SSC) para definição das regiões correspondentes das populações de granulócitos, monócitos e linfócitos totais. Foi construído um “gate” (em vermelho) selecionando a população de leucócitos totais. (b) Sobreposição dos gráficos de histograma que representam as células não marcadas (área cinza) e a amostra a que corresponde ao gráfico de dispersão pontual (área branca) para avaliação da expressão intracelular de citocinas (IL-8, no caso da figura) na população de leucócitos totais.

3.6 – Extração de DNA

O DNA das células do sangue periférico foi extraído através do QIAamp DNA Tissue Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA obtido (50µL) foi estocado a -20°C. A quantificação do DNA foi determinada pelo espectrofotômetro DeNovix Ds-11 (Wilmington, DE, EUA).

3.7 – Tratamento do DNA com bissulfito de sódio

Após a extração do DNA, as amostras dos grupos controle (n=25) e com obesidade (n=25) foram tratadas com bissulfito de sódio, segundo a técnica de Goldenberg et al (2004). O tratamento com bissulfito de sódio converte todas as citosinas não metiladas em uracila, enquanto as citosinas metiladas permanecem como citosinas. Brevemente, 0,5µg de DNA de cada amostra, previamente desnaturado pela incubação com 2µL de hidróxido de sódio (NaOH) 3M por 20min a 50°C, foi tratado com bissulfito de sódio 2,5M e hidroquinona 1M por 3h a 70°C. Após o período de incubação, as amostras foram purificadas com a resina de purificação Wizard DNA (Promega, Madison, WI, EUA) e eluídas em água destilada. NaOH 3M foi adicionado para completar a modificação e esta foi seguida por precipitação com etanol. Após centrifugação por 15min a 13000g, os pellets foram ressuspensos e o DNA foi usado para os ensaios de PCR subsequentes.

3.8 – PCR metilação-específica (MSP)

A técnica de MSP distingue a presença de metilação baseada em alterações produzidas após o tratamento do DNA com bissulfito usando primers específicos para o DNA metilado e não-metilado. As sequências dos primers usados para os genes LEP e para região enhancer de ADIPOQ foram desenhados pelo *software MethPrimer Design for Methylation PCR* (LI & DAHIYA, 2002). Os primers para avaliar os genes IL8 e TGFB1 foram previamente descritos por Andia et al. (2010) e Wang et al. (2013), respectivamente. A tabela 1 mostra as sequências dos primers utilizados. As reações de PCR foram realizadas em um volume total de 25µL contendo 2,5µL de tampão de PCR 10x, 5µL de dNTP-mix (1mM de cada base), 0,75µL de cloreto de magnésio 50mM, 0,5µL de cada primer (20pmol/µL), 2,5 unidades de Taq-Platinum DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e 200ng de DNA. As condições de amplificação para cada reação estão descritas na figura 4 e foram programadas no termociclador Mastercycler personal (Eppendorf AG, Alemanha). DNA tratado com a CpG Methyltransferase (M.SssI) (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA) foi usado como controle positivo nas reações envolvendo o par de primers metilados. DNA de células mononucleares do sangue periférico previamente testado foi usado como controle positivo para as reações envolvendo DNA não-metilado, similar ao que foi reportado por Brakensiek et al. (2005). Os produtos de PCR foram aplicados em duplicata em gel de poliacrilamida 6,5% corados com solução de prata 14,4mM. As imagens dos géis foram

obtidas utilizando o scanner Epson Stylus TX110, configurado na resolução de 600dpi, e salvas como arquivos de extensão .tiff.

Tabela 1: Sequências de primers usadas para avaliar a metilação nos promotores gênicos de IL8, TGFB1 e LEP e na região do enhancer de ADIPOQ.

| Gene | Sequência (5'→3') | Produto (pb) | Temperatura de anelamento (°C) |
|------------|---|--------------|--------------------------------|
| IL8 – M | F: AAAATTTTCGTTATATTTTCG R: TCCGATAACTTTTTATATCAT | 173 | 49 |
| IL8 – U | F: AAATTTTGTATATTTTG R: TCCAATAACTTTTTATATCAT | 173 | 45 |
| TGFB1 – M | F: TATATCGTTCGTAAGTTATAGCGT R: AACATAAAAAAACTAAACCACCGTC | 184 | 55 |
| TGFB1 – U | F: ATTTATATTGTTTGTAAAGTTATAGTGT R: AACATAAAAAAACTAAACCACCATC | 184 | 55 |
| LEP – M | F: TTTGGAGGGATATTAAGGATTTTTTC R: ATAACGACGTACCGAACGAC | 165 | 57 |
| LEP – U | F: TTTGGAGGGATATTAAGGATTTTTTT R: TCAAAATAACAACATACCAAACAAC | 170 | 57 |
| ADIPOQ – M | F: TAATTTTCGTTTTTTGGGTTTAAAC R: ACGAAAATAATAAAACCCCGTC | 132 | 56 |
| ADIPOQ – U | F: TTTTGTTTTTTGGGTTTAAATGA R: CTAACAAAATAATAAAACCCCATC | 132 | 56 |

F: forward primer; R: reverse primer; pb: par de base

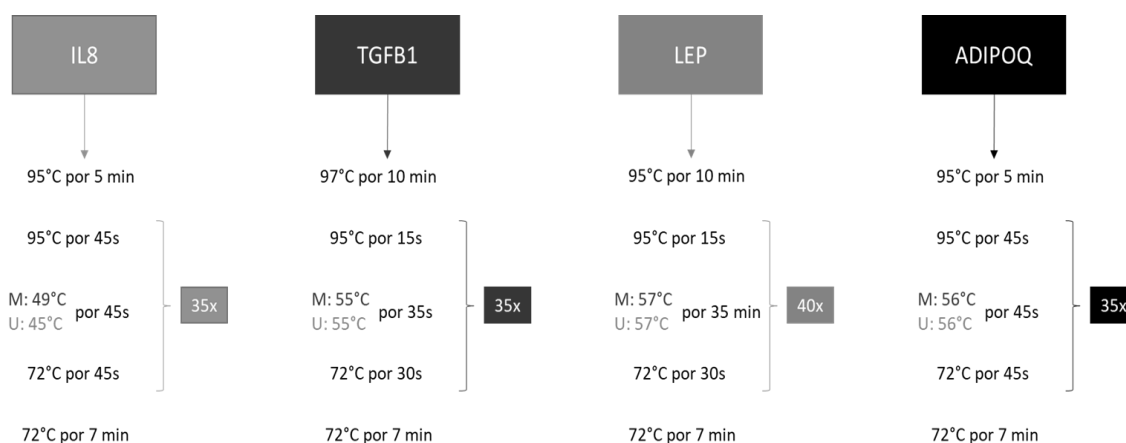


Figura 5: Condições de amplificação para cada gene. M: temperatura de anelamento para o primer metilado; U: temperatura de anelamento para o primer não-metilado.

3.9 – Avaliação qualitativa e semi-quantitativa da técnica de MSP

Na avaliação qualitativa dos resultados de MSP, a amplificação somente para primers metilados (M) de um gene foi interpretada como amostra com metilação total (M^+) para o gene em questão, enquanto que a amplificação apenas para os primers não-

metilados (U), como amostra não metilada (U⁺) para o dado gene. A amplificação para ambos os primers, M e U, foi considerada como metilação parcial (M⁺/U⁺), de acordo com Kwon et al. (2008).

Para estimar os níveis de metilação, foi utilizada uma estratégia de análise semi-quantitativa. As bandas obtidas após MSP de cada uma das amostras foram selecionadas e quantificadas usando o *software* ImageJ, o qual foi empregado para determinar a densidade óptica integrada (IOD), que se refere ao produto do nível de cinza médio dos pixels da região selecionada pela área, de cada banda. A porcentagem de metilação para cada amostra foi determinada a partir da relação entre o valor de IOD da banda metilada e da não-metilada para cada amostra, como feito em Keyes et al (2007), tendo como referência a seguinte equação:

$$\% \text{ metilação} = \frac{100 \times IODm}{IODm + IODu}$$

, na qual IODm e IODu se referem à densidade óptica integrada das bandas metilada e não-metilada, respectivamente, para uma mesma amostra considerando o mesmo gene.

3.10 – Análise estatística

As análises estatísticas foram conduzidas no software GraphPad Prism 5.0. Os dados qualitativos foram avaliados pelo teste exato de Fisher. Os dados de variáveis quantitativas primeiramente foram avaliados quanto a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. A partir desse teste, foram aplicados os testes de Mann-Whitney para os dados que não seguiram distribuição normal ou teste t de Student para os dados que seguiram distribuição normal. As análises de correlação foram feitas utilizando o teste de Pearson para dados paramétricos ou o teste de Spearman para dados não-paramétricos. Em todos os casos, o nível de significância assumido foi de 5%.

4 – RESULTADOS

4.1 – Características dos sujeitos

A tabela 2 mostra as características dos grupos de estudo. As crianças do grupo com obesidade apresentaram maior peso, IMC, colesterol total (CT), lipoproteína de baixa densidade (LDL), triglicérides (TRIG), proteína C reativa (PCR), aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) que o grupo controle. Por outro lado, tiveram menores níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL). Ao considerarmos cada um dos experimentos em separado (ELISA/citometria de fluxo e metilação de DNA), as comparações significativas apresentadas na tabela 2 se mantiveram entre os grupos (dado não mostrado).

Tabela 2: Características clínicas e bioquímicas dos indivíduos envolvidos nos experimentos de ELISA, citometria de fluxo e metilação de DNA.

| | Grupo controle (C) | Grupo com obesidade (O) | Valor de referência |
|--------------------------|--------------------|-------------------------|---------------------|
| n, total | 31 | 30 | |
| Masculino | 15 | 14 | |
| Feminino | 16 | 16 | |
| Idade (anos) | 9,42 ± 1,71 | 9,50 ± 1,66 | |
| Altura (cm) | 148,00 ± 29,17 | 146,10 ± 9,52 | |
| Peso (kg) | 37,85 ± 10,07 | 59,91 ± 14,79*** | |
| IMC (kg/m ²) | 17,79 ± 2,25 | 27,99 ± 4,07*** | <percentil 95 |
| GJ (mg/dL) | 83,10±10,58 | 88,03±8,27 | <100mg/dL |
| CT (mg/dL) | 149,10±16,26 | 177,80±26,62*** | <170mg/dL |
| LDL (mg/dL) | 86,94±15,80 | 108,30±31,00** | <130mg/dL |
| HDL (mg/dL) | 47,81±5,79 | 37,70±6,20*** | >45mg/dL |
| TRIG (mg/dL) | 89,10±19,99 | 174,00±69,11*** | <130mg/dL |
| PCR (mg/L) | 0,06±0,05 | 1,41±0,82*** | <1,0mg/L |
| AST (U/L) | 13,32±3,57 | 25,00±8,91*** | <35 U/L |
| ALT (U/L) | 15,03±3,52 | 27,03±10,02*** | <56 U/L |

GJ: glicemia de jejum; CT: colesterol total; LDL: lipoproteína de baixa densidade; HDL: lipoproteína de alta densidade; TRIG: triglicérides; PCR: proteína C reativa; AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão. **p<0,01; ***p<0,001.

4.2 – Níveis séricos de leptina e adiponectina e expressão de IL-8 e TGF-β em leucócitos

Os dados obtidos pela técnica de ELISA mostram uma distinção clara entre os grupos de crianças sob o aspecto dos níveis séricos de adiponectina e leptina (Figura 5), sugerindo alterações na fisiologia do tecido adiposo nas crianças com obesidade. Os níveis de adiponectina apresentaram redução média de 12 vezes no grupo com obesidade ($O=1.517 \pm 0.1047$ vs. $C=18.39 \pm 1.261$), enquanto que os níveis de leptina se mostraram aumentados em média 3 vezes no mesmo grupo em comparação com o grupo controle ($O=20.45 \pm 1.617$ vs. $C=6.403 \pm 0.5623$).

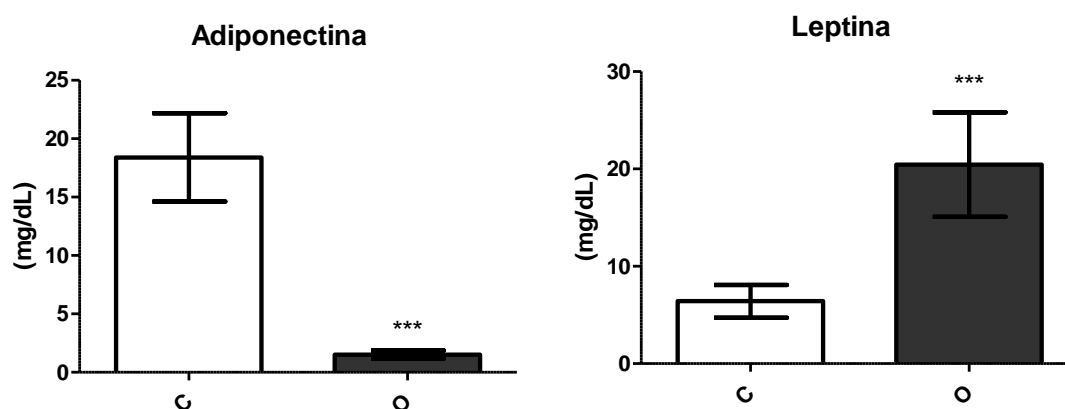


Figura 6: Níveis séricos de adiponectina e leptina em crianças dos grupos controle (C; n=9) e com obesidade infantil (O; n=11). Para a comparação das médias, utilizou-se teste-t não-pareado. Os dados são representados como média \pm desvio padrão. *** $p < 0,001$.

Quanto as citocinas IL-8 e TGF- β pode-se observar que estão diferencialmente expressas no grupo de crianças com obesidade em comparação com o grupo controle (Figura 6). Enquanto que a intensidade média de fluorescência (MIF) de IL-8 está diminuída no grupo com obesidade, a frequência de células positivas para TGF- β está aumentada neste mesmo grupo em relação ao grupo controle. Os dados sugerem alterações na maquinaria envolvida na expressão gênica em crianças com obesidade: seja porque as células produtoras de IL-8 estão expressando menos tais citocinas, seja porque outros tipos celulares ou uma frequência maior das células que produzem TGF- β estão expressando esse fator.

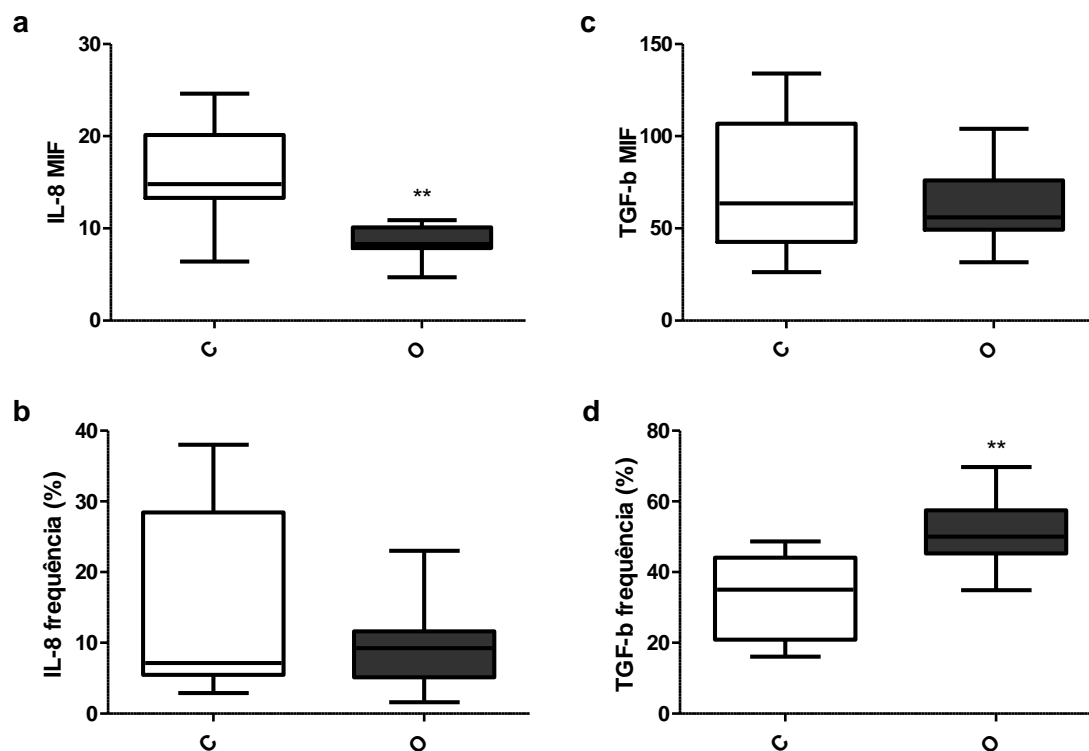


Figura 7: Gráficos de box plot mostrando MIF e frequência de citocinas determinados por citometria de fluxo. Em (a) e (c) são mostrados os valores de MIF para as citocinas IL-8 e TGF- β , respectivamente, em crianças dos grupos controle (C; n=9) e com obesidade (O; n=11). Em (b) e (d) são mostrados os valores de frequência de células expressando as referidas citocinas nos mesmos grupos. Para a comparação entre os grupos em cada caso foi utilizado o teste de Mann-Whitney (b) ou teste-t não-pareado (a), (c) e (d). Os gráficos destacam a mediana e o intervalo interquartil. **p<0,01.

4.3 – Correlação entre os níveis de adipocinas e expressão de citocinas

A análise de correlação entre os níveis de citocinas e adipocinas entre si revelaram correlações positivas entre MIF de IL-8 e MIF de TGF- β , entre os níveis séricos de leptina e a frequência de TGF- β e entre os níveis séricos de adiponectina e MIF de IL-8 (Tabela 3). Por outro lado, houveram correlações negativas entre adiponectina e a frequência de TGF- β , a concentração de leptina e MIF de IL-8 e entre os níveis de leptina e adiponectina. Esses dados, se tomados em conjunto, reforçam as diferenças encontradas até então (Figuras 5, 6a e 6d). Além disso, é possível que as relações encontradas sugiram algum mecanismo regulatório entre essas moléculas.

Tabela 3: Correlações entre os níveis séricos de adipocinas, MIF e frequência de IL-8 e TGF- β

| | TGF MIF | TGF freq. | IL8 MIF | IL8 freq. | ADIPOQ | LEP |
|-----------|------------------|------------------|------------------|-----------|-------------------|-----|
| TGF freq. | 0,1320 | - | | | | |
| IL8 MIF | 0,7069*** | -0,2300 | - | | | |
| IL8 freq. | -0,3835 | 0,2633 | 0,1173 | - | | |
| ADIPOQ | 0,3254 | -0,6300** | 0,7975*** | -0,1325 | - | |
| LEP | -0,2039 | 0,5228* | -0,6581** | -0,1459 | -0,8420*** | - |

As correlações entre TGF MIF x IL8 freq., TGF freq. x IL8 freq., IL8 MIF x IL8 freq., IL8 freq. x ADIPOQ e IL8 freq. x LEP foram determinadas utilizando o teste de Spearman. As demais correlações foram determinadas pelo teste de Pearson. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.4 – Metilação de LEP, ADIPOQ, IL8 e TGF β 1

Na análise qualitativa, observou-se um perfil de metilação parcial (100% das amostras) para os genes LEP e ADIPOQ em ambos os grupos (Tabela 4). Em relação ao gene TGF β 1, uma predominância do perfil de metilação total foi observada em ambos os grupos. Considerando o gene IL8, embora um perfil de metilação parcial também tenha sido observado em ambos os grupos, o grupo controle apresentou 16% das amostras não-metiladas, enquanto que o grupo com obesidade não apresentou amostras não-metiladas ($p=0,0549$) (Tabela 4). Em resumo, a análise qualitativa de metilação a partir da técnica de MSP não revelou diferença significativa entre os grupos, considerando todos os genes avaliados.

Na análise semi-quantitativa, houve diferença significativa entre os grupos controle e com obesidade apenas para o promotor de IL8 (Figura 7d), no qual o grupo de indivíduos com obesidade apresentou maior porcentagem de metilação em relação aos indivíduos controles. De forma geral, a estimativa dos níveis de metilação para cada gene foi variável. É possível observar que para TGF- β verificaram-se os menores níveis (em torno de 5%) e que a região enhancer de ADIPOQ apresentou os maiores níveis de metilação (em torno de 70%) nos leucócitos nos grupos avaliados.

Tabela 4: Resultado qualitativo da técnica de MSP para os genes estudados.

| | TGFB1 | | LEP | | ADIPOQ (enhancer) | | IL8 | |
|------------------------------------|---------|-----------|----------|----------|----------------------|----------|---------|----------|
| | C | O | C | O | C | O | C | O |
| M ⁺ (%) | 20 (80) | 15 (65,2) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| U ⁺ (%) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 (16) | 0 |
| M ⁺ /U ⁺ (%) | 5 (20) | 8 (34,8) | 25 (100) | 24 (100) | 23 (100) | 24 (100) | 21 (84) | 25 (100) |
| p* | 0,2045 | | 1,000 | | 1,000 | | 0,0549 | |

C: grupo controle; O: grupo com obesidade; M⁺: metilação total; U⁺: não-metilação total; M⁺/U⁺: metilação parcial; * p-valor calculado pelo teste exato de Fisher.

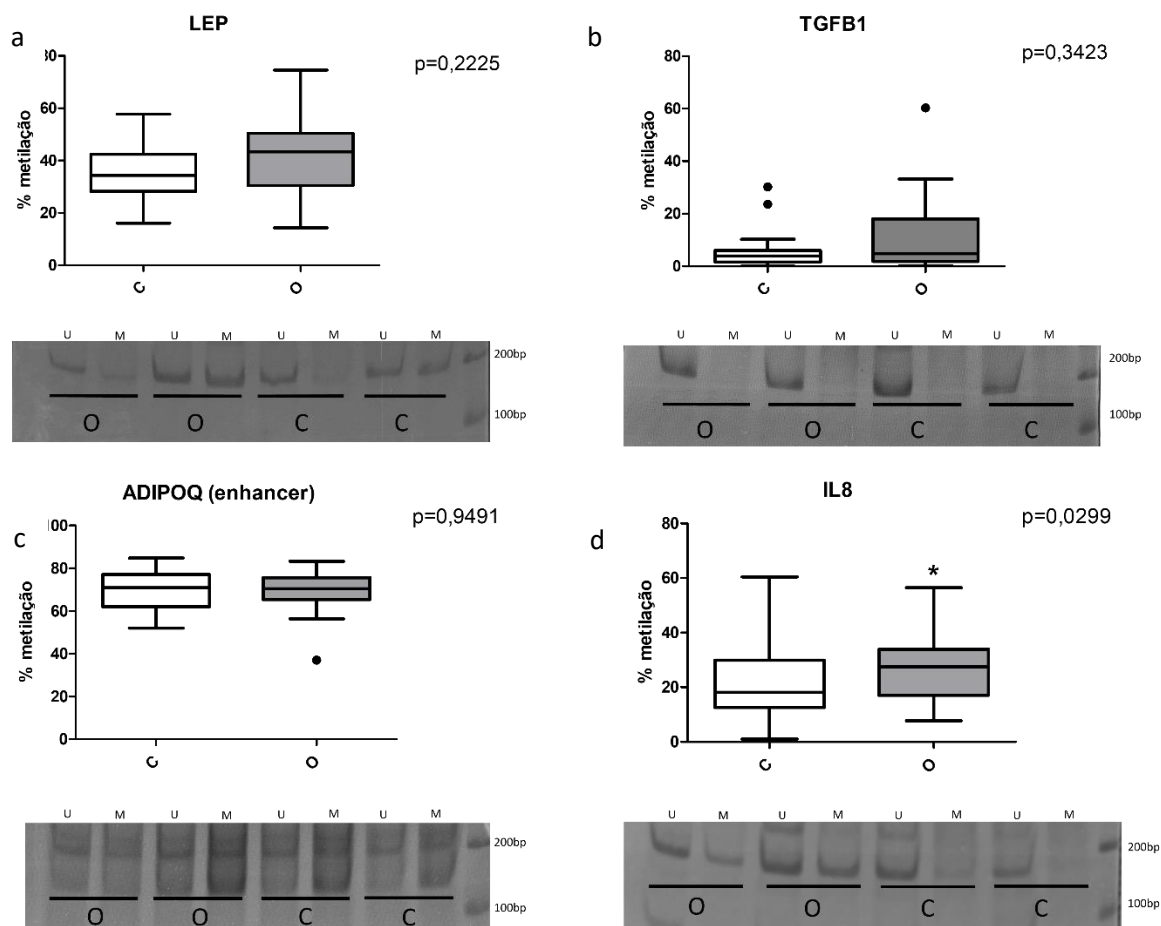


Figura 8: Análise semi-quantitativa da metilação nos genes de citocinas e adipocinas na obesidade infantil. Em (a), (b), (c) e (d) são mostrados os box plots mostrando os resultados de LEP, TGFB1, ADIPOQ região enhancer e IL8, bem como géis representativos das amostras de cada um dos genes. Os gráficos destacam a mediana e o intervalo interquartil. Os outliers (•) foram calculados pelo método de Tukey. O: amostras do grupo com obesidade; C: amostras do grupo controle; *p<0,05.

4.5 – Correlações entre parâmetros clínicos e bioquímicos com a metilação de IL8

Uma vez que houve diferença significativa entre os grupos controle e com obesidade considerando os níveis de metilação de IL-8 (Figura 7d), correlações entre parâmetros clínicos e bioquímicos com a metilação de IL8 foram realizadas. A correlação entre os dados clínicos e a metilação não revelaram qualquer diferença (Tabela 5). A correlação, porém, entre os parâmetros bioquímicos e a metilação de IL8 revelou associações positivas significativas, porém fracas. Tais associações foram observadas entre a metilação desse gene e os níveis séricos da enzima AST e entre a metilação e os níveis de ALT (Tabela 6).

Tabela 5: Correlação entre os parâmetros clínicos e metilação de IL-8.

| | IMC | Peso |
|---------|--------|--------|
| met IL8 | 0,2724 | 0,2204 |

met IL8: metilação no promotor gênico de IL8. O n para essa análise foi de 50 (n=25 do grupo controle e n=25 do grupo com obesidade). As correlações foram determinadas pelo teste de Spearman.

Tabela 6: Correlação entre parâmetros bioquímicos e metilação de IL-8.

| | GJ | CT | LDL | HDL | TRIG | PCR | AST | ALT |
|---------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|----------------|----------------|
| met IL8 | -0,0678 | 0,0144 | 0,0378 | 0,0341 | 0,1224 | 0,1795 | 0,3432* | 0,2807* |

O n para essa análise foi de 50 (n=25 do grupo controle e n=25 do grupo com obesidade). met IL8: metilação no promotor gênico de IL8; GJ: glicemia de jejum; CT: colesterol total; LDL: lipoproteína de baixa densidade; HDL: lipoproteína de alta densidade; TRIG: triglicérides; PCR: proteína C reativa; AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase; *p<0,05. As correlações entre CT x met IL8 e TRIG x met IL8 foram determinadas pelo teste de Pearson. As demais foram determinadas pelo teste de Spearman.

Para confirmar que além do parâmetro de metilação, a expressão de IL-8 também se associa com os níveis das enzimas hepáticas, foi feita a correlação do MIF de IL-8 com os níveis de enzimas hepáticas (Tabela 7). Foi observada correlação negativa e de intensidade moderada entre o MIF de IL-8 e a enzima AST.

Tabela 7: Correlação entre MIF de IL-8 e enzimas hepáticas.

| | AST | ALT |
|----------|-----------------|---------|
| MIF IL-8 | -0,5297* | -0,3093 |

O n para essa análise foi de 20 (n=11 para o grupo controle e n=9 para o grupo com obesidade). AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase; *p<0,05. As correlações foram determinadas pelo teste de Pearson.

5 – DISCUSSÃO

É bem descrito o quadro de inflamação na obesidade, bem como as consequências que surgem desse estado inflamatório persistente. Em adultos e em crianças, a quantidade de evidências é substancial: os níveis de proteínas de fase aguda de inflamação e de citocinas de perfil pró-inflamatório estão elevados, a concentração de citocinas de perfil anti-inflamatório está diminuída, a expressão de receptores da imunidade inata é alterada nos leucócitos e as vias de sinalização caracteristicamente inflamatórias se encontram persistentemente ativadas (CYMERYYS et al., 2012; GILBERT & SINGERLAND, 2013; MATTOS et al., 2016; MEDEIROS et al., 2017; CATRYSSSE & VAN LOO, 2017; CURA-ESQUIVEL et al., 2018).

Considerando os parâmetros clínicos e bioquímicos, é possível observar que os grupos de estudo analisados são bem diferentes entre si. É bem descrito na obesidade infantil e adulta diferenças no perfil clínico e bioquímico. Quanto ao aspecto clínico, as alterações observadas eram esperadas desde a seleção dos pacientes, uma vez que o enquadramento nos grupos foi feito a partir do critério de IMC. A análise dos parâmetros bioquímicos revelou alterações também já esperadas, como a desregulação no perfil lipídico e o aumento dos níveis de proteína C reativa, um importante marcador de processos inflamatórios (KLOP, ELTE, CABEZAS, 2013; ZHAO & LV, 2013; MATTOS et al., 2016; WOLFFENBUTTEL et al., 2017). É importante também ressaltar as alterações observadas no perfil de enzimas hepáticas encontradas no presente trabalho, apesar do aumento dos níveis de tais enzimas não ter sido radical a ponto de ter se elevado acima do valor de referência para ambas, que é de até 56U/L para ALT e 35U/L para AST (GOWDA et al., 2009). Uma das complicações decorrentes da obesidade é o comprometimento da função hepática (WILLIAMS et al., 2011; MILIĆ, LULIĆ, ŠTIMAC, 2014). A inflamação parece ser importante para tal ocorrência no fígado. Sabe-se, por exemplo, que a concentração de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e IL-6, estão relacionadas com o dano hepático (STOJSAVLJEVIĆ et al., 2014). Além dessas, TGF- β parece ter papel importante no agravamento do dano por promover fibrose no tecido (HART et al., 2017). O tecido adiposo também exerce efeito importante, uma vez que a liberação de ácidos graxos, a diminuição dos níveis de adiponectina e aumento dos de leptina, fenômenos comuns na obesidade, estão relacionados com o desenvolvimento de complicações hepáticas (CHITTURI et al., 2002; KAMADA et al., 2007; MILIĆ, LULIĆ, ŠTIMAC, 2014; STOJSAVLJEVIĆ et al., 2014).

No presente trabalho, em relação aos níveis e expressão individuais de cada citocina e adipocina, foram esperadas as alterações encontradas nos níveis de leptina e adiponectina e na expressão de TGF- β . Quanto à leptina, apesar do seu papel anorexígeno e anti-adipogênico, o aumento dos seus níveis séricos é um achado quase universal nos estudos de obesidade em que a causa não é genética (MAFFEI et al., 1995; SILHA et al., 2003; MATTOS et al., 2016). Tem-se aventado que na obesidade ocorre um quadro de resistência à ação da adipocina, dada a contradição entre a sua concentração e a sua ação (RIZWAN et al., 2017). Apesar disso, há evidências de que a obesidade implica em mecanismos que restringem a sinalização mediada por essa adipocina, principalmente no sistema nervoso central. Possíveis fatores são o aumento de proteínas inibidoras da via da adipocina, como *Supressor of cytokine signaling-3* (SOCS3) e de proteínas fosfatase de tirosina que desfosforilam o receptor de leptina; a indução de um estado inflamatório hipotalâmico, que pode levar à diminuição da sinalização; alterações nos próprios neurônios receptores do sinal de leptina, como a ocorrência de estresse no retículo endoplasmático (PAN & MYERS, 2017). Além do papel metabólico, no entanto, leptina tem um papel inflamatório importante: estimula a liberação de TNF- α , IL-6 e IL-12, favorece a produção de óxido nítrico, a fagocitose e a quimiotaxia e inibe a produção de células Treg (LA CLAVA, 2017). É possível, portanto, que leptina seja regulador positivo na inflamação que acompanha o quadro de obesidade. Além disso, alguns trabalhos propõem que a produção de leptina seja induzida por estímulos e por citocinas indutores de inflamação. Landman et al. (2003) reportaram aumento dos níveis séricos da adipocina após dose intravenosa aguda de lipopolissacarídeo em macacos rhesus e em humanos. Faggioni et al. (1998) demonstraram que os níveis de leptina se elevam em roedores na presença de LPS ou turpentina e de IL-1 β . IL-1 β parece ser essencial para essa elevação, pois camundongos nocaute para a citocina não apresentam a mesma resposta frente aos desafios com LPS ou turpentina, enquanto que nocautes para IL-6 não exibem perturbações na resposta. Outra citocina que parece induzir aumento dos níveis de leptina é TNF- α (GRUNFELD et al., 1996). Embora essas citocinas não tenham sido estudadas no presente trabalho, o aumento de TNF- α na obesidade é um fato bem documentado e há indícios de que IL-1 β também tenha seus níveis aumentados, como já foi reportado em monócitos não-clássicos (HOTAMISLIGIL et al., 1995; TZANAVARI, GIANNOGONAS, KARALIS, 2010; KOENEN et al., 2011; BING, 2014; MATTOS et al., 2016). Em vista disso, é possível que haja uma retroalimentação positiva entre os

níveis circulantes de leptina e de citocinas pró-inflamatórias quando os níveis de LPS estão cronicamente elevados, o que pode contribuir para o quadro de inflamação na obesidade.

Adiponectina, por outro lado, é uma adipocina cujos níveis quase sempre estão diminuídos com o aumento do peso corporal e do IMC, e o presente trabalho corrobora com a de literatura nesse sentido (ASAYAMA et al., 2003; BRUNN et al., 2003; MATTOS et al., 2016). Possui característica de regulação da homeostase de carboidratos e lipídeos e função anti-inflamatória importante. Em macrófagos, por exemplo, adiponectina favorece a diferenciação em um perfil M2, enquanto inibe a polarização em M1 (OHASHI et al., 2010; LUO & LIU, 2016). A adipocina parece também aumentar a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e IL-1Ra, e inibir, embora não totalmente, a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IFN- γ e IL-6, mesmo na presença de LPS (WOLF et al., 2004; AJUWON & SPURLOCK, 2005). Por outro lado, a hipóxia e o aumento de TNF- α , eventos comuns na obesidade, podem atuar reduzindo a expressão da adipocina. A *IGF-binding protein-3* (IGFBP3) parece mediar parte desse efeito repressor, uma vez que é superexpressa quando esses eventos acontecem e tem capacidade de interagir com *Retinol X receptor- α* (RXR- α) presente no núcleo, inibindo a sua ligação a *Peroxisome proliferator activated receptor- γ* (PPAR γ) e a consequente transcrição do gene de adiponectina (BESSET et al., 1996; GRIMBERG et al., 2005; ZAPPALÀ & RECHLER, 2009). Ainda considerando TNF- α , outro candidato a regulador negativo da expressão de adiponectina é a proteína cinase C (PKC), a qual é induzida pela citocina pró-inflamatória e regula negativamente a expressão de vários fatores que promovem a transcrição da adipocina (ZHANG et al., 1996; SEWTER et al., 2002; LIM, KIM, PARK, 2008). A regulação negativa exercida por outras citocinas pró-inflamatórias e pelo estresse oxidativo também parecem ser importantes na obesidade (SHEHZAD et al., 2012). Outro mecanismo reportado na literatura que pode modular negativamente a expressão de adiponectina é a ocorrência de polimorfismos genéticos (NIGRO et al., 2014).

Outra citocina cujos resultados no presente trabalho concordam com o que foi reportado na literatura é TGF- β . Apuramos que há aumento da frequência de células produtoras do fator em crianças com obesidade. Vários trabalhos mostram elevação dos níveis desse fator em humanos e animais com o aumento de peso (ALESSI et al., 2000; YADAV et al., 2011; MATTOS et al., 2016). Além disso, há relatos mostrando que o

bloqueio da sinalização mediada por TGF- β leva à melhora nos parâmetros associados à obesidade. A supressão de Smad-3, juntamente com Smad 2 e 4 responsáveis pela transdução de sinal na via do fator, ou o bloqueio da própria citocina em animais tratados com dieta hiperlipídica provoca melhora na dislipidemia e na sensibilidade à insulina, resistência à ocorrência de esteatose hepática, modificação nos perfis celulares de macrófagos residentes e na expressão gênica do tecido adiposo (YADAV et al., 2011). A superexpressão de um inibidor natural de TGF- β , *Kielin/chordin-like protein* (KCP), que interage diretamente com a citocina, leva a efeitos semelhantes em animais alimentados com dieta hiperlipídica (SOOFI et al., 2017). Um fenômeno que pode ser responsável, pelo menos em parte, por essas alterações deletérias é a regulação exercida pelo fator na estrutura da matriz extracelular no tecido adiposo. Em pacientes com câncer, por exemplo, a caquexia leva a aumento dos níveis de TGF- β , da sinalização por Smad 2/3 e da deposição de colágeno no tecido adiposo (ALVES et al., 2017). Além disso, a menor expressão de *Microfibrils associated glycoprotein-1* (MAGP1), molécula existente na matriz do tecido e que promove o sequestro de TGF- β , está associada à obesidade em humanos e em animais (CRAFT et al., 2014). Essas alterações no tecido adiposo podem assumir contornos dramáticos, uma vez que o aumento na deposição de colágeno e consequente maior rigidez da matriz se correlacionam com a redução da capacidade de expansão dos adipócitos e na piora da sensibilidade à ação da insulina.

A maior frequência de células expressando o fator nos leucócitos de crianças com obesidade pode encontrar explicação na possível regulação exercida por outras citocinas. TNF- α , por exemplo, pode ser um fator regulador da expressão de TGF- β . Samad et al (1997) mostraram que a expressão de TGF no tecido adiposo aumenta com a injeção intraperitoneal de TNF. Por análise imunohistoquímica, o mesmo trabalho revelou que a expressão do fator se dá tanto nos adipócitos, quanto na fração vascular, a qual compreende vários tipos de células do sistema imune. Em fibroblastos, pelo menos, a ativação da transcrição do fator mediada por TNF se dá pela ativação da via de MAPK e pelo fator de transcrição *Activatin Protein-1* (AP-1) (SULLIVAN et al., 2005; SULLIVAN et al., 2009). *In vitro*, pelo menos, LPS também é um indutor da produção de TGF- β . Monócitos, por exemplo, aumentam a sua produção do fator frente ao estímulo pela toxina, o que sugere a importância de vias inflamatórias na sua produção (GROTENDORST, SMALE, PENCEV, 1989). Em células 3T3-L1, a regulação exercida por LPS na produção do fator se dá a nível transcricional a partir da via de MAPK (XIAO

et al., 2008) A regulação da expressão de TGF- β , além do nível transcricional, pode se dar a nível traducional e pós-traducional por diversos fatores e em razão de diversos estímulos (XIAO et al., 2008). No entanto, quais desses mecanismos são relevantes na obesidade ainda é uma incógnita.

Em contraste com os resultados reportados até agora, a menor expressão de IL-8 no grupo de crianças com obesidade foi uma surpresa no presente estudo. Diversos trabalhos notam que os níveis séricos determinados por ensaios imunoenzimáticos dessa citocina estão aumentados em indivíduos com obesidade (STRACZKOWSKI et al., 2002; KIM et al., 2006). Considerando crianças, especificamente, Tam et al. (2010-2) não encontraram alterações nos níveis plasmáticos de IL-8 em indivíduos com 8 anos de idade, mas encontraram diferença significativa em adolescentes de 15 anos de idade, com elevação no grupo com obesidade em relação ao grupo eutrófico. Já Medeiros et al. (2017) encontraram por citometria de fluxo menor frequência de neutrófilos expressando a citocina no sangue periférico de crianças com obesidade. Como essa população representa cerca de 70% das células circulantes, é possível que o achado no presente trabalho tenha sido influenciado pela expressão em neutrófilos. A menor expressão da quimiocina no sangue periférico de crianças com obesidade talvez seja relacionada a uma tentativa de regulação do quadro inflamatório. Por outro lado, é provável que a menor expressão de IL-8 nos leucócitos não se correlacione com a dinâmica existente no tecido adiposo. É notória a propriedade dessa citocina em recrutar neutrófilos para o foco inflamatório, o qual na obesidade é, principalmente, o tecido adiposo (REILLY & SALTIEL, 2017). É possível, portanto, que a expressão realmente importante dessa citocina se dê nesse tecido, embora as células da fração vascular, muitas das quais derivadas do sangue periférico, sejam a provável fonte do fator (FAIN et al., 2006).

Quanto às correlações encontradas entre as citocinas e adipocinas e em vista do que foi exposto neste trabalho, é possível perceber que as alterações nos níveis das mesmas se encontram refletidos nas correlações encontradas, exceto para o caso de MIF de IL-8 e MIF de TGF- β . Dessa forma, assumindo que a redução na expressão de IL-8 possa ter um papel regulatório na obesidade infantil, é coerente que haja correlação positiva com os níveis séricos de adiponectina e negativa com os níveis de leptina. Por outro lado, se TGF- β é um fator que se relaciona com o desenvolvimento de obesidade, também há sentido na correlação negativa com adiponectina e correlação positiva com leptina. Além disso, a correlação negativa entre as dosagens séricas de leptina e

adiponectina também foi esperada e concorda com os dados sobre o tema na literatura (YADAV et al., 2011; DIWAN et al., 2018). Em relação à associação estatisticamente significativa encontrada entre MIF de IL-8 e MIF de TGF- β , há trabalhos mostrando a indução de IL-8 por TGF- β (LU & DONG, 2006; QI et al., 2006). Lu & Dong (2006) mostraram que TGF- β é capaz de regular positivamente a expressão de IL-8 a nível transcricional em células de câncer de próstata e que tal regulação é dose-dependente. O mecanismo para esse fenômeno parece ser, pelo menos em células de tumor de mama, devido ao acionamento dos receptores T β RI e T β RII por TGF- β e das vias de Smad e de MAPK, as quais controlam a expressão gênica do fator (GUPTA et al., 2011). Como os receptores para o fator devem reconhecer a sua molécula presente no meio para serem ativados, isso implica que os níveis séricos do mesmo devem guiar a expressão de IL-8. Embora o presente trabalho tenha analisado MIF e frequência das citocinas, não foi feita a mensuração dos seus níveis séricos. É possível que, apesar do MIF de TGF- β não ter diferido entre os grupos e a frequência de células positivas para o fator ser maior no grupo com obesidade, a concentração do fator seja maior no grupo controle. Outra possibilidade é a interferência de alguma variável presente na obesidade na via de TGF- β e consequentemente na produção de IL-8.

Em relação aos dados de metilação do DNA, o dado qualitativo revelou que 16% das amostras apresentaram DNA totalmente não-metilado para o gene IL8 no grupo controle e que nenhuma no grupo com obesidade apresentou tal resultado. O dado semi-quantitativo, por sua vez, revelou que o promotor de IL8 se encontra mais metilado no grupo com obesidade. Esse dado está de acordo com o dado da expressão da quimiocina fornecido pela citometria de fluxo, uma vez que a metilação de DNA no promotor gênico é, no geral, uma marca repressiva da transcrição (LI & ZHANG, 2014). Até onde chega o nosso conhecimento, esse resultado é inédito na literatura sobre obesidade. No diabetes do tipo 2, porém, Ribel-Madsen et al. (2012) encontraram no músculo esquelético de gêmeos discordantes para a doença maior metilação no gene da quimiocina no CpG +190 por meio de uma análise *genome-wide* de metilação. Como nesse estudo não foi avaliada a expressão, não é possível precisar se nesse ponto a metilação é decisiva para variações nos níveis da quimiocina. No presente estudo, os CpGs analisados (-167, -157 e -7) no promotor de IL8 se localizam dentro (-7) ou próximos (-167 e -157) à região do promotor proximal do gene (-136 e +43). Nessa região, particularmente, estão localizados sítios de ligação para vários fatores: NF- κ B (-82 a -70), NF-IL-6 (-94 a -81), C/EBP (-94 a -84),

API (-126 a -120) e Oct1 (-90 a -83) (ROEBUCK, 1999; DE LARCO et al., 2003). Embora nenhum dos CpGs estudados se localizem no sítio de ligação de qualquer desses fatores de transcrição, o fato de haver maior frequência de metilação em tais CpGs pode ser indicativo da estrutura da cromatina mais compactada nessa região. Nesse sentido, é possível que a cromatina esteja menos acessível à ligação dos fatores de transcrição pela presença de marcas repressoras, uma delas a metilação de DNA.

Com relação à metilação nos promotores de LEP, TGFB1 e na região enhancer de ADIPOQ, não foi observada qualquer diferença significativa entre os grupos, apesar de ter havido diferença nos níveis séricos e na expressão. Isso pode ter sido causado por diversos fatores. Primeiramente, a diferença de expressão pode ser devida à regulação por outros mecanismos que não a metilação de DNA, como a regulação da disponibilidade de fatores de transcrição, regulação traducional ou pós-traducional (XIAO et al., 2008; SHEHZAD et al., 2012; BELARBI et al., 2015). Outra hipótese é que possa haver variação de metilação entre os grupos, mas que tal diferença, por ser pequena, não tenha sido detectada. Nesse caso, pode-se especular que a técnica de MSP não tenha sensibilidade suficiente para detectar diferenças sutis em uma população heterogênea de sequências. De fato, em se tratando de DNA proveniente do sangue total, é de se esperar que o perfil de metilação seja heterogêneo, uma vez que os leucócitos são fenotípica e epigeneticamente diferentes entre si (ECKER et al., 2017). Além disso, pela técnica de MSP é possível avaliar poucos CpGs, usualmente nos promotores gênicos, pois são os sítios em que ocorrem maior densidade de CpGs e pela relação com a expressão gênica. Essa abordagem, no entanto, restringe o poder de detecção de CpGs diferencialmente metilados. Diversos estudos de característica *genome-wide* – em que uma grande quantidade de CpGs no genoma é avaliada quanto ao status de metilação –, incluindo alguns na obesidade infantil, tem revelado, por vezes, a ocorrência de diferenças na metilação em regiões que não os promotores gênicos, como as regiões intragênica e intergênica (DING et al., 2015; HUANG et al., 2015; FRADIN et al., 2017). A significância, porém, dessas ocorrências para o perfil de expressão gênica não é tão bem explorada, uma vez que a maioria desses trabalhos investiga apenas a associação entre a metilação e o fenótipo dos indivíduos.

Considerando a metilação de LEP e da região enhancer de ADIPOQ, deve-se observar ainda que são genes cuja expressão é majoritária no tecido adiposo, mais especificamente nos adipócitos (SCHERER et al., 1995; ZHOU & RUI, 2013). Nesse sentido, era, de alguma forma, esperado que houvesse maiores níveis de metilação pela

análise quantitativa e que pudesse não haver diferença entre os grupos, uma vez que o perfil de metilação pode ser tecido-específico. Houde et al. (2014), comparando o status de metilação de CpGs no promotor de LEP e ADIPOQ em pacientes com obesidade grau III no sangue, tecido adiposo subcutâneo e visceral mostraram algum grau concordância entre os níveis de metilação entre os tecidos. Apesar disso, os níveis de metilação foram significativamente maiores no sangue para os CpGs dos dois genes e mais relações significativas emergiram entre o tecido adiposo subcutâneo e visceral do que entre o tecido subcutâneo e sangue e o tecido visceral e sangue. No entanto, em detrimento dessas considerações, alguns trabalhos encontraram associações entre a metilação desses genes no sangue e parâmetros relacionados à obesidade infantil (GARCÍA-CARDONA et al., 2014; ALLARD et al., 2015; KADAKIA et al., 2016; OTT et al., 2018).

Por fim, foi encontrado no presente estudo associação entre a metilação do promotor gênico de IL8, bem como da expressão da quimiocina, e os níveis séricos das enzimas hepáticas AST e ALT. Enquanto que houve correlação positiva entre AST/ALT e a metilação em IL8, a correlação entre os níveis da quimiocina e AST foi negativa. Conforme mencionado, a metilação se relaciona inversamente com a expressão gênica. Portanto, é esperado que a correlação entre um determinado parâmetro e a metilação do gene seja inversa à correlação entre esse mesmo parâmetro e a expressão desse gene. A literatura sobre a ocorrência de dano hepático, porém, aponta que os níveis de IL-8, seja no sangue ou no tecido, estão aumentados em condições que afetam o funcionamento hepático (HUANG et al., 1996; ZIMMERMAN et al., 2011; LANGHANS et al., 2013; AKBEROVA, KIASOV, ABDULGANIEVA, 2017; JARRAR et al., 2018). No entanto, deve-se considerar que esses estudos foram feitos em condições mais graves e com perfis inflamatórios muito mais acentuados que a inflamação de baixo grau que ocorre na obesidade infantil. Dessa forma, pode ser possível que haja algum mecanismo inflamatório na obesidade que promova uma leve desregulação na função hepática, mas sem envolver IL-8. De forma alternativa, IL-8 pode atuar de maneira dicotômica, atenuando o quadro inflamatório num primeiro, como sugerido anteriormente, mas contribuindo com a evolução da doença hepática posteriormente. Há a possibilidade também de não haver nenhum mecanismo em que uma afete a outra e que a correlação entre tais ocorrências tenha surgido justamente pelo fato de terem o seu aparecimento associado à obesidade. É necessário ter atenção, no entanto, à fonte produtora da quimiocina: enquanto que no presente trabalho foi avaliada a expressão em leucócitos circulantes, a produção relevante desse fator para as doenças hepáticas possa talvez se dar

no fígado. Thornton et al. (1990) mostraram que hepatócitos expressam IL-8 em resposta a estímulos inflamatórios, como IL-1 β e TNF- α . French et al. (2017) observaram por análise de imunofluorescência que os hepatócitos são fonte importante da quimiocina e que os neutrófilos, população celular que expressa CXCR1 e CXCR2, se localizam em torno da fonte produtora. Células Treg residentes no fígado também parecem contribuir com a produção da quimiocina. Além disso, a frequência de células Treg hepáticas produtoras de IL-8 está positivamente correlacionada com o escore de fibrose (LANGHANS et al., 2013).

Em resumo, mostramos por meio desse trabalho que as alterações no perfil lipídico, de enzimas hepáticas e na expressão de citocinas e adipocinas na obesidade infantil concordam, de forma geral, entre si, como mostrado pela análise de correlação, e com as já mencionadas na literatura. Além disso, mostramos que o perfil de metilação no promotor de IL8 está alterado e que este dado está de acordo com os níveis da citocina em leucócitos, como determinado por citometria de fluxo. A metilação desse gene e a expressão da citocina estão correlacionadas com a concentração de enzimas hepáticas, embora o mecanismo por trás dessa associação seja obscuro. Ainda não é bem explorada a relação dos mecanismos epigenéticos com a inflamação na obesidade. Nesse sentido, o presente trabalho foi uma contribuição para alargar os horizontes nessa direção. Embora alguns estudos com perfil *genome-wide* tenham mostrado que existe essa relação, é preciso ainda desvendar os mecanismos envolvidos e se a modulação de componentes ambientais, como dieta e prática de exercício físico, são capazes de promover alguma regulação.

6 - CONCLUSÕES

No presente trabalho mostramos alterações no perfil lipídico, de enzimas hepáticas, na expressão de citocinas e nos níveis séricos de adipocinas na obesidade infantil e correlações entre esses parâmetros. Para IL-8, encontramos menor expressão em leucócitos de crianças com obesidade e maior metilação no mesmo grupo, além de correlação com os níveis de enzimas hepáticas. Em vista disso, é possível que haja mecanismos regulatórios associados à menor expressão de IL-8 em crianças com obesidade, numa tentativa talvez de controlar o quadro inflamatório.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARCA-GÓMEZ, Leandra et al. Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128· 9 million children, adolescents, and adults. **The Lancet**, v. 390, n. 10113, p. 2627-2642, 2017.

ABDELAAL, M.; LE ROUX, C. W.; DOCHERTY, N. G. Morbidity and mortality associated with obesity. **Annals of translational medicine**, v. 5, n. 7, p. 1-12, 2017.

ABERNATHY, R. P.; BLACK, D. R. Is adipose tissue oversold as a health risk?. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 94, n. 6, p. 641-644, 1994.

ACHARI, Arunkumar; JAIN, Sushil. Adiponectin, a therapeutic target for obesity, diabetes, and endothelial dysfunction. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 6, p. 1321, 2017.

ÁCS, Orsolya et al. Methylation Status of CYP27B1 and IGF2 Correlate to BMI SDS in Children with Obesity. **Obesity facts**, v. 10, n. 4, p. 353-362, 2017.

AJONIJEBU, Duyilemi C. et al. Epigenetics: a link between addiction and social environment. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 74, n. 15, p. 2735-2747, 2017.

AJUWON, Kolapo M.; SPURLOCK, Michael E. Adiponectin inhibits LPS-induced NF- κ B activation and IL-6 production and increases PPAR γ 2 expression in adipocytes. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 288, n. 5, p. R1220-R1225, 2005.

AKBEROVA, Dilyara; KIASOV, Andrei P.; ABDULGANIEVA, Diana. Serum Cytokine Levels and Their Relation to Clinical Features in Patients with Autoimmune Liver Diseases. **Journal of immunology research**, v. 2017, 2017.

ALESSI, Marie-Christine et al. Plasminogen activator inhibitor 1, transforming growth factor-beta1, and BMI are closely associated in human adipose tissue during morbid obesity. **Diabetes**, v. 49, n. 8, p. 1374-1380, 2000.

ALFARADHI, Maria Z. et al. Maternal obesity in pregnancy developmentally programs adipose tissue inflammation in young, lean male mice offspring. **Endocrinology**, v. 157, n. 11, p. 4246-4256, 2016.

ALI, Omar et al. Methylation of SOCS3 is inversely associated with metabolic syndrome in an epigenome-wide association study of obesity. **Epigenetics**, v. 11, n. 9, p. 699-707, 2016.

ALLARD, C. et al. Mendelian randomization supports causality between maternal hyperglycemia and epigenetic regulation of leptin gene in newborns. **Epigenetics**, v. 10, n. 4, p. 342-351, 2015.

ALLEGRUCCI, Cinzia et al. Epigenetic reprogramming of breast cancer cells with oocyte extracts. **Molecular cancer**, v. 10, n. 1, p. 1, 2011.

ALMÉN, Markus Sällman et al. Genome wide analysis reveals association of a FTO gene variant with epigenetic changes. **Genomics**, v. 99, n. 3, p. 132-137, 2012.

ALVES, Michele Joana et al. Adipose tissue fibrosis in human cancer cachexia: the role of TGF β pathway. **BMC cancer**, v. 17, n. 1, p. 190, 2017.

AMBROSI, Christina; MANZO, Massimiliano; BAUBEC, Tuncay. Dynamics and context-dependent roles of DNA methylation. **Journal of molecular biology**, v. 429, n. 10, p. 1459-1475, 2017.

ANDIA, Denise C. et al. DNA methylation status of the IL8 gene promoter in aggressive periodontitis. **Journal of periodontology**, v. 81, n. 9, p. 1336-1341, 2010.

ASAYAMA, Kohtaro et al. Decrease in serum adiponectin level due to obesity and visceral fat accumulation in children. **Obesity research**, v. 11, n. 9, p. 1072-1079, 2003.

AYYAZ, Arshad; ATTISANO, Liliana; WRANA, Jeffrey L. Recent advances in understanding contextual TGF β signaling. **F1000Research**, v. 6, 2017.

BALSAN, Guilherme Ardenghi et al. Relationship between adiponectin, obesity and insulin resistance. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 61, n. 1, p. 72-80, 2015.

BANJADE, Bijendra; NAIK, Vijaya A.; NARASANNAVAR, Ashwini. Comparison of CDC, WHO and IOTF growth references in relation to overweight and obesity in college adolescents of North Karnataka, India. **Al Ameen Journal of Medical Sciences** 2015; 08: 72, v. 76, 2015.

BECKER, Maike; LEVINGS, Megan K.; DANIEL, Carolin. Adipose-tissue regulatory T cells: Critical players in adipose-immune crosstalk. **European journal of immunology**, v. 47, n. 11, p. 1867-1874, 2017.

BELARBI, Yasmina et al. MicroRNA-193b controls adiponectin production in human white adipose tissue. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 100, n. 8, p. E1084-E1088, 2015.

BENETATOS, Leonidas; VARTHOLOMATOS, Georgios. On the potential role of DNMT1 in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes: not another mutated epigenetic driver. **Annals of hematology**, v. 95, n. 10, p. 1571-1582, 2016.

BERISHA, Stela Z. et al. Changes in whole blood gene expression in obese subjects with type 2 diabetes following bariatric surgery: a pilot study. **PloS one**, v. 6, n. 3, p. e16729, 2011.

BESSET, Valerie et al. Tumor necrosis factor alpha stimulates insulin-like growth factor binding protein 3 expression in cultured porcine Sertoli cells. **Endocrinology**, v. 137, n. 1, p. 296-303, 1996.

BING, Chen. Is interleukin-1 β a culprit in macrophage-adipocyte crosstalk in obesity?. **Adipocyte**, v. 4, n. 2, p. 149-152, 2015.

BITTNER, Vera et al. The TG/HDL cholesterol ratio predicts all cause mortality in women with suspected myocardial ischemia a report from the Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE). **American heart journal**, v. 157, n. 3, p. 548, 2009.

BLÜHER, Matthias. Adipose tissue inflammation: a cause or consequence of obesity-related insulin resistance?. **Clinical science**, v. 130, n. 18, p. 1603-1614, 2016.

BLÜHER, Matthias; MANTZOROS, Christos S. From leptin to other adipokines in health and disease: facts and expectations at the beginning of the 21st century. **Metabolism**, v. 64, n. 1, p. 131-145, 2015.

BOCHTLER, Matthias; KOLANO, Agnieszka; XU, Guo-Liang. DNA demethylation pathways: additional players and regulators. **Bioessays**, v. 39, n. 1, p. 1-13, 2017.

BOMBERG, E. et al. The financial costs, behaviour and psychology of obesity: a one health analysis. **Journal of comparative pathology**, v. 156, n. 4, p. 310-325, 2017.

BOMFIM, Natália S. et al. Obesidade Infantil: principais causas e a importância da intervenção nutricional. **Catassuba – Revista Científica da Escola da Saúde**, Ano 5, nº 1, p. 31-44, out.2015/jan.2016.

BRAKENSIEK, Kai et al. Absence of p21CIP1, p27KIP1 and p57KIP2 methylation in MDS and AML. **Leukemia research**, v. 29, n. 11, p. 1357-1360, 2005.

BRUUN, Jens M. et al. Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 285, n. 3, p. E527-E533, 2003.

BUSH, Haley; GOLABI, Pegah; YOUNOSSI, Zobair M. Pediatric non-alcoholic fatty liver disease. **Children**, v. 4, n. 6, p. 48, 2017.

CATRY SSE, Leen; VAN LOO, Geert. Adipose tissue macrophages and their polarization in health and obesity. **Cellular immunology**, 2018.

CHANG, Albert S. et al. Transforming growth factor β 1 and diabetic nephropathy. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, 2016.

CHEN, Zhaoyi et al. Reprogramming progeria fibroblasts re-establishes a normal epigenetic landscape. **Aging cell**, v. 16, n. 4, p. 870-887, 2017.

CHENG, Shi-Bin; SHARMA, Surendra. Interleukin-10: a pleiotropic regulator in pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 73, n. 6, p. 487-500, 2015.

CHITTURI, Shivakumar et al. Serum leptin in NASH correlates with hepatic steatosis but not fibrosis: a manifestation of lipotoxicity?. **Hepatology**, v. 36, n. 2, p. 403-409, 2002.

CHNG, Melissa Hui Yen et al. Adaptive immunity and antigen-specific activation in obesity-associated insulin resistance. **Mediators of inflammation**, v. 2015, 2015.

CHOUDHURI, Supratim. From Waddington's epigenetic landscape to small noncoding RNA: some important milestones in the history of epigenetics research. **Toxicology mechanisms and methods**, v. 21, n. 4, p. 252-274, 2011.

CINTI, Saverio et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. **Journal of lipid research**, v. 46, n. 11, p. 2347-2355, 2005.

CONTRERAS-ZENTELLA, Martha Lucinda; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, Rolando. Is liver enzyme release really associated with cell necrosis induced by oxidant stress?. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

CRAFT, Clarissa S. et al. The extracellular matrix protein MAGP1 supports thermogenesis and protects against obesity and diabetes through regulation of TGF β . **Diabetes**, p. DB_131604, 2014.

CREWE, Clair; AN, Yu Aaron; SCHERER, Philipp E. The ominous triad of adipose tissue dysfunction: inflammation, fibrosis, and impaired angiogenesis. **The Journal of clinical investigation**, v. 127, n. 1, p. 74-82, 2017.

CURA-ESQUIVEL, Idalia et al. Acute phase markers in obese children and adolescents with metabolic disorders. **Archivos argentinos de pediatría**, v. 116, n. 4, p. 275-282, 2018.

CYMERYYS, Maciej et al. Influence of hypertension, obesity and nicotine abuse on quantitative and qualitative changes in acute-phase proteins in patients with essential hypertension. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, v. 18, n. 5, p. CR330, 2012.

DA SILVA, Simone Vargas et al. Obesity modifies bone marrow microenvironment and directs bone marrow mesenchymal cells to adipogenesis. **Obesity**, v. 24, n. 12, p. 2522-2532, 2016.

DAVÉ, Veronica et al. Relationship between expression and methylation of obesity-related genes in children. **Mutagenesis**, v. 30, n. 3, p. 411-420, 2015.

DAVID, Justin M. et al. The IL-8/IL-8R axis: a double agent in tumor immune resistance. **Vaccines**, v. 4, n. 3, p. 22, 2016.

DE LARCO, Joseph E. et al. Atypical methylation of the interleukin-8 gene correlates strongly with the metastatic potential of breast carcinoma cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 24, p. 13988-13993, 2003.

DE LORENZO, Antonino et al. New obesity classification criteria as a tool for bariatric surgery indication. **World journal of gastroenterology**, v. 22, n. 2, p. 681, 2016.

DELLA CORTE, Claudia; MAZZOTTA, Anna Rita; NOBILI, Valerio. Fatty liver disease and obesity in youth. **Current Opinion in Endocrinology & Diabetes and Obesity**, v. 23, n. 1, p. 66-71, 2016.

DENZEL, Martin S. et al. T-cadherin is critical for adiponectin-mediated cardioprotection in mice. **The Journal of clinical investigation**, v. 120, n. 12, p. 4342-4352, 2010.

DICK, Katherine J. et al. DNA methylation and body-mass index: a genome-wide analysis. **The Lancet**, v. 383, n. 9933, p. 1990-1998, 2014.

DING, Xu et al. Genome-wide screen of DNA methylation identifies novel markers in childhood obesity. **Gene**, v. 566, n. 1, p. 74-83, 2015.

DIXON, John B.; O'BRIEN, Paul E. Obesity and the white blood cell count: changes with sustained weight loss. **Obesity surgery**, v. 16, n. 3, p. 251-257, 2006.

DIWAN, Arundhati G. et al. Correlation of serum adiponectin and leptin levels in obesity and Type 2 diabetes mellitus. **Indian journal of endocrinology and metabolism**, v. 22, n. 1, p. 93, 2018.

DONG, Rui; ZHENG, Shan. Interleukin-8: A critical chemokine in biliary atresia. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 30, n. 6, p. 970-976, 2015.

DUNN, J.; RAO, S. Epigenetics and immunotherapy: The current state of play. **Molecular Immunology**, v. 87, p. 227-239, 2017.

DUNSTAN, Jocelyn et al. Associations of LEP, CRH, ICAM-1, and LINE-1 methylation, measured in saliva, with waist circumference, body mass index, and percent body fat in mid-childhood. **Clinical epigenetics**, v. 9, n. 1, p. 29, 2017.

DUPONT, Joëlle et al. Adipokines in human reproduction. **Hormone molecular biology and clinical investigation**, v. 24, n. 1, p. 11-24, 2015.

ECKER, Simone et al. Genome-wide analysis of differential transcriptional and epigenetic variability across human immune cell types. **Genome biology**, v. 18, n. 1, p. 18, 2017.

EDWARDS, John R. et al. DNA methylation and DNA methyltransferases. **Epigenetics & chromatin**, v. 10, n. 1, p. 23, 2017.

ELGAZAR-CARMON, Vered et al. Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding. **Journal of lipid research**, v. 49, n. 9, p. 1894-1903, 2008.

ERIKSSON, Anders et al. Implication of coronin 7 in body weight regulation in humans, mice and flies. **BMC neuroscience**, v. 16, n. 1, p. 13, 2015.

FAGGIONI, Raffaella et al. IL-1 β mediates leptin induction during inflammation. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 274, n. 1, p. R204-R208, 1998.

FAIN, John N. et al. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. **Endocrinology**, v. 145, n. 5, p. 2273-2282, 2004.

FAIN, John N.; TICHANSKY, David S.; MADAN, Atul K. Transforming growth factor β 1 release by human adipose tissue is enhanced in obesity. **Metabolism**, v. 54, n. 11, p. 1546-1551, 2005.

FAIN, J. N. Release of interleukins and other inflammatory cytokines by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily due to the nonfat cells. **Vitamins & Hormones**, v. 74, p. 443-477, 2006.

FERNÁNDEZ-RIEJOS, Patricia et al. Role of leptin in the activation of immune cells. **Mediators of inflammation**, v. 2010, 2010.

FISCH, Irwin R.; FREEDMAN, Shanna H. Smoking, oral contraceptives, and obesity: effects on white blood cell count. **Jama**, v. 234, n. 5, p. 500-506, 1975.

FLIER, Jeffrey S.; MARATOS-FLIER, Eleftheria. Leptin's physiologic role: does the emperor of energy balance have no clothes?. **Cell Metabolism**, v. 26, n. 1, p. 24-26, 2017.

FRADIN, Delphine et al. Genome-wide methylation analysis identifies specific epigenetic marks in severely obese children. **Scientific reports**, v. 7, p. 46311, 2017.

FRAGA, Mario F. et al. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 30, p. 10604-10609, 2005.

FRENCH, S. W. et al. The role of the IL-8 signaling pathway in the infiltration of granulocytes into the livers of patients with alcoholic hepatitis. **Experimental and molecular pathology**, v. 103, n. 2, p. 137-140, 2017.

FRIEDEWALD, William T.; LEVY, Robert I.; FREDRICKSON, Donald S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clinical chemistry**, v. 18, n. 6, p. 499-502, 1972.

FRYER, Anthony A. et al. Quantitative, high-resolution epigenetic profiling of CpG loci identifies associations with cord blood plasma homocysteine and birth weight in humans. **Epigenetics**, v. 6, n. 1, p. 86-94, 2011.

GALES, D.; CLARK, C.; MANNE, U.; SAMUEL, T. The chemokine CXCL8 in carcinogenesis and drug response. **ISRN oncology**, v. 2013, p. 1-8, 2013.

GARCÍA-CARDONA, Md C. et al. DNA methylation of leptin and adiponectin promoters in children is reduced by the combined presence of obesity and insulin resistance. **International journal of obesity**, v. 38, n. 11, p. 1457, 2014.

GARVER, William S. et al. The genetics of childhood obesity and interaction with dietary macronutrients. **Genes & nutrition**, v. 8, n. 3, p. 271, 2013.

GHOSHAL, Kakali; BHATTACHARYYA, Maitree. Adiponectin: Probe of the molecular paradigm associating diabetes and obesity. **World journal of diabetes**, v. 6, n. 1, p. 151, 2015.

GILBERT, Candace A.; SLINGERLAND, Joyce M. Cytokines, obesity, and cancer: new insights on mechanisms linking obesity to cancer risk and progression. **Annual review of medicine**, v. 64, p. 45-57, 2013.

GODFREY, Keith M. et al. Epigenetic gene promoter methylation at birth is associated with child's later adiposity. **Diabetes**, v. 60, n. 5, p. 1528-1534, 2011.

GOLDENBERG, D.; HARDEN, S.; MASAYESVA, B. G.; HA, P.; BENOIT, N.; WESTRA, W.; KOCH, W. M.; SIDRANSKY.; CALIFANO, J. A. Intraoperative molecular margin analysis in head and neck cancer. **Archives of otolaryngology-head & neck surgery**, v. 130, n. 1, p. 39-44, 2004.

GONZÁLEZ-MUNIESA, P.; MÁRTINEZ-GONZÁLEZ, M.; HU, F. B.; DESPRÉS, J. C.; MATSUZAWA, Y.; LOOS, R. J. F.; MORENO, L. A.; BRAY, G. A.; MARTINEZ, J. A. Obesity. **Nature Reviews Disease Primers**. v. 3, p. 1-18, 2017.

GOTOH, K.; INOUE, M.; MASAKI, T.; CHIBA, S.; SHIMASAKI, T.; ANDO, H.; FUJIWARA, K.; KATSURAGI.; KAKUMA, T.; SEIKE, M.; SAKATA, T.; YOSHIMATSU, H. A novel anti-inflammatory role for spleen-derived interleukin-10 in obesity-induced hypothalamic inflammation. **Journal of neurochemistry**, v. 120, n. 5, p. 752-764, 2012.

GOWDA, Shivaraj et al. A review on laboratory liver function tests. **The Pan african medical journal**, v. 3, 2009.

GOYAL, Tanu et al. Current concepts of the role of oxidized LDL receptors in atherosclerosis. **Current atherosclerosis reports**, v. 14, n. 2, p. 150-159, 2012.

GRANDL, Gerald; WOLFRUM, Christian. Hemostasis, endothelial stress, inflammation, and the metabolic syndrome. In: **Seminars in immunopathology**. Springer Berlin Heidelberg, 2018. p. 215-224.

GRIFFITH, Jason W.; SOKOL, Caroline L.; LUSTER, Andrew D. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. **Annual review of immunology**, v. 32, p. 659-702, 2014.

GRIMBERG, Adda et al. p53-Dependent and p53-independent induction of insulin-like growth factor binding protein-3 by deoxyribonucleic acid damage and hypoxia. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 90, n. 6, p. 3568-3574, 2005.

GROTENDORST, Gary R.; SMALE, Georgeann; PENCEV, Dobromir. Production of transforming growth factor beta by human peripheral blood monocytes and neutrophils. **Journal of cellular physiology**, v. 140, n. 2, p. 396-402, 1989.

GRUNFELD, Carl et al. Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the ob gene product, in hamsters. **The Journal of clinical investigation**, v. 97, n. 9, p. 2152-2157, 1996.

GUÉNARD, Frédéric et al. Methylation and expression of immune and inflammatory genes in the offspring of bariatric bypass surgery patients. **Journal of obesity**, v. 2013, 2013.

GUO, Shumei S. et al. The predictive value of childhood body mass index values for overweight at age 35 y. **The American journal of clinical nutrition**, v. 59, n. 4, p. 810-819, 1994.

GUPTA, Janhavi et al. TGF β -dependent induction of interleukin-11 and interleukin-8 involves SMAD and p38 MAPK pathways in breast tumor models with varied bone metastases potential. **Cancer biology & therapy**, v. 11, n. 3, p. 311-316, 2011.

HA, Helen; DEBNATH, Bikash; NEAMATI, Nouri. Role of the CXCL8-CXCR1/2 axis in cancer and inflammatory diseases. **Theranostics**, v. 7, n. 6, p. 1543, 2017.

HADASCHIK, E. N.; ENK, A. H. TGF- β 1-induced regulatory T cells. **Human immunology**, v. 76, n. 8, p. 561-564, 2015.

HAJIAN-TILAKI, Karimollah; HEIDARI, Behzad. A comparison between International Obesity Task Force and Center for Disease Control references in assessment of overweight and obesity among adolescents in Babol, northern Iran. **International journal of preventive medicine**, v. 4, n. 2, p. 226, 2013.

HALPERN, Keren Bahar; VANA, Tal; WALKER, Michael D. Paradoxical role of DNA methylation in activation of FoxA2 gene expression during endoderm development. **Journal of Biological Chemistry**, p. jbc. M114. 573469, 2014.

HAN, Tian-Jie; WANG, Xin. Leptin and its receptor in hematologic malignancies. **International journal of clinical and experimental medicine**, v. 8, n. 11, p. 19840, 2015.

HART, Kevin M. et al. Type 2 immunity is protective in metabolic disease but exacerbates NAFLD collaboratively with TGF- β . **Science translational medicine**, v. 9, n. 396, p. eaal3694, 2017.

HATIPOĞLU, Nihal et al. Relationship between neck circumference and non-alcoholic fatty liver disease in childhood obesity. **Journal of clinical research in pediatric endocrinology**, v. 8, n. 1, p. 32, 2016.

HE, Yupeng; ECKER, Joseph R. Non-CG methylation in the human genome. **Annual review of genomics and human genetics**, v. 16, p. 55-77, 2015.

HEIJMANS, Bastiaan T. et al. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 44, p. 17046-17049, 2008.

HERMSDORFF, H. H. et al. TNF-alpha promoter methylation in peripheral white blood cells: relationship with circulating TNF α , truncal fat and n-6 PUFA intake in young women. **Cytokine**, v. 64, n. 1, p. 265-271, 2013.

HERTELYOVA, Z. et al. The association between lipid parameters and obesity in university students. **Journal of endocrinological investigation**, v. 39, n. 7, p. 769-778, 2016.

HERVOUET, Eric et al. Specific or not specific recruitment of DNMTs for DNA methylation, an epigenetic dilemma. **Clinical epigenetics**, v. 10, n. 1, p. 17, 2018.

HOLLIDAY, Robin; PUGH, John E. DNA modification mechanisms and gene activity during development. **Science**, v. 187, n. 4173, p. 226-232, 1975.

HOTAMISLIGIL, Gokhan S. et al. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. **The Journal of clinical investigation**, v. 95, n. 5, p. 2409-2415, 1995.

HOTAMISLIGIL, Gökhan S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 860, 2006.

HU, J.; BARRETT, R. D. H. Epigenetics in Natural Animal Populations. **Journal of Evolutionary Biology**, 2017.

HU, Shaohui et al. DNA methylation presents distinct binding sites for human transcription factors. **Elife**, v. 2, p. e00726, 2013.

HUANG, Yi-Shin et al. Serum levels of interleukin-8 in alcoholic liver disease: relationship with disease stage, biochemical parameters and survival. **Journal of hepatology**, v. 24, n. 4, p. 377-384, 1996.

HUANG, R. C. et al. Genome-wide methylation analysis identifies differentially methylated CpG loci associated with severe obesity in childhood. **Epigenetics**, v. 10, n. 11, p. 995-1005, 2015.

HUGHES, Catherine E.; NIBBS, Robert JB. A guide to chemokines and their receptors. **The FEBS journal**, 2018.

HURTADO-ROCA, Yamilee et al. Oxidized LDL is associated with metabolic syndrome traits independently of central obesity and insulin resistance. **Diabetes**, v. 66, n. 2, p. 474-482, 2017.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. POF 2008-2009: desnutrição cai e peso das crianças brasileiras ultrapassa padrão internacional. Disponível em: <<https://censo2010.ibge.gov.br/noticiascenso.html?view=noticia&id=1&idnoticia=1699>>

[&busca=1&t=pof-20082009-desnutricao-cai-peso-criancas-brasileiras-ultrapassa-padrao-internacional](#)>. Acesso em: 01 jan. 2019.

IBRAHIM, M. Mohsen. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. **Obesity reviews**, v. 11, n. 1, p. 11-18, 2010.

INBAR-FEIGENBERG, Michal et al. Basic concepts of epigenetics. **Fertility and sterility**, v. 99, n. 3, p. 607-615, 2013.

INGRAM, Sonia; DIOTALLEVI, M. Reactive oxygen species: Rapid fire in inflammation. **Biochemist**, v. 39, p. 30-33, 2017.

INOGUCHI, Toyoshi et al. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD (P) H oxidase in cultured vascular cells. **Diabetes**, v. 49, n. 11, p. 1939-1945, 2000.

JALILI, Mahsa et al. Effect of diet and nutrients on molecular mechanism of gene expression mediated by nuclear receptor and epigenetic modulation. **The Open Nutraceuticals Journal**, v. 6, n. 1, 2013.

JARRAR, M. H. et al. Adipokines and cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 27, n. 5, p. 412-421, 2008.

JELTSCH, A.; JURKOWSKA, R. Z. Allosteric control of mammalian DNA methyltransferases—a new regulatory paradigm. **Nucleic acids research**, v. 44, n. 18, p. 8556-8575, 2016.

JIN, Bilian; ROBERTSON, Keith D. DNA methyltransferases, DNA damage repair, and cancer. In: **Epigenetic Alterations in Oncogenesis**. Springer, New York, NY, 2013. p. 3-29.

JUNDI, K.; GREENE, C. M. Transcription of interleukin-8: how altered regulation can affect cystic fibrosis lung disease. **Biomolecules**, v. 5, n. 3, p. 1386-1398, 2015.

KADAKIA, R. et al. Maternal pre-pregnancy BMI downregulates neonatal cord blood LEP methylation. **Pediatric obesity**, v. 12, p. 57-64, 2017.

KAMADA, Yoshihiro et al. Hypoadiponectinemia accelerates hepatic tumor formation in a nonalcoholic steatohepatitis mouse model. **Journal of hepatology**, v. 47, n. 4, p. 556-564, 2007.

KANDA, Hajime et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. **The Journal of clinical investigation**, v. 116, n. 6, p. 1494-1505, 2006.

KARMEN, Arthur; WROBLEWSKI, Felix; LADUE, John S. Transaminase activity in human blood. **The Journal of clinical investigation**, v. 34, n. 1, p. 126-133, 1955.

KAWASHIMA, Keisuke et al. Adiponectin and intelectin-1: important adipokine players in obesity-related colorectal carcinogenesis. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 4, p. 866, 2017.

KELSEY, Megan M. et al. Age-related consequences of childhood obesity. **Gerontology**, v. 60, n. 3, p. 222-228, 2014.

KEYES, Mary K. et al. Older age and dietary folate are determinants of genomic and p16-specific DNA methylation in mouse colon. **The Journal of nutrition**, v. 137, n. 7, p. 1713-1717, 2007.

KHAN, Sami M. et al. Leptin as a modulator of neuroendocrine function in humans. **Yonsei medical journal**, v. 53, n. 4, p. 671-679, 2012.

KIM, C. S. et al. Circulating levels of MCP-1 and IL-8 are elevated in human obese subjects and associated with obesity-related parameters. **International journal of obesity**, v. 30, n. 9, p. 1347, 2006.

KIM, Francis et al. Toll-like receptor-4 mediates vascular inflammation and insulin resistance in diet-induced obesity. **Circulation research**, v. 100, n. 11, p. 1589-1596, 2007.

KITADE, Hironori et al. CCR5 plays a critical role in obesity-induced adipose tissue inflammation and insulin resistance by regulating both macrophage recruitment and M1/M2 status. **Diabetes**, p. DB_111506, 2012.

KLOP, Boudewijn; ELTE, Jan Willem F.; CABEZAS, Manuel Castro. Dyslipidemia in obesity: mechanisms and potential targets. **Nutrients**, v. 5, n. 4, p. 1218-1240, 2013.

KLÖTING, Nora et al. Insulin-sensitive obesity. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 299, n. 3, p. E506-E515, 2010.

KLÖTING, N.; BLÜHER, M. Adipocyte dysfunction, inflammation and metabolic syndrome. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 15, n. 4, p. 277-287, 2014.

KNUDSEN, Anders R. et al. Correlation between liver cell necrosis and circulating alanine aminotransferase after ischaemia/reperfusion injuries in the rat liver. **International journal of experimental pathology**, v. 97, n. 2, p. 133-138, 2016.

KOENEN, Tim B. et al. The inflammasome and caspase-1 activation: a new mechanism underlying increased inflammatory activity in human visceral adipose tissue. **Endocrinology**, v. 152, n. 10, p. 3769-3778, 2011.

KOLEVA, Daniela Iv et al. Pathophysiological role of adiponectin, leptin and asymmetric dimethylarginine in the process of atherosclerosis. **Folia medica**, v. 58, n. 4, p. 234-240, 2016.

KUCZMARSKI, Robert J. 2000 CDC growth charts for the United States; methods and development. 2002.

KUMAR, S.; KELLY, A. S. Review of childhood obesity: from epidemiology, etiology, and comorbidities to clinical assessment and treatment. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 92, n. 2, p. 251-265, 2017.

KUROSHIMA, Akihiro. Brown adipose tissue thermogenesis as physiological strategy for adaptation. **The Japanese journal of physiology**, v. 43, n. 2, p. 117-139, 1993.

KURYSZKO, J.; SŁAWUTA, P.; SAPIKOWSKI, G. Secretory function of adipose tissue. **Polish journal of veterinary sciences**, v. 19, n. 2, p. 441-446, 2016.

KWON, Nam-Hee et al. DNA methylation and the expression of IL-4 and IFN- γ promoter genes in patients with bronchial asthma. **Journal of clinical immunology**, v. 28, n. 2, p. 139-146, 2008.

LA CAVA, Antonio. Leptin in inflammation and autoimmunity. **Cytokine**, v. 98, p. 51-58, 2017.

LANDMAN, Rita E. et al. Endotoxin stimulates leptin in the human and nonhuman primate. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, n. 3, p. 1285-1291, 2003.

LANGHANS, Bettina et al. Intrahepatic IL-8 producing Foxp3+ CD4+ regulatory T cells and fibrogenesis in chronic hepatitis C. **Journal of hepatology**, v. 59, n. 2, p. 229-235, 2013.

LEE, JooHo et al. Epigenetics in non-alcoholic fatty liver disease. **Molecular aspects of medicine**, v. 54, p. 78-88, 2017.

LEE, Suman et al. Positive correlation of cg16672562 methylation with obesity-related traits in childhood obesity, and its independence with underlying HIF3A (hypoxia-inducible factor 3a) genetic background. **Oncotarget**, v. 8, n. 40, p. 67473, 2017.

LENGYEL, Ernst et al. Cancer as a matter of fat: the crosstalk between adipose tissue and tumors. **Trends in cancer**, 2018.

LI, L.; DAHIYA, R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. **Bioinformatics**, v. 18, n. 11, p. 1427-1431, 2002.

LI, Ming O. et al. Transforming growth factor- β regulation of immune responses. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 24, p. 99-146, 2006.

LI, E.; ZHANG, Y. DNA methylation in mammals. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 6, n. 5, p. 1-22, 2014.

LIM, Joong-Yeon; KIM, Won Ho; PARK, Sang Ick. GO6976 prevents TNF- α -induced suppression of adiponectin expression in 3T3-L1 adipocytes: Putative involvement of protein kinase C. **FEBS letters**, v. 582, n. 23-24, p. 3473-3478, 2008.

- LIU, Ailing et al. Bone marrow lympho-myeloid malfunction in obesity requires precursor cell-autonomous TLR4. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 708, 2018.
- LIU, Qian et al. The CXCL8-CXCR1/2 pathways in cancer. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 31, p. 61-71, 2016.
- LIU, Ying L. et al. Obesity and survival in the neoadjuvant breast cancer setting: role of tumor subtype in an ethnically diverse population. **Breast cancer research and treatment**, v. 167, n. 1, p. 277-288, 2017.
- LU, Shan; DONG, Zhongyun. Characterization of TGF- β -regulated interleukin-8 expression in human prostate cancer cells. **The Prostate**, v. 66, n. 9, p. 996-1004, 2006.
- LUMEY, L. H. et al. Adult global DNA methylation in relation to pre-natal nutrition. **International journal of epidemiology**, v. 41, n. 1, p. 116-123, 2011.
- LUMENG, Carey N.; BODZIN, Jennifer L.; SALTIEL, Alan R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, n. 1, p. 175-184, 2007.
- LUO, Yan; LIU, Meilian. Adiponectin: a versatile player of innate immunity. **Journal of molecular cell biology**, v. 8, n. 2, p. 120-128, 2016.
- MADAKASHIRA, Bhavani P.; SADLER, Kirsten C. DNA Methylation, Nuclear Organization, and Cancer. **Frontiers in Genetics**, v. 8, p. 76-83, 2017.
- MAFFEI, M. et al. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. **Nature medicine**, v. 1, n. 11, p. 1155, 1995.
- MANSEGO, M. L. et al. DNA methylation of miRNA coding sequences putatively associated with childhood obesity. **Pediatric obesity**, v. 12, n. 1, p. 19-27, 2017.
- MAO, Xuming; HONG, Jenny Y.; DONG, Lily Q. The adiponectin signaling pathway as a novel pharmacological target. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 6, n. 12, p. 1331-1340, 2006.
- MARCO, Asaf et al. DNA CpG methylation (5-methylcytosine) and its derivative (5-hydroxymethylcytosine) alter histone posttranslational modifications at the Pomc promoter, affecting the impact of perinatal diet on leanness and obesity of the offspring. **Diabetes**, v. 65, n. 8, p. 2258-2267, 2016.
- MARKERT, Clement L. Neoplasia: a disease of cell differentiation. **Cancer research**, v. 28, n. 9, p. 1908-1914, 1968.
- MARTINEZ-SANTIBAÑEZ, Gabriel; NIEN-KAI LUMENG, Carey. Macrophages and the regulation of adipose tissue remodeling. **Annual review of nutrition**, v. 34, p. 57-76, 2014.

MATHIS, Diane. Immunological goings-on in visceral adipose tissue. **Cell metabolism**, v. 17, n. 6, p. 851-859, 2013.

MATTOS, Rafael T. et al. Chronic low-grade inflammation in childhood obesity is associated with decreased IL-10 expression by monocyte subsets. **PloS one**, v. 11, n. 12, p. e0168610, 2016.

MCLAUGHLIN, Tracey et al. Use of metabolic markers to identify overweight individuals who are insulin resistant. **Annals of internal medicine**, v. 139, n. 10, p. 802-809, 2003.

MCLAUGHLIN, Tracey et al. Role of innate and adaptive immunity in obesity-associated metabolic disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 127, n. 1, p. 5-13, 2017.

MEDEIROS, Nayara I. et al. IL-10 and TGF- β unbalanced levels in neutrophils contribute to increase inflammatory cytokine expression in childhood obesity. **European journal of nutrition**, p. 1-10, 2017.

MEILLEUR, Katherine G. et al. Circulating adiponectin is associated with obesity and serum lipids in West Africans. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 95, n. 7, p. 3517-3521, 2010.

MEDEHOUEYOU, Thierry Comlan Marc et al. Overweight and obesity prevalence among school-aged Nunavik Inuit children according to three body mass index classification systems. **Journal of Adolescent Health**, v. 57, n. 1, p. 31-36, 2015.

MICHELS, Karin B.; HARRIS, Holly R.; BARAULT, Ludovic. Birthweight, maternal weight trajectories and global DNA methylation of LINE-1 repetitive elements. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e25254, 2011.

MILIĆ, Sandra; LULIĆ, Davorka; ŠTIMAC, Davor. Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: biochemical, metabolic and clinical presentations. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 28, p. 9330, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. DEPARTAMENTO DE ATENÇÃO BÁSICA. Orientações para a coleta e análise de dados antropométricos em serviços de saúde: Norma Técnica do Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional-SISVAN. 2011.

MOEN, Erika L. et al. New themes in the biological functions of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine. **Immunological reviews**, v. 263, n. 1, p. 36-49, 2015.

MOORE, L. D.; LE, T.; FAN, G. DNA methylation and its basic function. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 1, p. 23-38, 2013.

MOUSTAKAS, A.; HELDIN, C. The regulation of TGF β signal transduction. **Development**, v. 136, n. 22, p. 3699-3714, 2009.

MUPPALA, Santoshi et al. Adiponectin: Its role in obesity-associated colon and prostate cancers. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 116, p. 125-133, 2017.

NAGEL, Gabriele et al. Prevalence and cluster of cardiometabolic biomarkers in overweight and obese schoolchildren: results from a large survey in southwest Germany. **Clinical Chemistry**, v. 54, n. 2, p. 317-325, 2008.

NCD-Risc, Risk Factor Collaboration. Body-mass index – Evolution of BMI over time. Disponível em: <<http://www.ncdrisc.org/obesity-prevalence-map-ado.html>>. Acesso em: 01 jan. 2019.

NETEA, Mihai G. et al. A guiding map for inflammation. **Nature immunology**, v. 18, n. 8, p. 826, 2017.

NEWTON, Kim; DIXIT, Vishva M. Signaling in innate immunity and inflammation. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, p. a006049, 2012.

NGUYEN, MT Audrey et al. A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 48, p. 35279-35292, 2007.

NIGRO, Ersilia et al. New insight into adiponectin role in obesity and obesity-related diseases. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

OHASHI, Koji et al. Adiponectin promotes macrophage polarization toward an anti-inflammatory phenotype. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 9, p. 6153-6160, 2010.

OELSNER, Kathryn Tully et al. Maternal BMI as a predictor of methylation of obesity-related genes in saliva samples from preschool-age Hispanic children at-risk for obesity. **BMC genomics**, v. 18, n. 1, p. 57, 2017.

ONAT, Altan et al. “Atherogenic index of plasma”(log10 triglyceride/high-density lipoprotein- cholesterol) predicts high blood pressure, diabetes, and vascular events. **Journal of clinical lipidology**, v. 4, n. 2, p. 89-98, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Growth reference 5-19 years. Disponível em: < https://www.who.int/growthref/who2007_bmi_for_age/en/>. Acesso em: 26 jan. 2019.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Obesity and overweight. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. Acesso em: 30 jun. 2017.

OTA, Tsuguhito. Chemokine systems link obesity to insulin resistance. **Diabetes & metabolism journal**, v. 37, n. 3, p. 165-172, 2013.

OWENS, S. Childhood obesity and the metabolic syndrome. **American Journal of Lifestyle Medicine**. v. 7, n. 5, p. 315-323, 2013.

PALMER, Melissa; SCHAFFNER, Fenton. Effect of weight reduction on hepatic abnormalities in overweight patients. **Gastroenterology**, v. 99, n. 5, p. 1408-1413, 1990.

PAN, Hong et al. HIF3A association with adiposity: the story begins before birth. **Epigenomics**, v. 7, n. 6, p. 937-950, 2015.

PAN, Warren W.; MYERS JR, Martin G. Leptin and the maintenance of elevated body weight. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 19, n. 2, p. 95, 2018.

PARACCHINI, V.; PEDOTTI, P.; TAIOLI, E. Genetics of leptin and obesity: a HuGE review. **American journal of epidemiology**, v. 162, n. 2, p. 101-114, 2005.

PARK, Hye Soon; KIM, Myung Wha; SHIN, Eun Soo. Effect of weight control on hepatic abnormalities in obese patients with fatty liver. **Journal of Korean Medical Sciences**, v. 10, n. 6, p. 414-421, 1995.

PARTHASARATHY, Sampath et al. Oxidized low-density lipoprotein. In: **Free Radicals and Antioxidant Protocols**. Humana Press, 2010. p. 403-417.

PATIL, A. S.; SABLE, R. B.; KOTHARI, R. M. An update on transforming growth factor- β (TGF- β): Sources, types, functions and clinical applicability for cartilage/bone healing. **Journal of cellular physiology**, v. 226, n. 12, p. 3094-3103, 2011.

PAUL, Ian M. et al. The intervention nurses start infants growing on healthy trajectories (INSIGHT) study. **BMC pediatrics**, v. 14, n. 1, p. 184, 2014.

PERKINS, Ellen et al. Insulin-like growth factor 2/H19 methylation at birth and risk of overweight and obesity in children. **The Journal of pediatrics**, v. 161, n. 1, p. 31-39, 2012.

PIAZZON, M. C.; LUTFALLA, G.; FORLENZA, M. IL10, A Tale of an Evolutionarily Conserved Cytokine across Vertebrates. **Critical ReviewsTM in Immunology**, v. 36, n. 2, p. 90-129, 2016.

PIROLA, L.; FERRAZ, J. C. Role of pro-and anti-inflammatory phenomena in the physiopathology of type 2 diabetes and obesity. **World journal of biological chemistry**, v. 8, n. 2, p. 120-128, 2017.

PIRZGALSKA, Roksana M.; DOMINGOS, Ana I. Macrophages in obesity. **Cellular immunology**, 2018.

PONIATOWSKI, Ł. A.; WOJDASIEWICZ, P.; GASIK, R.; SZUKIEWICZ, D. Transforming growth factor Beta family: insight into the role of growth factors in regulation of fracture healing biology and potential clinical applications. **Mediators of inflammation**, v. 2015, p. 1-17, 2015.

PORTELA, A.; ESTELLER, M. Epigenetic modifications and human disease. **Nature biotechnology**, v. 28, n. 10, p. 1057-1068, 2010.

QI, Weier et al. TGF- β 1 induces IL-8 and MCP-1 through a connective tissue growth factor-independent pathway. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 290, n. 3, p. F703-F709, 2006.

RÀFOLS, Montserrat Esteve. Adipose tissue: cell heterogeneity and functional diversity. **Endocrinología y Nutrición (English Edition)**, v. 61, n. 2, p. 100-112, 2014.

RAHAMAN, S. Ohidar et al. A CD36-dependent signaling cascade is necessary for macrophage foam cell formation. **Cell metabolism**, v. 4, n. 3, p. 211-221, 2006.

RASTOGI, Deepa; SUZUKI, Masako; GREALLY, John M. Differential epigenome-wide DNA methylation patterns in childhood obesity-associated asthma. **Scientific reports**, v. 3, p. 2164, 2013.

REILLY, Shannon M.; SALTIEL, Alan R. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 13, n. 11, p. 633, 2017.

RELTON, Caroline L. et al. DNA methylation patterns in cord blood DNA and body size in childhood. **PloS one**, v. 7, n. 3, p. e31821, 2012.

RENEHAN, Andrew G. et al. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. **The Lancet**, v. 371, n. 9612, p. 569-578, 2008.

RIBEL-MADSEN, Rasmus et al. Genome-wide analysis of DNA methylation differences in muscle and fat from monozygotic twins discordant for type 2 diabetes. **PloS one**, v. 7, n. 12, p. e51302, 2012.

RICHMOND, Rebecca C. et al. DNA methylation and body mass index: investigating identified methylation sites at HIF3A in a causal framework. **Diabetes**, p. db150996, 2016.

RIGGS, Arthur D. X inactivation, differentiation, and DNA methylation. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 14, n. 1, p. 9-25, 1975.

RIZWAN, M. Z. et al. Temporal and regional onset of leptin resistance in diet-induced obese mice. **Journal of neuroendocrinology**, v. 29, n. 10, p. e12481, 2017.

ROEBUCK, Kenneth A. Regulation of interleukin-8 gene expression. **Journal of interferon & cytokine research**, v. 19, n. 5, p. 429-438, 1999.

ROSENBLOOM, Joel et al. Human fibrotic diseases: current challenges in fibrosis research. In: **Fibrosis**. Humana Press, New York, NY, 2017. p. 1-23.

ROY, Bipradas et al. Molecular mechanisms of obesity-induced osteoporosis and muscle atrophy. **Frontiers in physiology**, v. 7, p. 439, 2016.

RUI, Liangyou. Brown and Beige adipose tissues in health and disease. **Comprehensive Physiology**, v. 7, n. 4, p. 1281-1306, 2011.

RUPÉREZ, Azahara I.; GIL, Angel; AGUILERA, Concepción M. Genetics of oxidative stress in obesity. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 2, p. 3118-3144, 2014.

RUSSO, Remo C. et al. The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. **Expert review of clinical immunology**, v. 10, n. 5, p. 593-619, 2014.

RYAZANOVA, A. Yu et al. Diverse domains of (cytosine-5)-DNA methyltransferases: structural and functional characterization. In: **Methylation-From DNA, RNA and Histones to Diseases and Treatment**. InTech, 2012.

RZEHAK, Peter et al. DNA-methylation and body composition in preschool children: Epigenome-Wide-Analysis in the European Childhood Obesity Project (CHOP)-Study. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 14349, 2017.

SABAT, Robert et al. Biology of interleukin-10. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 21, n. 5, p. 331-344, 2010.

SAHIBZADA, Haafsa Arshad et al. Salivary IL-8, IL-6 and TNF- α as potential diagnostic biomarkers for oral cancer. **Diagnostics**, v. 7, n. 2, p. 21, 2017.

SALTIEL, Alan R.; OLEFSKY, Jerrold M. Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 127, n. 1, p. 1-4, 2017.

SALVAGGIO, Antonmo et al. Body mass index and liver enzyme activity in serum. **Clinical chemistry**, v. 37, n. 5, p. 720-723, 1991.

SAMAD, Fahumiya et al. Elevated expression of transforming growth factor-beta in adipose tissue from obese mice. **Molecular medicine**, v. 3, n. 1, p. 37, 1997.

SAMBLAS, M. et al. PTPRS and PER3 methylation levels are associated with childhood obesity: results from a genome-wide methylation analysis. **Pediatric obesity**, v. 13, n. 3, p. 149-158, 2018.

SCHERER, Philipp E. et al. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. **Journal of Biological chemistry**, v. 270, n. 45, p. 26746-26749, 1995.

SCHUSTEROVA, I. et al. Epicardial adipose tissue and cardiometabolic risk factors in overweight and obese children and adolescents. **Pediatric obesity**, v. 9, n. 1, p. 63-70, 2014.

SELL, Henrike; HABICH, Christiane; ECKEL, Juergen. Adaptive immunity in obesity and insulin resistance. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 8, n. 12, p. 709, 2012.

SEWTER, Ciaran et al. Human obesity and type 2 diabetes are associated with alterations in SREBP1 isoform expression that are reproduced ex vivo by tumor necrosis factor- α . **Diabetes**, v. 51, n. 4, p. 1035-1041, 2002.

SHEHZAD, Adeb et al. Adiponectin: regulation of its production and its role in human diseases. **Hormones**, v. 11, n. 1, p. 8-20, 2012.

SHERLING, Dawn Harris; PERUMAREDDI, Parvathi; HENNEKENS, Charles H. Metabolic syndrome: clinical and policy implications of the new silent killer. **Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics**, v. 22, n. 4, p. 365-367, 2017.

SHERWOOD, Edward R.; TOLIVER-KINSKY, Tracy. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.

SILHA, Josef V. et al. Plasma resistin, adiponectin and leptin levels in lean and obese subjects: correlations with insulin resistance. **European journal of endocrinology**, v. 149, n. 4, p. 331-335, 2003.

SINGER, Kanakadurga; LUMENG, Carey N. The initiation of metabolic inflammation in childhood obesity. **The Journal of clinical investigation**, v. 127, n. 1, p. 65-73, 2017.

SINGH, Jagdeep K. et al. Recent advances reveal IL-8 signaling as a potential key to targeting breast cancer stem cells. **Breast Cancer Research**, v. 15, n. 4, p. 210, 2013.

SINHA, Madhur K. et al. Nocturnal rise of leptin in lean, obese, and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. **The Journal of clinical investigation**, v. 97, n. 5, p. 1344-1347, 1996.

SJÖSTRÖM, Lars et al. Effects of bariatric surgery on cancer incidence in obese patients in Sweden (Swedish Obese Subjects Study): a prospective, controlled intervention trial. **The lancet oncology**, v. 10, n. 7, p. 653-662, 2009.

SOOFI, Abdul et al. The Kielin/chordin-like Protein (KCP) Attenuates High Fat Diet Induced Obesity and Metabolic Syndrome in Mice. **Journal of Biological Chemistry**, p. jbc. M116. 771428, 2017.

ST-PIERRE, Julie et al. IGF2 DNA methylation is a modulator of newborn's fetal growth and development. **Epigenetics**, v. 7, n. 10, p. 1125-1132, 2012.

STOJSAVLJEVIĆ, Sanja et al. Adipokines and proinflammatory cytokines, the key mediators in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 48, p. 18070, 2014.

STRACZKOWSKI, Marek et al. Plasma interleukin-8 concentrations are increased in obese subjects and related to fat mass and tumor necrosis factor- α system. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, n. 10, p. 4602-4606, 2002.

SUL, Hei Sook et al. Regulation of fat synthesis and adipose differentiation. In: **Progress in nucleic acid research and molecular biology**. Academic Press, 1998. p. 317-345.

SULLIVAN, Deborah E. et al. Tumor necrosis factor- α induces transforming growth factor- β 1 expression in lung fibroblasts through the extracellular signal-regulated kinase

pathway. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 32, n. 4, p. 342-349, 2005.

SULLIVAN, Deborah E. et al. TNF- α induces TGF- β 1 expression in lung fibroblasts at the transcriptional level via AP-1 activation. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 13, n. 8b, p. 1866-1876, 2009.

SUN, Kai et al. Fibrosis and adipose tissue dysfunction. **Cell metabolism**, v. 18, n. 4, p. 470-477, 2013.

SUN, Kai; KUSMINSKI, Christine M.; SCHERER, Philipp E. Adipose tissue remodeling and obesity. **The Journal of clinical investigation**, v. 121, n. 6, p. 2094-2101, 2011.

TALUKDAR, Saswata et al. Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase. **Nature medicine**, v. 18, n. 9, p. 1407, 2012.

TAM, C. S. et al. Obesity and low-grade inflammation: a paediatric perspective. **Obesity Reviews**, v. 11, n. 2, p. 118-126, 2010.

TAM, Charmaine S. et al. IL-6, IL-8 and IL-10 levels in healthy weight and overweight children. **Hormone research in paediatrics**, v. 73, n. 2, p. 128-134, 2010.

THAKER, Vidhu V. GENETIC AND EPIGENETIC CAUSES OF OBESITY. **Adolescent medicine: state of the art reviews**, v. 28, n. 2, p. 379, 2017.

THOMAS, Non Eleri et al. Associations between metabolic syndrome components and markers of inflammation in Welsh school children. **European journal of pediatrics**, v. 177, n. 3, p. 409-417, 2018.

THORNTON, A. J. et al. Cytokine-induced gene expression of a neutrophil chemotactic factor/IL-8 in human hepatocytes. **The Journal of Immunology**, v. 144, n. 7, p. 2609-2613, 1990.

TOBI, Elmar W. et al. DNA methylation differences after exposure to prenatal famine are common and timing-and sex-specific. **Human molecular genetics**, v. 18, n. 21, p. 4046-4053, 2009.

TREMMEL, Maximilian et al. Economic burden of obesity: a systematic literature review. **International journal of environmental research and public health**, v. 14, n. 4, p. 435, 2017

TSURUTANI, Yuya et al. The roles of transforming growth factor- β and Smad3 signaling in adipocyte differentiation and obesity. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 407, n. 1, p. 68-73, 2011.

TURNER, Mark D. et al. Cytokines and chemokines: at the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1843, n. 11, p. 2563-2582, 2014.

TZANAVARI, T.; GIANNOGONAS, P.; KARALIS, Katia P. TNF- α and obesity. In: **TNF Pathophysiology**. Karger Publishers, 2010. p. 145-156.

UDDIN, Shahab; MOHAMMAD, Ramzi M. Role of leptin and leptin receptors in hematological malignancies. **Leukemia & lymphoma**, v. 57, n. 1, p. 10-16, 2016.

VADACCA, Marta et al. Leptin in immuno-rheumatological diseases. **Cellular & molecular immunology**, v. 8, n. 3, p. 203, 2011.

VALERIO, Giuliana et al. Childhood obesity classification systems and cardiometabolic risk factors: a comparison of the Italian, World Health Organization and International Obesity Task Force references. **Italian journal of pediatrics**, v. 43, n. 1, p. 19, 2017.

VAN DIJK, Susan J. et al. Epigenetics and human obesity. **International journal of obesity**, v. 39, n. 1, p. 85, 2015.

VERMA, Renu et al. A network map of Interleukin-10 signaling pathway. **Journal of cell communication and signaling**, v. 10, n. 1, p. 61-67, 2016.

VOLBERG, Vitaly et al. CpG Methylation across the adipogenic PPAR γ gene and its relationship with birthweight and child BMI at 9 years. **BMC medical genetics**, v. 18, n. 1, p. 7, 2017.

WADDINGTON, Conrad H. The epigenotype. **Endeavour**, v. 1, p. 18-20, 1942.

WANDERLEY, Emanuela Nogueira; FERREIRA, Vanessa Alves. Obesidade: uma perspectiva plural. **Ciencia & saude coletiva**, v. 15, p. 185-194, 2010.

WANG, Mingyi et al. Matrix metalloproteinase 2 activation of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and TGF- β 1–type II receptor signaling within the aged arterial wall. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 26, n. 7, p. 1503-1509, 2006.

WANG, Yong-Qi et al. Hypermethylation of TGF- β 1 gene promoter in gastric cancer. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 19, n. 33, p. 5557, 2013.

WANG, Shuo et al. HIF3A DNA methylation is associated with childhood obesity and ALT. **PloS one**, v. 10, n. 12, p. e0145944, 2015.

WANG, Yajing; MA, Xin L.; LAU, Wayne Bond. Cardiovascular adiponectin resistance: the critical role of adiponectin receptor modification. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 28, n. 7, p. 519-530, 2017.

WASIM, Muhammad et al. Role of leptin deficiency, inefficiency, and leptin receptors in obesity. **Biochemical genetics**, v. 54, n. 5, p. 565-572, 2016.

WAUMAN, Joris; ZABEAU, Lennart; TAVERNIER, Jan. The leptin receptor complex: heavier than expected?. **Frontiers in endocrinology**, v. 8, p. 30, 2017.

WEN, Li Ming et al. Effectiveness of home based early intervention on children's BMI at age 2: randomised controlled trial. **Bmj**, v. 344, p. e3732, 2012.

WILLIAMS, Christopher D. et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. **Gastroenterology**, v. 140, n. 1, p. 124-131, 2011.

WOLF, Anna M. et al. Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 323, n. 2, p. 630-635, 2004.

WOLFFENBUTTEL, B. H. R. et al. Unfavourable blood pressure and LDL-cholesterol levels in obese non-diabetic individuals. **The Netherlands journal of medicine**, v. 75, n. 9, p. 399-411, 2017.

WU, Davina et al. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. **Science**, v. 332, n. 6026, p. 243-247, 2011.

WU, Fujia et al. miR-6539 is a novel mediator of somatic cell reprogramming that represses the translation of Dnmt3b. **Journal of Reproduction and Development**, v. 63, n. 4, p. 415-423, 2017.

WU, Xiaoji; ZHANG, Yi. TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. **Nature Reviews Genetics**, v. 18, n. 9, p. 517, 2017.

XIAO, Yi Qun et al. Transcriptional and translational regulation of TGF- β production in response to apoptotic cells. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 5, p. 3575-3585, 2008.

XU, Xiaojing et al. A genome-wide methylation study on obesity: differential variability and differential methylation. **Epigenetics**, v. 8, n. 5, p. 522-533, 2013.

XU, Liang et al. Roles of chemokines and chemokine receptors in obesity-associated insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease. **Biomolecules**, v. 5, n. 3, p. 1563-1579, 2015.

YADAV, Amita et al. Correlation of adiponectin and leptin with insulin resistance: a pilot study in healthy north Indian population. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 26, n. 2, p. 193-196, 2011.

YADAV, Hariom et al. Protection from obesity and diabetes by blockade of TGF- β /Smad3 signaling. **Cell metabolism**, v. 14, n. 1, p. 67-79, 2011.

YAN, Yinkun et al. Childhood adiposity and nonalcoholic fatty liver disease in adulthood. **Pediatrics**, p. e20162738, 2017.

YANG, Hyunwon et al. Obesity increases the production of proinflammatory mediators from adipose tissue T cells and compromises TCR repertoire diversity: implications for systemic inflammation and insulin resistance. **The Journal of Immunology**, p. 1000021, 2010.

YANG, I. V. et al. Epigenetic marks of in utero exposure to gestational diabetes and childhood adiposity outcomes: the EPOCH study. **Diabetic Medicine**, v. 35, n. 5, p. 612-620, 2018.

YANG, Wei-Shiung et al. Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, n. 8, p. 3815-3819, 2001.

YE, Jianping; MCGUINNESS, Owen P. Inflammation during obesity is not all bad: evidence from animal and human studies. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 304, n. 5, p. E466-E477, 2012.

ZAMANI, Nader; BROWN, Chester W. Emerging roles for the transforming growth factor- β superfamily in regulating adiposity and energy expenditure. **Endocrine reviews**, v. 32, n. 3, p. 387-403, 2010.

ZAPPALÀ, Giovanna; RECHLER, Matthew M. IGFBP-3, hypoxia and TNF- α inhibit adiponectin transcription. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 382, n. 4, p. 785-789, 2009.

ZDANOV, A. Structural features of the interleukin-10 family of cytokines. **Current pharmaceutical design**, v. 10, n. 31, p. 3873-3884, 2004.

ŻELECHOWSKA, P. et al. Mast cells participate in chronic low-grade inflammation within adipose tissue. **Obesity Reviews**, v. 19, n. 5, p. 686-697, 2018.

ZHANG, Yiying et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, n. 6505, p. 425, 1994.

ZHANG, J.; AN, J. Cytokines, inflammation and pain. **International anesthesiology clinics**, v. 45, n. 2, p. 27-37, 2007.

ZHANG, G.; PRADHAN, S. Mammalian epigenetic mechanisms. **IUBMB life**, v. 66, n. 4, p. 240-256, 2014.

ZHANG, Wu; XU, Jie. DNA methyltransferases and their roles in tumorigenesis. **Biomarker research**, v. 5, n. 1, p. 1, 2017.

ZHAO, Y.; LV, G. Correlation of C-reactive protein level and obesity in Chinese adults and children: a meta-analysis. **Journal of endocrinological investigation**, v. 36, n. 8, p. 642-647, 2013.

ZHENG, Jia et al. DNA methylation: the pivotal interaction between early-life nutrition and glucose metabolism in later life. **British Journal of Nutrition**, v. 112, n. 11, p. 1850-1857, 2014.

ZHU, H.; LUO, H.; SHEN, Z.; HU, X.; SUN, L.; ZHU, X. Transforming growth factor- β 1 in carcinogenesis, progression, and therapy in cervical cancer. **Tumor Biology**, v. 37, n. 6, p. 7075-7083, 2016.

ZIMMERMANN, Henning W. et al. Interleukin-8 is activated in patients with chronic liver diseases and associated with hepatic macrophage accumulation in human liver fibrosis. **PloS one**, v. 6, n. 6, p. e21381, 2011.

ANEXO I – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Prezado(a) Sr(a).:

O seu filho(a) está sendo convidado(a) para participar, como voluntário(a) em um projeto que avaliará marcadores de risco à saúde em um grupo de crianças e adolescentes com obesidade, através da dosagem de marcadores bioquímicos e moleculares coletados em seu sangue. No caso de autorizar que ele faça parte da mesma, ele responderá um questionário sobre sua saúde e terá seu sangue coletado para que avaliações laboratoriais sejam realizadas.

A sua participação e a sua opinião contribuirão para demonstrar os marcadores de risco para obesidade em crianças e adolescentes, possibilitando detecção precoce de biomarcadores de risco cardiometabólico associado a detecção da presença de variações gênicas responsáveis pela obesidade nesse grupo pediátrico. Para a realização da pesquisa se faz necessário a coleta de sangue dos pacientes, assim teremos o cuidado com esse grupo de indivíduos, pois poderão ocorrer intercorrências no momento da punção venosa como alteração da pressão arterial, formação de hematoma ou dor local nos pesquisados, assim como acidente com material da punção venosa nos pesquisadores. Você ou ele terão liberdade para pedir esclarecimentos sobre qualquer questão, bem como para desistir de participar da pesquisa em qualquer momento que desejar, sem que isto leve você ou ele a qualquer penalidade.

Como responsável por este estudo, tenho o compromisso de não publicar dados pessoais, mesmo que estes não possam ser mantidos em segredo na análise da pesquisa, bem como de indenizá-lo se sofrer algum prejuízo físico ou moral por causa do mesmo.

Assim, se está claro para você a finalidade dessa pesquisa e se concorda em que seu filho(a) participe como voluntário, peço que assine este documento.

Meus agradecimentos pela sua colaboração.

Dr. Carlos Alberto Menezes
Telefone para contato: (73) 3680-5293

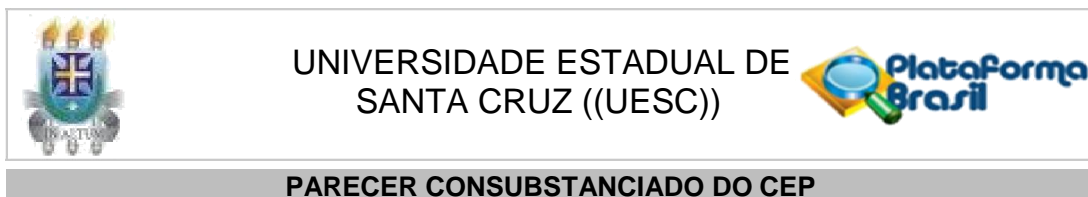
Eu, _____,
RG _____,

autorizo _____ a
participar das atividades da pesquisa: "AVALIAÇÃO DE MARCADORES BIOQUÍMICOS E
MOLECULARES DE RISCO CARDIO-METABÓLICO EM UM GRUPO DE CRIANÇAS E
ADOLESCENTES COM OBESIDADE". Fui devidamente informado que ele responderá um
questionário sobre sua saúde e terá seu sangue coletado para que avaliações laboratoriais
sejam realizadas. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer
momento, sem que isto leve a qualquer penalidade, e que os dados de identificação e outros
pessoais não relacionados à pesquisa não serão publicados.

Local e data: _____, ____/____/____

Assinatura do Responsável

ANEXO II – Parecer do Comitê de Ética



DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de marcadores genéticos e bioquímicos relacionados à obesidade em um grupo de crianças e adolescentes

Pesquisador: CARLOS ALBERTO MENEZES

Área Temática: Área 1. Genética Humana.
(Trata-se de pesquisa envolvendo genética humana não contemplada acima.);

Versão: 2

CAAE: 04065412.6.0000.5526

Instituição Proponente: Universidade Estadual de Santa Cruz ((UESC))

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 150.426

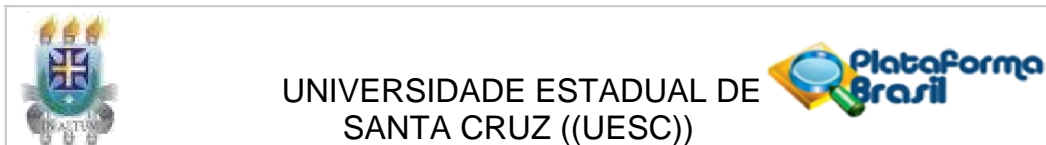
Data da Relatoria: 21/11/2012

Apresentação do Projeto:

Projeto intitulado Avaliação de marcadores genéticos e bioquímicos relacionados à obesidade em um grupo de crianças e adolescentes, sob a responsabilidade do pesquisador Carlos Alberto Menezes.

A obesidade infanto-juvenil é uma problemática mundial e já apresenta níveis alarmantes. É sabido que 80% das crianças e adolescentes obesos serão adultos obesos com risco de co-morbidades metabólicas, aterosclerótica e coronariana. Desta forma, os pesquisadores buscam avaliar marcadores genéticos e bioquímicos relacionados à obesidade em um grupo de crianças e adolescentes. Para tanto serão incluídos no estudo 250 indivíduos caso, diagnosticados clinicamente com obesidade, e 250 controles não obesos. Os casos serão provenientes do Serviço de tratamento para crianças e adolescentes (7 a 18 anos) com obesidade em Aracaju Sergipe (SEMPRE). Como integrantes ativos desse Programa essas crianças e adolescentes passarão por uma avaliação clínica para caracterização fenotípica da obesidade utilizando parâmetros antropométricos, bioquímicos, hormonais, além da dosagem dos marcadores de processo inflamatório da obesidade com risco cardiovascular representados pela proteína C reativa ultra-sensível, homocisteína, TNF- α , interleucina-6, leptina, e adiponectina. Além disso, será realizada a determinação do HOMA (Homeostasis model assesment of insulin resistance) para caracterização da Síndrome Metabólica.

Endereço: Campus Soane Nazaré de Andrade, Rodovia Jorge Amado, Km 16, Bairro Salobrinho
Bairro: CENTRO **CEP:** 45.662-900
UF: BA **Município:** ILHEUS
Telefone: (73)3680-5319 **Fax:** (73)3680-5319 **E-mail:** cep_uesc@yahoo.com.br



Continuação do Parecer: 150.426

O presente estudo constará de três etapas: a primeira etapa consiste na seleção das crianças e adolescentes dos casos e controles; a segunda etapa consiste na avaliação clínica e de dosagens laboratoriais e, por fim, a terceira etapa consiste na análise molecular para determinação dos polimorfismos nas regiões promotoras dos genes de IL-6 (-174G/C), do TNF- α (-308G/A) e leptina (- 2548G/A), utilizando a técnica de PCR em tempo real. Posteriormente os autores irão correlacionar os dados clínicos, laboratoriais e sócio-demográficos. Após resultados irão desenvolver estratégias no sentido da prevenção, pois o diagnóstico precoce do processo aterosclerótico dessas crianças e adolescentes é de fundamental importância na prevenção das co-morbidades cardíacas futuras.

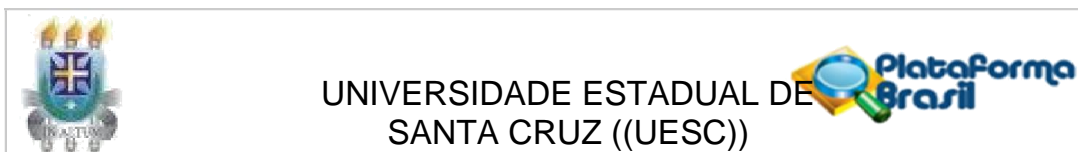
Objetivo da Pesquisa:

Avaliar marcadores genéticos e bioquímicos relacionados à obesidade em um grupo de crianças e adolescentes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os autores relatam que os riscos são mínimos para os participantes, no entanto haverá coleta de material biológico: sangue que envolve vários riscos aos participantes. Riscos durante os procedimentos para coleta, tais como alterações na pressão arterial, acidentes com material perfurocortante, entre outros. Desta forma, os autores devem esclarecer como será realizado o procedimento de coleta e todos os cuidados que serão tomados antes e após o período da coleta das crianças.





Continuação do Parecer: 150.426

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma pesquisa com extrema relevância, bem fundamentada e justificada

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

De acordo

Recomendações:

Nada a declarar

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem restrições e pendências

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê de Ética em Pesquisa da UESC avaliou as respostas ao parecer com pendências de número 125209 e considerou que todos os aspectos atinentes foram respondidos. A decisão final para este protocolo é portanto favorável à APROVAÇÃO.

ILHEUS, 21 de Novembro de 2012

Assinador por: Aline

**Oliveira da
Conceição
(Coordenadora)**

Endereço: Campus Soane Nazaré de Andrade, Rodovia Jorge Amado, Km 16, Bairro Salobrinho
Bairro: CENTRO **CEP:** 45.662-900