

JULYA RAQUEL SIMOES NASCIMENTO

**POLIMORFISMO GENÉTICO, METILAÇÃO E EXPRESSÃO DO GENE
IL6 EM CRIANÇAS OBESAS**

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais

Dezembro/2022

JULYA RAQUEL SIMOES NASCIMENTO

**POLIMORFISMO GENÉTICO, METILAÇÃO E EXPRESSÃO DO GENE
IL6 EM CRIANÇAS OBESAS**

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. Paula Rocha
Moreira

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais

Dezembro/2022

- 043 Nascimento, Julya Raquel Simoes.
Polimorfismo genético, metilação e expressão do gene IL6 em crianças com obesidade [manuscrito] / Julya Raquel Simoes Nascimento. – 2022.
83 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientadora: Profa. Dra. Paula Rocha Moreira.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.
1. Biologia Celular. 2. Obesidade Pediátrica. 3. Polimorfismo Genético. 4. Metilação de DNA. 5. Interleucina-6. I. Moreira, Paula Rocha. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Mestrado DE JULYA RAQUEL SIMOES NASCIMENTO

Às **quatorze horas** do dia **22 de dezembro de 2022**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**POLIMORFISMO GENÉTICO, METILAÇÃO E EXPRESSÃO DO GENE IL6 EM CRIANÇAS OBESAS**", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Paula Rocha Moreira**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Luiz Paulo Carvalho Rocha	UNA	Aprovada
Dra. Marina Chaves de Oliveira	UFMG	Aprovada

Pelas indicações, a candidata foi considerada: **APROVADA**

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 22 de dezembro de 2022.**

Dr. Luiz Paulo Carvalho Rocha

Dra. Marina Chaves de Oliveira

Dra. Paula Rocha Moreira

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador



Documento assinado eletronicamente por **Marina Chaves de Oliveira, Professora do Magistério Superior**, em 26/12/2022, às 11:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Paulo Carvalho Rocha, Usuário Externo**, em 26/12/2022, às 12:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida, Professora do Magistério Superior**, em 26/12/2022, às 22:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paula Rocha Moreira, Professora do Magistério Superior**, em 27/12/2022, às 12:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1990493** e o código CRC **3DF3712F**.

Dedico esse trabalho à ciência.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Paula Rocha, pela orientação, sensibilidade, competência e dedicação tão importantes. Foram incontáveis os momentos que o seu direcionamento me estimulou e me acalmou diante de cada obstáculo do mestrado, visto às dificuldades inerentes à pesquisa e o período conturbado do Brasil. Obrigada por acreditar em mim e pelos tantos elogios e incentivos. Tenho certeza que não chegaria neste ponto sem o seu apoio.

Aos meus pais William e Symone, pela paciência, amor incondicional, apoio mental e financeiro. Ser pesquisadora no Brasil é um ato de coragem e vocação, um propósito muitas vezes incompreendido e desacreditado. Obrigada por compartilharem essa conquista comigo.

À minha melhor amiga e irmã Alyne, pelo aconselhamento e lealdade. Você sempre acreditou em mim e nos meus objetivos, me ajudou em todos os momentos necessários e, igualmente, nos desnecessários. Você é parte dessa vitória.

Aos amigos do laboratório LABIC, pelos ensinamentos, gentilezas e contribuições ao meu trabalho. Em especial, ao Me. Rafael Silva, pela generosidade e assistência durante minha formação como cientista. Você sempre será um exemplo para mim.

Finalmente, aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Luiz Paulo e Profa. Dra. Marina de Oliveira, que tão gentilmente aceitaram participar e colaborar com esta dissertação.

RESUMO

A obesidade é uma doença comum, complexa e não maligna que se desenvolve devido a interações entre os genes e o meio ambiente. O aumento do tamanho celular (hipertrofia) altera o funcionamento do tecido adiposo, a secreção e a sensibilidade a moléculas sinalizadoras, como fatores inflamatórios e hormonais. Dentre os fatores inflamatórios secretados, destaca-se a Interleucina-6 (IL-6), importante citocina pleiotrópica atuante na imunidade, hematopoiese, sensibilidade à insulina e homeostase energética. A modulação da expressão do gene *IL6* é resultado de modificações genômicas, como os polimorfismos genéticos, e mecanismos epigenéticos. O polimorfismo rs1800795 é o mais comumente estudado no gene *IL6*, encontra-se na posição -174 da região promotora do gene e caracteriza-se pela troca de um G (guanina) por um C (citossina). Esse polimorfismo associa-se ao desenvolvimento de DM2 e obesidade. A metilação do DNA é uma modificação epigenética envolvida na regulação da expressão gênica, geralmente via silenciamento gênico, o que contribui para os riscos de muitas doenças multifatoriais, como DM2, doenças cardiovasculares e obesidade. Este estudo tem como objetivo avaliar a ocorrência do polimorfismo rs1800795, o padrão de metilação e a expressão do gene *IL-6* e associá-los aos parâmetros clínicos e antropométricos de crianças brasileiras com obesidade e eutrofia. Os parâmetros bioquímicos (glicemia em jejum, HDL, LDL e insulina) foram avaliados no soro através de ensaio enzimático colorimétrico. A avaliação do polimorfismo rs1800795 foi feita pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), seguida de tratamento com enzima de restrição. A metilação de DNA na região promotora do gene *IL6* foi analisada pela técnica de PCR metilação-específica (MSP). A expressão de *IL-6* foi avaliada por citometria de fluxo. As frequências dos genótipos e alelos referentes ao polimorfismo genético rs1800795 não diferiram entre os grupos. A presença do alelo C associou-se com o aumento da GJ e diminuição da Circ.C no grupo com obesidade, e aumento da insulina no grupo controle. As análises de MSP detectaram a perda da metilação no gene *IL6* em crianças com obesidade, e este resultado correlacionou com os níveis de GJ. O percentual de células expressando *IL-6* estava aumentado no grupo com obesidade e correlacionado aos níveis de GJ, HDL e Circ.C. Em

conjunto, os resultados sugerem um papel relevante de IL-6 na obesidade infantil, assim como dos mecanismos relacionados à sua transcrição gênica.

Palavras chave: obesidade infantil, polimorfismo genético, metilação DNA, Interleucina-6.

ABSTRACT

Obesity is a common, complex, non-malignant disease that develops due to interactions between genes and the environment. The increase in cell size (hypertrophy) alters the functioning of adipose tissue, secretion and sensitivity to signaling molecules, such as inflammatory and hormonal factors. Among the secreted inflammatory factors, Interleukin-6 (IL-6) stands out, an important pleiotropic cytokine active in immunity, hematopoiesis, insulin sensitivity and energy homeostasis. Modulation of IL6 gene expression is the result of genomic modifications, such as genetic polymorphisms, and epigenetic mechanisms. The rs1800795 polymorphism is the most commonly studied in the IL6 gene, it is found at position -174 of the promoter region of the gene and is characterized by the exchange of a G (guanine) for a C (cytosine). This polymorphism is associated with the development of DM2 and obesity. DNA methylation is an epigenetic modification involved in the regulation of gene expression, usually via gene silencing, which contributes to the risks of many multifactorial diseases such as T2DM, cardiovascular disease and obesity. This study aims to evaluate the occurrence of the rs1800795 polymorphism, the methylation pattern and the expression of the IL-6 gene and associate them with the clinical and anthropometric parameters of Brazilian children with obesity and eutrophy. Biochemical parameters (fasting blood glucose, HDL, LDL and insulin) were evaluated in serum using a colorimetric enzymatic assay. The rs1800795 polymorphism was evaluated using the polymerase chain reaction (PCR) technique, followed by restriction enzyme treatment. DNA methylation in the promoter region of the IL6 gene was analyzed by the methylation-specific PCR (MSP) technique. IL-6 expression was assessed by flow cytometry. The frequencies of genotypes and alleles related to the genetic polymorphism rs1800795 did not differ between groups. The presence of the C allele was associated with increased fasting glucose and decreased waist circumference in the obese group, and increased insulin in the control group. MSP analyzes detected loss of methylation in the IL6 gene in children with obesity, and this result correlated with fasting glucose levels. The percentage of cells expressing IL-6 was increased in the obese group and correlated with levels of fasting glucose, HDL

and waist circumference. Together, the results suggest a relevant role for IL-6 in childhood obesity, as well as mechanisms related to its gene transcription.

Keywords: childhood obesity, genetic polymorphism, DNA methylation, Interleukin-6.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Iniciadores de inflamação associada à obesidade em adipócitos	20
Figura 2: Via de sinalização da citocina IL-6	255
Figura 3: Representação da região promotora do <i>gene IL6</i> e seus fatores de transcrição.....	29
Figura 4: Método de análise das citocinas expressas pelos leucócitos.....	38
Figura 5: Representação dos genótipos para o polimorfismo genético -174 (G/C) IL6 após digestão com enzima HspII.....	40
Figura 6: Representação dos diagnósticos sobre os status de metilação das amostras.....	41
Figura 7: Análise semi-quantitativa da metilação no gene da citocina IL6 na obesidade infantil.....	48
Figura 8: Frequência de células expressando IL-6 no sangue periférico de crianças dos grupos obeso e controle.....	49
Figura 9: Análise de correlação entre as frequência de células expressando IL-6 e os genótipos do SNP rs1800795.....	50
Figura 10: Análise de correlação entre as frequência de células expressando IL-6 e os %metilação do gene <i>IL6</i>	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Características clínicas e bioquímicas dos indivíduo.....	43
Tabela 2:Frequências dos genótipos e alelos referentes ao polimorfismo IL-6 G/C na posição – 174 nos grupos controle e obeso	44
Tabela 3: Frequência dos genótipos C+ versus genótipo C- para o polimorfismo IL6 G/C na posição –174.....	44
Tabela 4: Associação entre as medidas antropométricas e parâmetros laboratoriais com genótipos C+ e C- do polimorfismo <i>IL6</i> G/C nos grupos estudados.....	46
Tabela 5: Associação entre as medidas antropométricas e parâmetros laboratoriais entre genótipos GG, GC e CC do polimorfismo <i>IL6</i> G/C nos grupos	46
Tabela 6: Resultado qualitativo da técnica de MSP para o gene <i>IL6</i>	48
Tabela 7: Correlação entre parâmetros bioquímicos e metilação semi-quantitativa de IL-6	49
Tabela 8: Correlação entre parâmetros clínicos e bioquímicos com a % frequência de células expressando IL-6.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS

AP-1: *Activating protein-1*

AMPK: *Activated protein kinase* – Proteína quinase ativada por AMP

BIA: Bioelectrical Impedance Analysis - Bioimpedância elétrica

C: Citosina

C+: presença do alelo C

C -: ausência do alelo C

CDC: *Center for Disease Control and Prevention* – Centro de Controle e Prevenção de Doenças

Circ.C.: Circunferência de Cintura

CT: Colesterol Total

DAMP: Padrões associados à danos moleculares

DM2: Diabetes Mellitus tipo 2

ECM: Matriz Extracelular

EDTA: *Ethylenediamine tetraacetic acid* – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

FFAs- *Free Fatty Acids* – Ácidos Graxos Livres

G: Guanina

GJ: Glicemia de Jejum

Glut4: Transportador de Glicose tipo 4

GP130: *Glycoprotein 130* – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

GWAS: Genome Wide Association Studies

HDL: *High Density Lipoprotein* – Lipoproteína de alta densidade

Hsp11: Enzima de Restrição

IDF- *International Diabetes Federation*

IL-1: Interleucina- 1

IL-4: Interleucina- 4

IL-6: Interleucina- 6

IL-8: Interleucina- 8

IL-10: Interleucina- 10

IL-6R: Receptor de Interleucina-6

IL1Ra: interleucina 1 ra

IMC: Índice de Massa Corporal

LPS: Lipopolissacarídeo

MCP-1: *Monocyte Chemoattractant Protein- 1* – Proteína quimiotóxica de monócitos

mbIL-6R: Membrane-bound IL-6 receptor

mRNA : Ácido ribonucléico mensageiro

NFκB: Fator Nuclear κ-B

NLR: *NOD-like Receptor* – Receptores similares ao domínio de oligomerização ligante de nucleotídeo

PBEF1: *Pre-B-cell colony-enhancing factor 1* – Visfatina

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinase

POF: Pesquisa de Orçamento Familiar

RBP4: Proteína ligante de retinol 4

SM: Síndrome Metabólica

SNP: *Single Nucleotide Polymorphism* – Polimorfismo de Nucleotídeo Único

SOCS3: Supressor da Sinalização de Citocina 3

STAT3: *Signal transducers and activators of transcription* – Fatores de transcrição ativados por tirosinas

TGF- β – Fator de transformação do crescimento beta 1

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral Alfa

TLR – Receptor do tipo toll

TRIG: Triglicerídeos

UCPs: *Uncoupling Proteins* – Proteínas Desacopladoras

VLDL: *Very-Low-Density Lipoprotein* – Lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Obesidade infantil	19
1.2 Patogênese da obesidade	22
1.3 Repercussões sistêmicas da obesidade	24
1.4 Interleucina 6 (IL-6).....	26
1.5 Polimorfismo genético e a IL-6	28
1.6 Metilação e a IL-6	30
2 OBJETIVOS	35
2.1 - Objetivo Geral.....	35
2.2- Objetivos Específicos	35
3 METODOLOGIA.....	36
3.1 Seleção amostral	36
3.2 Coleta de amostras.....	37
3.3 Determinação dos parâmetros bioquímicos.....	37
3.4 Citometria de fluxo do sangue periférico.....	38
3.5 Extração do DNA	39
3.6 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	39
3.7 Tratamento com bissulfito de sódio	40
3.8 PCR metilação-específica (MSP).....	40
3.9 Avaliação da metilação qualitativa e semi-quantitativa	41
3.10 Análise estatística	42
4 RESULTADOS	43
4.1 Características dos Indivíduos	43
4.2 Estudo genotípico	44
4.3 Associação do Polimorfismo genético <i>IL6</i> (G/C) na posição -174 com parâmetros clínicos e bioquímicos dos indivíduos	45
4.4 Metilação do gene <i>IL6</i>	46
4.5 Correlação da metilação de IL-6 com parâmetros clínicos e bioquímicos dos indivíduos	48
4.6 Níveis de células expressando IL-6	49

4.7 Correlações das frequências de células expressando IL-6 com parâmetros clínicos e bioquímicos dos indivíduos.....	50
5 DISCUSSÃO	52
6 CONCLUSÃO.....	62
REFERÊNCIAS	63

1- INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade infantil

A obesidade é uma doença comum, complexa, não maligna e se desenvolve devido às interações entre os genes e o meio ambiente. A condição é resultado da hiperalimentação e redução das atividades físicas, que provoca desequilíbrio no balanço energético (NOROUZIRAD *et al*, 2017; KUMAR, 2019). Apesar de ser resultado desse desequilíbrio, sua etiologia é multifatorial. Mudanças socioculturais e ambientais, alterações endócrinas, predisposição genética e fatores epigenéticos contribuem para o desenvolvimento da obesidade (VAN DIJK, 2015). Na infância, a obesidade também é um obstáculo ao redor do mundo, com a prevalência aumentando drasticamente nas últimas décadas (FERREIRA *et al*, 2021). O último inquérito populacional realizado no Brasil em 2008-2009, observou que 17% dos meninos e 12% das meninas de até 10 anos apresentavam obesidade, prevalência maior que o observado nas décadas de 1980 e 1990 (POF).

A oferta de alimentos ultraprocessados com menor preço e facilidade de acesso, influência as preferências alimentares na infância, do mesmo modo que favorece o desenvolvimento da obesidade infantil. Nas últimas décadas, os hábitos alimentares da população brasileira sofreram mudanças, caracterizadas, sobretudo, pela substituição de alimentos *in natura* por processados e ultraprocessados, sendo introduzidos precocemente nos primeiros anos de vida (GIESTA, 2019).

Alimentos ultraprocessados são produtos prontos para consumo compostos essencialmente de substâncias proveniente dos alimentos, como óleos, gorduras, açúcar e proteínas; ou sintetizadas, como corantes, aromatizantes, intensificadores de sabor e outros aditivos usados para alterar as propriedades sensoriais dos alimentos (LOUZADA, 2015). Análises de pesquisas de orçamento familiar apontam uma predisposição do aumento do consumo de alimentos ultraprocessados, principalmente em países de renda baixa e média, como o Brasil (LOUZADA, 2015). Um estudo transversal com dados obtidos do módulo sobre consumo alimentar de indivíduos da Pesquisa

de Orçamentos Familiares 20//08-2009, mostrou que o consumo energético médio diário dos brasileiros com dez anos ou mais foi de 1.866 kcal, sendo 69,5% pelo consumo de alimentos in natura ou minimamente processados, 9,0% de alimentos processados e 21,5% de alimentos ultraprocessados (LOUZADA, 2015). Estes resultados indicam que a dieta da população brasileira supera as recomendações de consumo de densidade energética, proteína, açúcar livre, gordura trans e sódio e é insuficiente em fibras e potássio (LOUZADA, 2015). Ademais, o consumo excessivo de alimentos ultraprocessados nas últimas décadas provocou o declínio na ingestão de frutas e hortaliças, fontes primordiais de vitaminas, fibras, compostos bioativos e baixa densidade energética, fazendo com que o seu consumo seja um fator protetor para comorbidades (diabetes, doenças cardiovasculares, hipertensão e alguns cânceres) e morbidade (CANELLA, 2018) Segundo a POF, apenas 35% das crianças e adolescente consomem regularmente hortaliças, enquanto a ingestão de guloseimas (41,3%) é superior, e o de biscoitos doce (32,5%) e salgados (35,1%) e para os refrigerantes (33,2%) é semelhante (CANELLA, 2018).

Contudo, dado a sua etiologia multifatorial, outros agentes devem ser destacados no desenvolvimento da obesidade. Fatores hereditários parecem contribuir com mais de 50% da variância ajustada para idade, sexo e gordura corporal total (BOUCHARD, 1997). Em 2014, um trabalho que estimou a herdabilidade do IMC, relatou que crianças com sobrepeso eram mais propensas a se tornarem obesas se tivessem um dos pais obesos (SCHUSTER et al, 2014). Estudos de associação do genoma humano em larga escala (GWASs) identificaram cerca de 250 loci genômicos e 123 genes humanos associados ao IMC e suscetibilidade à obesidade (LOCKE et al, 2015; TURCOT et al, 2018). Ademais, também foram encontrados 300 polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) relacionados ao IMC e adiposidade, capazes de influenciar percepções de fome e saciedade, ingesta alimentar e acúmulo de tecido adiposo, em adultos e crianças (GOODARZI, 2018; CHOQUET; MEYRE, 2011). Contribuindo para os estudos de abordagem genética, a literatura também destaca o papel de fatores epigenéticos no desenvolvimento da obesidade (DRUMMOND; GIBNEY, 2013; CHANG; NEU, 2011).

1.2 Patogênese da obesidade

Até pouco mais de duas décadas, o tecido adiposo (TA) era considerado um reservatório passivo de energia, contudo, após investigações mais criteriosas sobre o órgão, essa classificação tradicional está em desuso. Em 1987, pesquisadores de OXFORD classificaram o TA como o principal local para o metabolismo de esteroides sexuais (SITTERI, 1987). Anos depois, em 1994, um estudo inédito demonstrou que o TA secreta hormônios, as adipocinas, capazes de levar informações da periferia do corpo ao sistema nervoso central (ZHANG, 1994). A partir de então, o TA deixou de ser considerado um tecido de armazenamento inerte e passou a ser denominado como um órgão endócrino.

Os adipócitos, células do TA, sintetizam e liberam inúmeras moléculas peptídicas e não peptídicas, como adiponectina, resistina, Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6), com funções reguladoras no balanço energético e alimentar, nos metabolismos de glicose e lipídeos, imunidade, termogênese, função cardiovascular e resposta inflamatória, que atuam de forma endócrina, parácrina e autócrina (FROY, 2018).

A primeira correlação molecular entre obesidade e inflamação foi descrita na década de 90. No estudo, o TNF- α , citocina inflamatória e multifuncional que exerce uma infinidade de ações biológicas em diferentes tecidos e espécies, estava super expressa em roedores obesos e diabéticos, ademais, a neutralização da citocina potencializou a captação de glicose em resposta à insulina (HOTAMISLIGIL et al, 1993). Poucos anos depois, estas observações foram descritas em humanos (HOTAMISLIGIL et al, 1995), pontuando o início da série de estudos que corroboram a íntima relação entre obesidade, resistência à insulina (RI) e diabetes tipo 2 (DM2) à inflamação crônica, caracterizada pela expressão alterada de citocinas, aumento de moléculas de fase aguda e ativação de vias de sinalização inflamatória (PICKUP, 2004).

A resposta inflamatória durante a obesidade tem origem no TA hipertrofiado (Figura 1), caracterizada por uma sinalização local, sistêmica, atenuada e prolongada. Iniciada pela lesão tecidual, fibrose, infiltração de células do sistema imune, principalmente neutrófilos, eosinófilos e macrófagos; e sinais clássicos de Celsus imperceptíveis (LUMENG, 2011). Assim como na inflamação aguda decorrente de lesão ou infecção, as respostas fisiopatológicas da inflamação

crônica de baixo grau são desencadeadas por Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) e Padrões Moleculares Associados a Danos (DAMPs), ambos reconhecidos pelos Receptores de Reconhecimento de Padrões (PPRs), presentes em células da imunidade inata. E quando ativados, este grupo celular expressa citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos em resposta às perturbações teciduais (REILLY; SALTIEL, 2017).

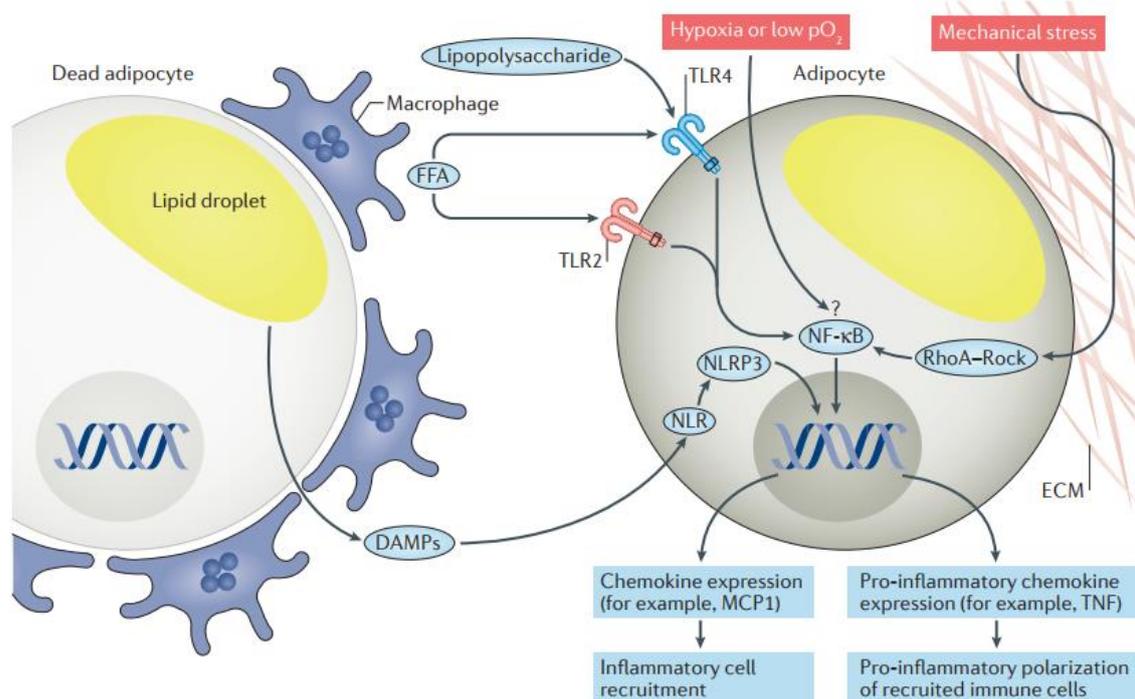


Figura 1 Iniciadores da inflamação associada à obesidade. Lipopolissacarídeos derivados do intestino estimulam vias inflamatórias ao interagir com o Toll-like receptor-4 (TLR4), um tipo de PPRs presente na membrana dos adipócitos. Do mesmo modo, *Free Fatty Acids* (FFAs) ativam a sinalização inflamatória através de TLR4 e TLR2. A ativação de NOD-like receptor (NLRs) por DAMPs de adipócitos danificados, resultado da incapacidade celular em suportar o aumento dos estoques de gordura intracelular. Angiogênese insuficiente e hipoxia tecidual provocam danos ou necrose do adipócito, que desencadeiam o recrutamento de células imunes ao local através da formação de DAMPs, capazes de ativar TLR4 e NOD. Finalmente, o estresse mecânico causado pela expansão do tecido adiposo através da matriz extracelular (ECM) é percebido pelo mecanismo RhoA–Rock, que leva à inflamação. Em conjuntos, essas vias ativam o fator de transcrição NF-κB, envolvido na sinalização inflamatória de todos esses potenciais iniciadores de inflamação do adipócito em indivíduos com obesidade. O resultado é a expressão de moléculas inflamatórias como quimiocinas, citocinas como TNF e IL-6, que juntas promovem a inflamação crônica de baixo grau no tecido (adaptado de REILLY; SALTIEL, 2017).

Durante o ganho de peso, o TA sofre modificações estruturais e funcionais que possivelmente explicam o acionamento do sistema imune (LIMA et al., 2021). A hipertrofia (aumento em tamanho das células) e hiperplasia (aumento do

número de células) dos adipócitos são os mecanismos que permitem a expansão do tecido frente à necessidade de estocar excessos energéticos (JO et al, 2009). Na obesidade observa-se a predominância do crescimento hipertrófico (LIMA, 2019) fator contribuinte para a hipóxia da massa de gordura, decorrente da ineficácia da angiogênese de acompanhar o crescimento desse tecido; a presença de ácidos graxos livres (AGLs) oriundos da dieta ou da lipólise acentuada do tecido adiposo; o estresse mecânico devido ao aumento de proteínas de matriz extracelular que leva a fibrose e morte do adipócito; a disbiose, que aumenta permeabilidade intestinal permitindo a passagem de lipopolissacarídeos (LPS) para a corrente sanguínea, identificados como PAMPs; a geração de DAMPS e o estresse do retículo endoplasmático (REILLY; SALTIEL, 2017). Juntos, estes gatilhos perpetuam a inflamação e alteram o perfil das células residentes do TA.

Entre as alterações na fração vascular estromal decorrentes da obesidade, a dos macrófagos é a mais estudada (HILDRETH et al, 2021). Macrófagos são células imunes residentes em diversos tecidos que atuam como sentinelas imunes e, também, são responsáveis por garantir a integridade e a funcionalidade dos tecidos (WCULEK et al, 2022). Eles apresentam uma heterogeneidade na função dependente dos estímulos locais, pois são capazes de moldar suas propriedades e estado de ativação a fim de adaptar-se ao ambiente que está inserido. Portanto, a depender dos estímulos, são expressos padrões distintos de citocinas, quimiocinas, marcadores de superfície e enzimas metabólicas, alterando completamente sua função (GORDON; TAYLOR, 2005). No contexto da obesidade, os macrófagos deixam de exibir características anti-inflamatórias (M2) e assumem um perfil inflamatório, denominado M1.

Macrófagos M2 são ativados alternativamente, em resposta às interleucinas IL-4 ou IL-13, frequentemente secretadas por eosinófilos (YING et al, 2020). Este fenótipo é abundante no tecido adiposo de indivíduos magros, responsável pelo aumento da respiração mitocondrial, produção de citocinas anti-inflamatórias e alta expressão de arginase-1, enzima que inibe a produção de óxido nítrico (MILLS, 2012). Em sua superfície, eles exibem os marcadores CD301, CD206, receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR γ) e o antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra), essencial para a modulação da resposta inflamatória e sensibilidade à insulina (RÓSZER, 2015; WCULEK et al, 2022). Assim, os

macrófagos M2 mantêm a funcionalidade dos adipócitos, promovendo reparo tecidual e angiogênese no TA (LUMENG et al, 2007).

Com o aumento da adiposidade, os macrófagos se acumulam no TA em razão da infiltração de monócitos da periferia e proliferação local de macrófagos residentes do tecido (MOGHBELI et al, 2021; XU et al, 2003; SILVA, 2019), onde adotam um perfil inflamatório M1. Resposta ao crescimento hipertrófico dos adipócitos, diminuição do suprimento sanguíneo, hipóxia e necrose tecidual. (MOGHBELI et al, 2021; WEISBERG et al, 2003). Macrófagos M1 são ativados classicamente, através do estímulo dos TLRs por LPS e/ou citocinas como o interferon gama (IFN- γ) (WCULEK, 2022). Este fenótipo é caracterizado pelo metabolismo glicolítico, expressão da óxido nítrico sintase (iNOS) e produção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β e IL-6 (HARRY; LINCH, 2019). Este acúmulo de macrófagos M1, induzido pela obesidade, é altamente correlacionado com o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias e a consequente resistência à insulina, em vários modelos de camundongos (WEISBERG et al, 2003; MCCURDY et al, 2012).

Ademais, a expressão alterada de citocinas contribui para a expansão da inflamação, ao estimular e potencializar a ativação de pré-adipócitos e o recrutamento de células imunes periféricas para o TA (WEISBERG et al, 2003). TNF- α , IL-1, IL-6, IL-7, IL-11, IL-15 e MCP-1 atraem células imunes para o tecido adiposo e amplificam sinais prejudiciais à resolução da inflamação (BORISH et al, 2003). Este feedback positivo entre os eventos predispõe à inflamação sistêmica de baixo grau, fator desencadeante para a patogênese das morbidades relacionadas à obesidade (EMANUELA et al, 2012).

1.3 Repercussões sistêmicas da obesidade

A inflamação crônica de baixo grau associada à obesidade exerce um papel causal na patogênese de morbidades em diferentes órgãos, ao conduzir atividades inflamatórias e apoptóticas em tecidos não adiposos (TRELAKIS et al, 2012). Apesar da concentração de esforços no ambiente inflamatório do TA, estudos com direcionamento sistêmico evidenciam uma ativação imunológica geral, associada a alterações em metabolismos de diferentes tecidos, como o ósseo, hepático, intestinal e cardiovascular (FAIENZA et al, 2020; ARON-

WISNEWSKY et al, 2021; MILANESCHI et al, 2019; GKASTARIS et al, 2020). Shah e colaboradores demonstraram que a infiltração de neutrófilos em vasos e a inflamação vascular correlaciona-se com o IMC e pressão arterial, em humanos (SHAH et al, 2010). Em crianças e adolescentes as repercussões imunológicas parecem coincidir. Neste estudo recente, a contagem absoluta de neutrófilos circulantes foi significativamente maior no grupo com obesidade (GÁLLEGO-SUÁREZ et al, 2020). Nayara e colaboradores observaram a expressão elevada de TLR-4 (CD284) e HLA-DR em neutrófilos de crianças com obesidade, bem como o aumento da expressão IL-6, IL-1 β , IL-12 e TNF- α (MEDEIROS et al, 2018). Certamente, o acúmulo e hiperatividade de neutrófilos na circulação aumentam a extensão da inflamação sistêmica provocada pela obesidade.

Ainda em crianças, IMC e percentual de gordura associou positivamente com a contagem total de leucócitos, neutrófilos, monócitos, linfócitos T totais e células THelper (CD4 +) (ZALDIVAR et al, 2006). Corroborando com o achado, outras investigações revelaram não só proliferação aumentada de linfócitos e leucócitos, em crianças e adolescentes com sobrepeso/obesidade (GÁLLEGO-SUÁREZ et al, 2020; MĂRGINEAN et al, 2020; CHANDRA, KUTTY, 1980), mas também o possível prejuízo funcional ou o comprometimento com linhagens inflamatórias (STALLONE, 1994; NIEMAN et al., 1999; MATTOS et al, 2016). Ainda em crianças com obesidade, monócitos clássicos (CD14 ++ CD16) e não clássicos (CD14 + CD16 ++) são mais expressos e secretam citocinas com perfil inflamatório. Apesar do tipo não clássico ser atrelado à subpopulação de macrófagos M2 com funções reguladoras da inflamação (MATTOS et al, 2016).

Decerto, a obesidade é acompanhada da leucocitose, principalmente de linhagem mieloide, como monócitos, neutrófilos e subtipos de linfócitos circulantes (ZALDIVAR et al, 2006; KEUSTERMANS et al., 2017; NAGAREDDY et al, 2014); servindo, inclusive, como biomarcador de risco para doenças associadas à obesidade, como diabetes, doenças cardiovasculares e câncer (CANNON et al, 2001 YARNELL et al, 2004; GRIMM; NEATON; LUDWIG, 1985). Panorama mimetizado em crianças e adolescente (SKINNER et al, 2010). Contudo, os mecanismos subjacentes pelos quais a obesidade desencadeia a leucocitose periférica ainda são escopo para investigações. Mas, dado a infiltração exacerbada de células imunes no TA obeso, alguns trabalhos destacaram o

recrutamento imunológico como o possível agente de proliferação celular do sistema imune em outros tecidos (YU et al, 2019).

Em modelo animal, constatou-se que o tecido adiposo visceral cronicamente inflamado resulta na liberação de mediadores proliferativos de células hematopoiéticas, que atuam na medula óssea (MO), sinalizando a expansão do tecido e produção de células mieloides (NAGAREDDY et al, 2014). Neste caso, a expressão de receptores TLR4 no TA é crucial para a ativação da via MyD88, cujo produto é a IL-1 β , que atua diretamente na MO (NAGAREDDY et al, 2014). Além disso, sinais sistêmicos são capazes de impulsionar a expansão das células troncos. A hiperglicemia associada ao diabetes também foi identificada como um sinal potencial para o aumento da produção de células mieloides na MO, bem como o aumento de LPS circulante e de AGLs em tecidos não adiposos (NAGAREDDY et al, 2013; TRELAKIS et al, 2012). Nessa teia de gatilhos, também estão citocinas que medeiam a conversa com a MO, como a IL-6, proteína super expressa na obesidade com papel regulador da resposta de fase aguda e alterações hematológicas associadas à obesidade em camundongos (PINI et al, 2011).

1.4 Interleucina 6 (IL-6)

A IL-6 é uma citocina imunomoduladora multifuncional envolvida em respostas inflamatórias iniciadas por infecções ou lesões, regulação de processos metabólicos, regenerativos e neurais (GARBERS et al., 2018; SCHELLER et al., 2011). Seus principais produtores são monócitos e macrófagos, mas células T, células B, hepatócitos, células endoteliais células, fibroblastos, queratinócitos, células mesangiais, adipócitos e células tumorais também expressam IL-6 constitutivamente ou após estimulação (CHALARIS et al., 2011).

O primeiro relato sobre a IL-6 é datado de 1976, realizado pelo grupo Kishimoto (KISHIMOTO E ISHIZAKA, 1976). Inicialmente, ela foi denominada como fator estimulador de células B 2 (BSF-2), devido ao seu papel na diferenciação de células B, produtoras de anticorpos (HIRANO et al., 1986). Somente após a clonagem do BSF-2, junto do fator estimulador de hepatócitos e do fator de crescimento de plasmocitomas, observou-se a similaridade entre as moléculas e assim foram definidas como IL-6 (SEHGAL et al., 1989).

Composta por 184 aminoácidos glicosilados, dispostos em uma estrutura de feixe em quatro hélices com três sítios de ligação, esta citocina é capaz de interagir com as moléculas IL-6R e sIL-6R e, posteriormente, à gp130 para formar o complexo receptor de IL-6 e ativar cascatas de sinalização intracelulares diferentes (Figura 2) (SCHELLER et al., 2011).

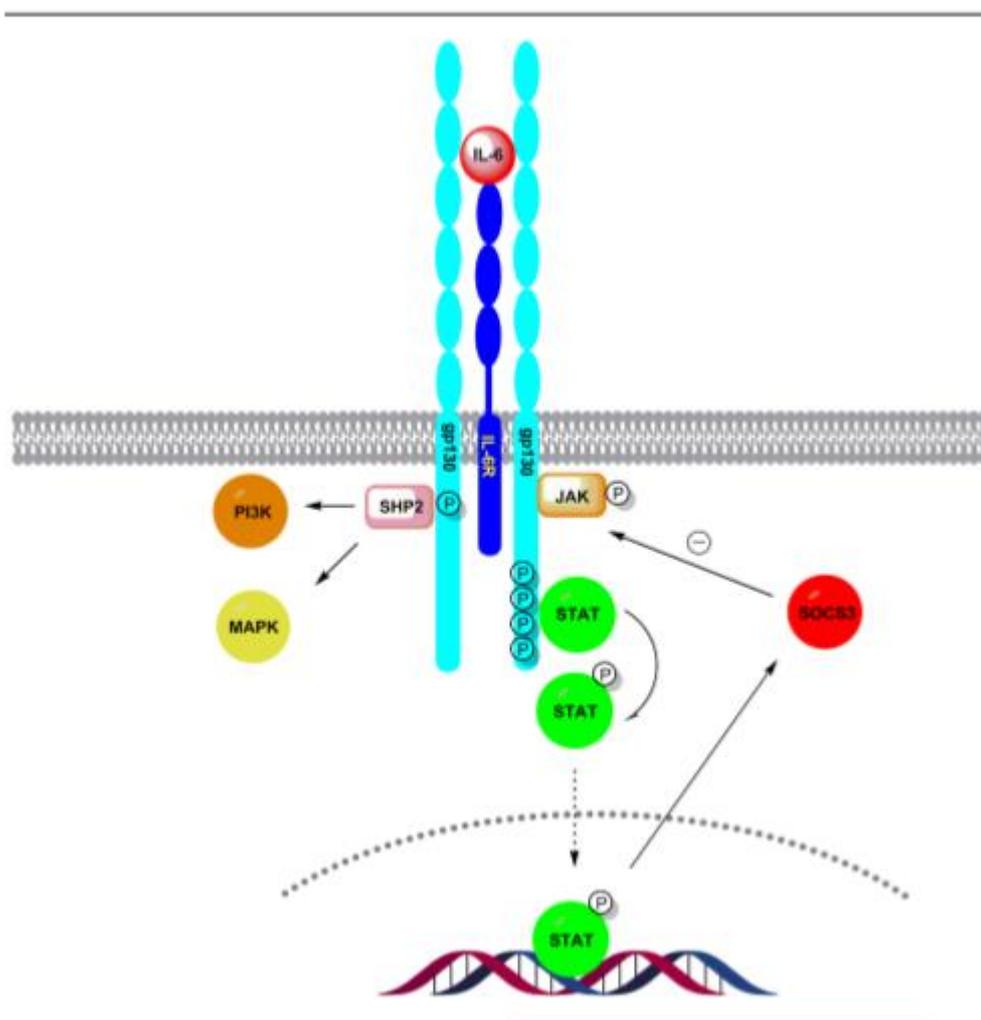


Figura 2: Via de sinalização da citocina IL-6. A formação do complexo IL-6/ IL-6R/ gp130 induz a autofosforilação e a ativação das cinases JAK, associadas ao gp130. Com isso, ocorre fosforilação de resíduos de tirosina em gp130, levando ao recrutamento de SHP2 e conseqüente estimulação e ativação de MAPK e PI3K. A fosforilação de tirosinas também recruta, fosforila e transloca STATs para o núcleo. No núcleo celular, a STATs se liga ao DNA e induz a expressão de genes como as proteínas de fase aguda e de SOCS3. SOCS3 inibe JAKs, atuando como regulador negativo das vias de sinalização associadas ao gp130 (adaptado de AKBARI; HASSAN-ZADEH, 2018).

A interação da molécula de IL-6 com a célula alvo, depende da expressão trans-membranar do receptor IL-6R (mIL-6R, CD126), é denominada sinalização clássica, presente em hepatócitos, alguns leucócitos e células epiteliais (BARAN et al., 2018; GARBERS et al., 2018). Entretanto, em razão da incapacidade deste

receptor membranar em transduzir sinais, IL-6/IL-6R forma um complexo receptor com o co-receptor transdutor de sinal gp130, que dimeriza e inicia a sinalização intracelular através da ativação de JAK e subsequente fosforilação de resíduos de tirosina em sua porção citoplasmática, capazes de ativar vias de transdução de sinal, como a JAK/STAT, ERK, MAPK e PI3K (SCHELLER et al., 2011). Alguns estudos propõem que este modelo de sinalização ativa vias anti-inflamatórias que resultam na expressão de IL-10 e prostaglandinas E2 (AKBARI; HASSAN-ZADEH, 2018; ROSE-JOHN, 2012)

Além do IL-6R ligado à membrana, uma forma solúvel de IL-6R (sIL-6R) é produzida através da clivagem proteolítica do mL-6R pela desintegrina e metaloprotease 17 (ADAM17) e, em menor grau, por splicing alternativo de mRNA (BARAN, et al, 2018; SCHELLER et al., 2011). A ligação de IL-6 ao sIL-6R possibilita a interação com gp130, formando o complexo receptor em células originalmente incapazes de responder à IL-6, devido à ausência do mL-6R, mas que apresentam constitutivamente o gp130 em sua superfície de membrana (ROSE-JOHN, 2012; GARBERS et al., 2018; BARAN, et al, 2018). A capacidade de interagir com células que não necessariamente expressam seu receptor de membrana, aumenta consideravelmente o espectro de células alvo da IL-6 e, também, dá origem às características pleiotrópicas e redundantes da citocina (SCHELLER et al., 2011).

Apesar de ativar vias intracelulares semelhantes à sinalização clássica, a trans sinalização controla principalmente respostas pró-inflamatórias, dado que o seu bloqueio beneficia uma variedade de modelos pré-clínicos de inflamação, doenças crônicas e autoimunes (ROSE-JOHN, 2017). Estudos das últimas décadas destacaram seu papel na regulação da expressão de moléculas de adesão em células endoteliais, controle do tráfego de linfócitos durante a inflamação aguda e crônica, regeneração hepatocelular e no desenvolvimento de doenças como diabetes, artrite reumatoide, peritonite e doenças inflamatórias intestinais (SCHELLER et al., 2011; SCHIRMACHER et al., 1998; CHEN et al., 2006; JONES, 2005). A trans sinalização precoce em células de tecidos inflamados suprime a atração de neutrófilos, aumentando a expressão de quimiocinas e moléculas de adesão para monócitos e células T, bem como a indução da diferenciação de células T em direção ao perfil TH 2 e TH 17 (HURST et al., 2001; JONES, 2005; HEINK et al., 2017). Quando bloqueada através um

fator solúvel (gp130Fc), previne o recrutamento de macrófagos induzido por dieta rica em lipídeos, embora não melhore os níveis de glicemia (KRAAKMAN et al., 2015). Estudos anteriores mostraram que indivíduos com obesidade apresentam maior concentração sérica de sIL-6R que indivíduos magros (KRAAKMAN et al., 2015). Além disso, a dieta rica em lipídeos parece aumentar as concentrações séricas de sIL-6R. Portanto, a forma solúvel do receptor de IL-6 pode tanto estimular a trans sinalização, quanto modular a inflamação crônica de baixo grau (AKBARI et al., 2018; KRAAKMAN et al., 2015).

Apesar do seu envolvimento em processos inflamatórios, a IL-6 também é reconhecida pelo seu papel no controle do metabolismo. Existe uma relação ambígua entre IL-6 e a regulação da glicose, pois o aumento da molécula de forma aguda melhora a captação de glicose (CAREY et al., 2006; PEDERSEN et al., 2007), enquanto cronicamente elevada, é um fator de risco para o desenvolvimento de DM2 (WANG et al., 2013). Nas últimas décadas, vários estudos mostraram níveis elevados de IL-6 circulante em pacientes infantis obesos (DEDOUSSIS et al., 2010; PÎRSEAN et al., 2019; MDEIROSS et al., 2018), bem como a correlação entre IMC e sensibilidade a insulina com os níveis circulantes da citocina, de forma semelhante a leptina (BASTARD et al, 2000; KERN et al, 2001). Esta íntima relação entre IL-6 e adiposidade corporal é explicada pela origem da sua produção. Estima-se que 15-35% da concentração total de IL-6 no sangue deriva do TA, assim sua produção aumenta de acordo com a expansão do tecido (MOHAMED-ALI et al., 1997; NISHIMOTO et al., 2004). A perda de peso através de dieta hipocalórica é acompanhada de reduções significativas nos níveis de IL-6 e leptina tanto no TA quanto no soro. Esse resultado sugere que, assim como para a leptina, as concentrações circulantes de IL-6 refletem, pelo menos em parte, a expansão do TA (BASTARD et al, 2000)

Os dois principais efeitos adversos do aumento da IL-6 na obesidade são a resistência à insulina (RI) e o aumento de complicações cardiovasculares (KERN et al, 2001; RIDKER et al, 2000; YESTE et al, 2007). O tratamento agudo com IL-6 aumenta a captação de glicose estimulada por insulina em humanos, assim como a translocação de GLUT4 para a membrana plasmática, que é um importante receptor para a entrada de glicose na célula, mediado por AMPK (CAREY et al., 2006). Mas o tratamento crônico induz a RI em células adiposas e prejudica o transporte de glicose (ROTTER et al., 2003), mostrando que a cronificação é um

problema. Inclusive, a administração crônica de IL-6 em indivíduos saudáveis é capaz de induzir o aumento da glicemia (TSIGOS et al., 1997). Um estudo envolvendo crianças e adolescentes caucasianas com obesidade (14 intolerantes à glicose, 91 tolerantes à glicose), detectou níveis plasmáticos de IL-6 significativamente maiores em pacientes obesos intolerantes à glicose quando comparados com pacientes obesos normotolerantes e sujeitos controle (YESTE et al, 2007). No sistema cardiovascular, a IL-6 parece estar envolvida em eventos formadores de placas de ateroma, bem como da produção de PCR hepática e inibição vasodilatação endotelial, fatores agravantes em doenças coronarianas (SACHECK, 2008; BHAGAT; VALLANCE, 1997).

De fato, a IL-6 é imprescindível no contexto da obesidade. Protocolos que investigaram o tratamento exógeno com doses relativamente altas de IL-6, detectaram o aumento agudo dos níveis circulantes de triglicerídeos e glicose (HOLMES et al., 2008). Paralelamente, o efeito do KO IL-6 também foi prejudicial, dado que os camundongos desenvolveram obesidade, metabolismo de carboidratos e lipídios perturbado, níveis aumentados de leptina e diminuição da capacidade de resposta ao tratamento com leptina (TSIGOS et al., 1997; NONOGAKI et al., 1995; WALLENIUS, 2002). Em adipócitos cultivados com IL-6, observou-se aumento da lipólise (PETERSEN et al., 2005). Contudo, os mecanismos nos quais a IL-6 modula o metabolismo não são totalmente elucidados, embora há algumas hipóteses avaliadas. Camundongos tratados com IL-6 apresentaram hipertrigliceridemia devido a secreção hepática de triglicerídeos independente de catecolaminas (NONOGAKI et al., 1995), assim como foi visto a participação da IL-6 na resistência à insulina ao prejudicar a fosforilação do receptor de insulina e do substrato-1 do receptor de insulina por meio da expressão de SOCS-3 (AKBARI; HASSAN-ZADEH, 2018).

1.5 Polimorfismo genético e a IL-6

A hereditariedade da obesidade infantil já foi observada e demonstrada. Há um risco quatro vezes maior do desenvolvimento dessa doença caso um dos pais seja obeso, e um risco 10 vezes maior se ambos os pais forem obesos (REILLY et al., 2005).

Estudos epidemiológicos moleculares apontam a associação de diferentes variações genômicas com o desenvolvimento da obesidade em crianças e adolescentes (YU et al., 2012; ZHAO et al., 2009). Através da *Genome Wide Association Studies* (GWAS), inúmeras mutações no DNA foram relacionadas à obesidade, incluindo polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) (RAO et al., 2014; CHAMBERS et al., 2012). Outro estudo realizado na Índia com 1.325 crianças, entre obesas e eutróficas, avaliou as variantes dos genes IL-6, LEPR e PBEF1. Mutações comuns nos genes estudados foram associadas a medidas quantitativas de adiposidade (peso, IMC e circunferência da cintura e do quadril), e mostraram promover maior susceptibilidade à obesidade e medidas de adiposidade (TABASSUM et al., 2012). Estas descobertas explicam, em parte, a predisposição genética à obesidade, uma vez que polimorfismos funcionais podem alterar a função e a expressão de genes associados ao consumo e gasto calórico (HU et al., 2018).

SNPs são a forma mais abundante de variação genética humana, definida pela troca de uma única base em um locus específico do DNA (ROCHA, 2007; MARTH et al., 1999). A região promotora do gene *IL6* exibe alguns SNPs comumente estudados, como os polimorfismos funcionais rs1800795 (-174 G/C) (Figura 3) (BOETA-LOPEZ et al., 2018).

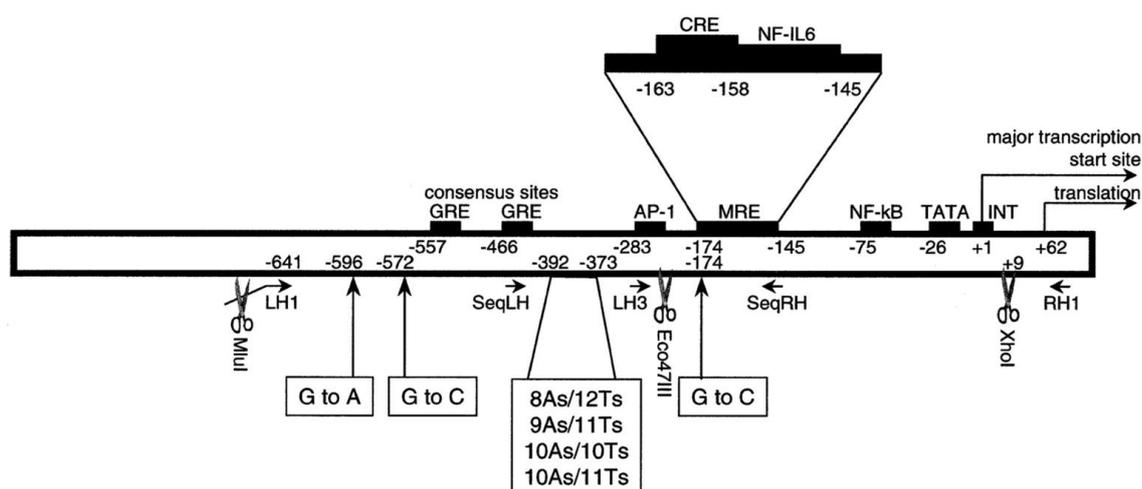


Figura 3: Representação da região promotora do gene *IL6* e seus fatores de transcrição. (adaptado de TERRY et al., 2003).

A troca do nucleotídeo guanina por citosina, no locus -174 da região promotora do gene da IL-6, é o principal alvo de pesquisas na obesidade. Uma única mudança de nucleotídeo nesta posição pode influenciar a expressão de IL-6,

ao interferir na ligação dos fatores de transcrição à região promotora e, conseqüentemente, inibir a transcrição do mRNA da citocina (TERRY et al., 2000 TCC, FISHMAN et al., 1998). Numerosas evidências associam o genótipo GG à maior expressão de IL-6, contudo há evidências que contestam essa afirmação (WERNSTEDT et al., 2014; FISHMAN et al., 1998; RIVERA-CHAVEZ et al., 2003; TODENDI et al., 2015; GARCÍA-CALZÓN et al., 2017). A partir das evidências do papel funcional da IL-6 nos distúrbios relacionados à obesidade e o papel funcional do SNP rs1800795, muitos estudos foram conduzidos a fim de elucidar a associação entre esses fatores.

O impacto do SNP rs1800795 na obesidade é assegurado por estudos em modelo animal e humano, em faixas etárias e etnias distintas. Um estudo polonês, conduzido com crianças de 10 a 17 anos, identificou a presença frequente do alelo C na região promotora do gene IL-6 no grupo obeso (POPKO et al., 2009). No Egito, um estudo com crianças de 9 a 18 anos apresentou resultado semelhante (IBRAHIM et al., 2017). Entre crianças romenas, o grupo obeso também estava mais associado ao alelo C (OANA et al., 2014). Mas, diferente do que é esperado, este alelo também apresentou uma característica mais protetora para o acúmulo de gordura na região abdominal em uma população polonesa na faixa etária de 10 a 18 anos (PYRZAK et al., 2009). O único estudo conduzido no Brasil, especificamente no Rio Grande do Sul, não encontrou associação entre o rs1800795 com adiposidade em crianças e adolescentes de origem germânica (TODENDI et al., 2015).

A perceptível escassez de dados sobre a influência dos polimorfismos de nucleotídeo único na obesidade infantil é um estímulo para investigar associações entre o SNP, bem como a relação com fenótipo e parâmetros bioquímicos de indivíduos obesos e eutróficos, visto a importância da IL-6 na patogênese da obesidade. A investigação do polimorfismo genético permitirá um melhor entendimento da doença e a identificação de marcadores de susceptibilidade.

1.6 Metilação e IL-6

O corpo humano é composto por um de células diversas, com o mesmo material genético, que se mantém através da intensa divisão celular sofrida pelo zigoto (INBAR-FEIGENBERG et al., 2013). A regulação da expressão gênica

explica este potencial de um mesmo genótipo originar fenótipos diferentes (DUNCAN et al., 2014). Mecanismos epigenéticos são marcas mitoticamente hereditárias capazes de alterar o fenótipo celular, através da regulação da expressão, sem comprometer a sequência nucleotídica do DNA. Entre os mecanismos que alteram a molécula de DNA, destacam-se a modificação de histona e alterações químicas nos nucleotídeos, como acilação, adenilação, fosforilação e a metilação. (MOROVVIK, 2021).

A metilação do DNA é uma modificação covalente, resultado da adição de um grupo metil no carbono 5 da base citosina (5mC), que ocorre predominantemente em citosinas que precedem as guaninas (CpG) (CANOVAS et al., 2017). É o mecanismo epigenético mais estudado, envolvido na regulação transcricional, diferenciação celular, silenciamento de elementos repetitivos do DNA, imprinting genômico e inativação do cromossomo X (MOORE et al., 2013; EDWARDS et al., 2010). A presença da 5mC altera a estrutura da cromatina para uma configuração de heterocromatina, associada à repressão transcricional (MOORE et al., 2013). Em células somáticas, os padrões de metilação são relativamente estáveis, ainda que durante o desenvolvimento embrionário ocorram ondas de hipermetilação e hipometilação do DNA (BOGDANOVIĆ, 2017). Contudo, estímulos ambientais como alimentação, tabagismo, atividade física, poluição e estresse podem desestabilizar esse padrão (STEVENS et al., 2018). A abelha *Apis mellifera* é um exemplo clássico sobre a influência da alimentação na metilação do DNA. As abelhas operárias estéreis e a rainha fértil são fenótipos diferentes de larvas geneticamente idênticas, visto que as larvas destinadas as abelhas rainhas são alimentadas de geléia real, enquanto as operárias são alimentadas com pólen, néctar e mel (PAGE et al., 2001).

O efeito de repressão transcricional está diretamente relacionado à localização da 5mC. O genoma humano é rico em dinucleotídeos CpG, que são altamente metilados quando estão espalhados pelo genoma, mas desmetilados nas ilhas CpG, local conhecido por abrigar a maioria dos promotores de genes (MOORE et al., 2013). Sequências altamente conservadas, com aproximadamente 1000 pares de base de comprimento e ricas em dinucleotídeos CpG são classificadas como ilhas CpG (CROSS; BIRD et al., 1995). Essas regiões aumentam a acessibilidade do DNA à maquinaria transcricional e promovem a ligação dos fatores de transcrição, mas quando metiladas, resultam no

silenciamento da expressão gênica ao inibir a ligação dos fatores de transcrição e recrutar proteínas inibitórias (MOORE et al., 2013; CARNINCI et al., 2006). Entretanto, a metilação em regiões relacionadas aos promotores de genes importantes para o tipo celular, dificilmente acontece (EDWARDS et al., 2017; IRIZARRY et al., 2009).

Transferir o radical metil da S-adenosilmetionina (SAM) para o quinto carbono da citosina requer a participação da família DNA metiltransferases (Dnmt), composta enzimas por estruturalmente semelhantes, com um domínio N-terminal altamente variável, responsável pelas propriedades e funções biológicas especializadas, e uma região C-terminal com atividade catalítica enzimática (MOORE et al., 2013; JIN; ROBERTSON, 2013; CHEN; LI, 2004; SMITH; MEISSNER, 2013). Dnmt3a e Dnmt3b catalisam a metilação *de novo*, fundamental durante a definição dos padrões de metilação do DNA durante o desenvolvimento (ZHANG; XU, 2017). Enquanto a Dnmt3a participa da metilação de regiões específicas dos genes nos estágios finais do desenvolvimento embrionário, a Dnmt3b modifica regiões amplas de sequências genômicas em embriões iniciais (HERVOUET et al., 2018; SMITH; MEISSNER, 2013). A expressão de Dnmt3a e Dnmt3b está aumentada em células indiferenciadas, durante a embriogênese e no desenvolvimento das células germinativas, enquanto em células somáticas a expressão é reduzida, contribuindo para a estabilidade do metiloma (JELTSCH; JURKOWSKA, 2016). Dnmt1 é responsável pela manutenção de toda a metilação no genoma. Sua afinidade por DNA hemimetilado possibilita a replicação dos padrões de metilação da fita molde para a fita recém-sintetizada e o reparo de fragmentos desmetilados acidentalmente (ZHANG; XU, 2017; MORTUSEWICZ et al., 2005). A expressão de Dnmt1 é ativada durante a fase S do ciclo celular e, portanto, é presente na maioria das células mitóticas (KISHIKAWA et al., 2003). Apesar dos benefícios didáticos da classificação funcional das Dnmt, estudos apontam a sobreposição funcional entre a manutenção e a divisão de novo (JIN; ROBERTSON, 2013). Ademais, essa família também é composta pelas enzimas Dnmt2, envolvida na metilação de pequenos RNAs de transferência (tRNAs) e Dnmt3L, enzima sem atividade catalítica, mas que ao formar heterotetrâmeros de Dnmt3L-Dnmt3a, facilita a metilação de resíduos de citosina (CHEN; LI, 2004).

Embora os padrões de metilação sejam relativamente estáveis, alguns mecanismos de ação passiva ou ativa são capazes de restabelecer o estado não

modificado da citosina. A desmetilação passiva é a diluição das bases 5mC durante sucessivas replicações, por uma redução na atividade ou ausência de Dnmts (SMITH; MEISSNER, 2013). Mecanismo presente no desenvolvimento inicial dos mamíferos, durante a remoção gradual e passiva da metilação por meio da redução das Dnmts (ROUGIER et al., 1998; BHUTANI et al., 2011). A segunda via de desmetilação depende da atividade enzimática para modificar, remover e substituir a 5mC, por isso é classificada como ativa (MESSERSCHMIDT et al., 2014). O processo envolve enzimas da família Ten-eleven translocase (Tet), que modifica as citosinas metiladas primeiro por hidroxilação e depois por oxidação; seguida das famílias da citidina desaminase induzida por ativação e polipeptídeos catalíticos de edição de mRNA da apolipoproteína B (AID/APOBEC), que desamina as bases modificadas; e finalmente, uma família de glicosilases de reparo por excisão de bases (BER), que inicia o reparo do DNA (MOEN et al., 2015; SMITH; MEISSNER, 2013; BHUTANI et al., 2011).

Na obesidade os processos de metilação e desmetilação estão alterados, ocasionando epigenomas distintos quando comparados indivíduos obesos e eutróficos, independentemente da idade (LIMA et al., 2020, SAMBLAS et al., 2019). Estas alterações podem desempenhar um papel na obesidade, induzindo a expressão inadequada ou silenciamento de genes relacionados à obesidade e sequências regulatórias, levando assim a desequilíbrios metabólicos. Por exemplo, a avaliação do estado de metilação do DNA extraído de glóbulos brancos identificou três regiões diferencialmente entre crianças obesas e não obesas, sugerindo um papel da regulação epigenética na obesidade infantil (MANSEGO et al., 2017). Em adolescentes, o nível de metilação do DNA em genes relacionados à obesidade também foi diferente entre os grupos (HE et al., 2019). Estudos de associação ampla do epigenoma (EWAS) identificaram genes e vias relacionadas à obesidade infantil e púbere, através de análises de comparações entre grupos (DING et al., 2015; DEMERATH et al., 2015; DICK et al., 2014) No entanto, a maior parte dos artigos que identificaram sítios CpGs diferencialmente metilados, não encontraram associação dos achados com a obesidade, indicando a existência de falsos positivos nos estudos EWAS (HUANG et al., 2015; FRADIN et al., 2017; DING et al., 2015). Análises específicas de genes relacionados à obesidade infantil são escassas, inclusive nenhuma investigação foi conduzida sobre o perfil de metilação do gene *IL6* até o momento.

Em populações adultas, alguns estudos destacam o papel da metilação do gene *IL6* na obesidade. Em 2015, a hipermetilação do gene foi observada em mulheres obesas coreanas (NA, 2015). Assim como associações entre alterações nos perfis na metilação e doenças, incluindo a obesidade, Diabetes mellitus 2, hipertensão e outras doenças coronarianas (SCHMIDT- ARRAS, 2016). Foi descrito também que o aumento da expressão de IL-6 e TNF- α devido à hipometilação, em indivíduos obesos e portadores de DM2, podem contribuir para o risco de doença arterial coronariana (INDUMATHI, 2020); e que a hiperalimentação com dietas ricas em lipídeos induzem ganho de peso e alterações epigenéticas no tecido adiposo humano, inclusive na região promotora *IL6* (PERFILYEV, 2017).

Visto que a obesidade é um fator de risco estabelecido para o desenvolvimento das doenças não transmissíveis (DCNT), como diabetes mellitus tipo 2, doença cardiovascular, doenças neurodegenerativas, câncer e doença hepática gordurosa não alcoólica (STEFAN, 2021), e considerando que crianças e adolescentes, de 5 a 19 anos, estão envolvidas no crescimento global da epidemia de obesidade (WHO, 2018), estudar esta condição nunca foi tão importante no âmbito da saúde pública. Tendo em vista a importância de IL-6 na patogênese da obesidade e a escassez de estudos sobre a ocorrência de polimorfismos e da metilação do gene *IL6* na obesidade infantil, são necessários estudos para investigar a ocorrência desses eventos e sua associação com a expressão gênica de IL-6.

2- OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral

Avaliar a ocorrência do polimorfismo rs1800795, o padrão de metilação e a expressão do gene da interleucina-6 na obesidade infantil.

2.2- Objetivos Específicos

Avaliar parâmetros clínicos e antropométricos em crianças obesas e eutróficas.

Avaliar as frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo rs1800795 do gene *IL6* em crianças com obesidade e eutróficas.

Avaliar o perfil de metilação no promotor do gene *IL6* em crianças obesas e eutróficas.

Avaliar a expressão da interleucina-6 no sangue periférico de crianças obesas e eutróficas.

Avaliar associação do polimorfismo, do perfil de metilação e da expressão do gene da interleucina-6 com os parâmetros clínicos e antropométricos em crianças obesas e eutróficas.

3- METODOLOGIA

3.1 Seleção amostral

O grupo amostral foi selecionado entre os pacientes do Serviço de Medicina Preventiva (SEMPRE) em Aracaju (SE, Brasil). O termo de consentimento livre e esclarecido foi obtido dos responsáveis dos indivíduos que concordaram participar do estudo. A avaliação antropométrica consistiu na aferição de peso (kg), altura (cm) e circunferência de cintura (CC) na posição vertical, a partir da balança mecânica antropométrica Filizola M31 (FILIZOLA, Brasil) e o último por fita métrica. O IMC (kg/m²) foi calculado pela razão do peso pelo quadrado da altura em metros, seguida da classificação através das tabelas de crescimento elaboradas pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) (KUCZMARSKI, 2002).

O grupo com obesidade infantil (O) refere-se às crianças entre 7 a 13 anos cujo o resultado do IMC para idade era igual ou superior ao do 95º percentil, de acordo com as tabelas do CDC. As crianças deveriam participar do programa de emagrecimento, nunca ter usado medicação anti-obesidade e consentir em participar do estudo (Anexo 1). O grupo controle (C) foi composto por crianças com IMC para idade classificado entre os percentis 10 e 85 e também 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, 88 crianças (7 a 13 anos de idade) foram selecionadas para ambos os grupos, obeso (n=44) e controle (n=44).

Todos os participantes e responsáveis legais 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. Todos os indivíduos atendidos foram submetidos a um protocolo padrão de avaliação, acompanhamento e tratamento clínico, independente da participação. Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética na Plataforma Brasil (CAAE-04065412.6.0000.5526) (Anexo 2).

3.2 Coleta de amostras

As amostras de 12mL de sangue periférico foram coletadas após 12h de jejum, através de punção venosa usando três tubos estéreis Vacutainer®, cada um com 4mL. Os tubos contendo ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) como anticoagulante foram usados para obter sangue total para os ensaios de citometria de fluxo e de biologia molecular. Os tubos sem anticoagulante foram utilizados para obter soro para a determinação dos níveis séricos dos marcadores bioquímicos. As amostras foram coletadas por uma enfermeira treinada no SEMPRE, em Aracaju.

3.3 Determinação dos parâmetros bioquímicos

Os parâmetros bioquímicos foram avaliados a partir das amostras de soro em ambos os grupos: controle (n=44) e obeso (n=44). Através de ensaio enzimático colorimétrico, utilizando o analisador bioquímico automático Roche-Hitachi 912 (Roche Diagnostics, Basileia, Suíça), foram determinados colesterol total (CT), triglicerídeos (TRIG), lipoproteína de alta densidade (HDL) e glicemia de jejum (GJ). Por meio da fórmula de Friedewald (FRIEDEWALD et al., 1972) foram calculados os valores de lipoproteína de baixa densidade (LDL).

3.4 Citometria de fluxo do sangue periférico

Para os experimentos de citometria de fluxo, foram avaliadas amostras de sangue periférico dos grupos controle (n=9) e obeso (n=11). O sangue periférico dos pacientes foi incubado por 4 horas em CO₂ a 5% a 37°C com Brefeldina-A (SIGMA-USA) (10µg/ml). Após a incubação, 100µL de sangue foram ressuspendidos e colocados em tubos com 2µL de anticorpos monoclonais não diluídos para identificação de moléculas de superfície por 30 minutos à temperatura ambiente no escuro. Em seguida, foram submetidos à lise de eritrócitos por incubação com 2mL de solução comercial de lise (*FACS Lysing Solution-BD*, USA) por 10 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) com 1% de albumina

de soro bovino (BSA), permeabilizada usando PBS com 0,5% de saponina e incubado com 1 μ L de anticorpos monoclonais não diluídos IL-6 (MQ2-6A3) – marcados com PE. As amostras foram lavadas e fixadas com solução de formaldeído a 2% e adquiridas em citômetro de fluxo FACSCanto™ II (BD Biosciences, Breda, Holanda). No total, 70000 eventos foram obtidos por amostra. As análises 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 o marcador de IL-6.

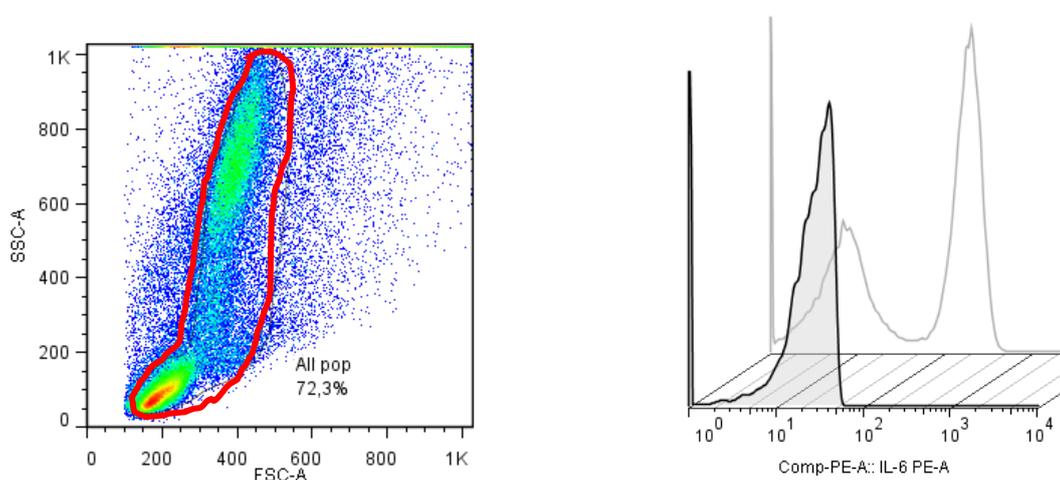


Figura 4: Método de análise das citocinas expressas pelos leucócitos. (a) Gráfico de dispersão pontual de tamanho celular (FSC) versus granulosidade celular (SSC) para definição das regiões correspondentes das populações de granulócitos, monócitos e linfócitos totais. Foi construído um “gate” (em vermelho) 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-6, no caso da figura) na população de leucócitos totais

3.5 Extração do DNA

Para os experimentos de biologia molecular para a avaliação do SNP e da metilação de *IL6*, foram avaliadas amostras de sangue periférico dos grupos controle (n=44) e obeso (n=44). A amostra de sangue foi incubada com proteinase K, a 55°C, até a sua completa digestão. Após esse procedimento, o DNA foi

submetido à extração pelo kit QIAamp DNA Tissue Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA obtido foi quantificado em espectrofotômetro (Denovix DS-11 FX+) e estocado a -20°C. Parte do DNA extraído foi designada para a avaliação da metilação e outra para a avaliação do polimorfismo.

3.6 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A avaliação do polimorfismo de *IL6* (rs1800795) foi feita pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). Essa técnica consiste na amplificação específica de sequências de ácidos nucleicos *in vitro*, utilizando uma DNA polimerase termoestável e pares de primers de DNA específicos da região de interesse. Após a extração do DNA, as alíquotas das amostras do DNA obtidas foram submetidas a PCR utilizando os seguintes pares de primers: 5`- 3` CAGAAGAACTCAGATGACTG-3` (forward) e 5`GTGGGGCTGATTGGAAACC-3` (reverse), resultando em um produto de 431 bp (KLEINA et al., 2001). As alíquotas de PCR continham volume de 25µl, sendo que apresentavam 200 ng de DNA; 12,5 µl prémix IB buffer (Phoneutria, Belo Horizonte, Brasil), 0,5 µl de cada primer (20 pM/reação) e H2O destilada para completar o volume de 25µl. A reação foi mantida a 94°C por 3 min., seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 s, 54°C por 35 s e 72°C por 30 s, e extensão final a 75°C por 5 min, seguido de resfriamento a 4°C por 3 min. As reações de PCR foram realizadas no termociclador Mastercycler personal (Eppendorf AG, Alemanha). Os produtos da PCR foram visualizados em gel de poliacrilamida com concentração de 6,5% corado com solução de prata 14,4mM. Posteriormente, 6,5 µl do produto de PCR de cada amostra foram incubados com 10u de enzima HspII (Promega, Madison, USA) a 37°C, por 4 horas, para a digestão enzimática. Após a digestão, foi possível detectar os alelos G (229 + 173 + 29 bp) e C (229 + 122 + 51 + 29 bp). Os produtos da digestão foram visualizados após eletroforese em gel de poliacrilamida a 6,5% e corados com solução de prata 14,4mM, formando os padrões de banda conforme ilustrados na Figura 5.

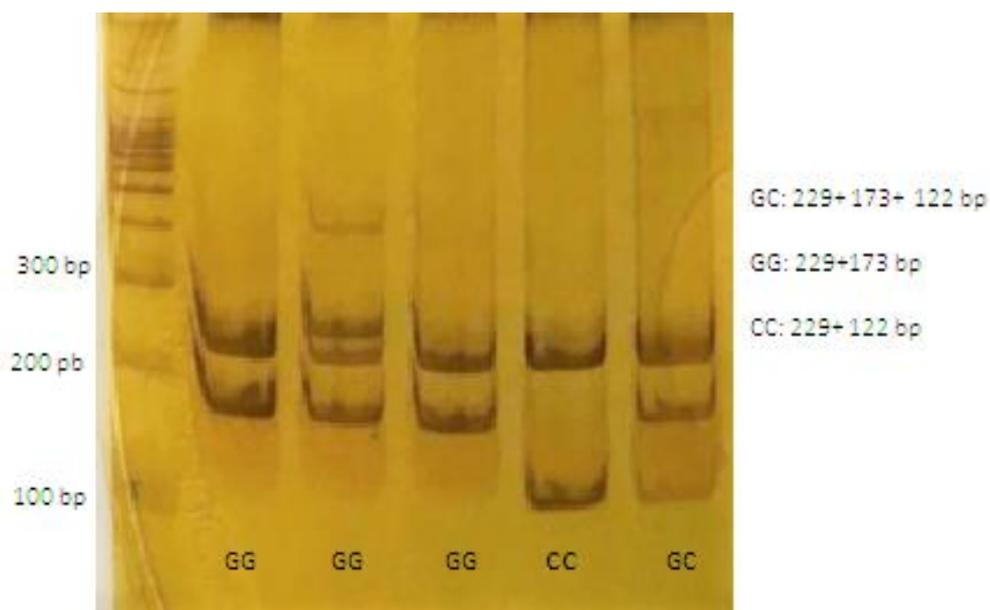


Figura 5: Representação dos genótipos para o polimorfismo genético rs1800795 após digestão com enzima HsplI.

3.7 Tratamento do DNA com bissulfito de sódio

Para a avaliação do perfil de metilação das amostras, uma fração do DNA extraído foi modificado por tratamento com bissulfito de sódio, como previamente descrito por Goldenberg et al. (2004). O tratamento com bissulfito de sódio promove a desaminação das citosinas não-metiladas e as converte em uracila, enquanto as citosinas metiladas permanecem como citosinas. Esta técnica permite distinguir o DNA metilado (M) do não-metilado (U) após a PCR. Para essa reação, 0,5µg de DNA 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 a 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 em Tris-EDTA, e novamente quantificados e armazenados a -20 °C até a sua posterior utilização.

3.8 PCR metilação-específica (MSP)

A técnica de PCR específico para a metilação (MSP) baseia-se em alterações produzidas após o tratamento do DNA com bissulfito de sódio. Para cada amostra foram realizadas duas PCRs, usando primers específicos para o DNA metilado (M) e não-metilado (U). As sequências de primers utilizadas, específicas para a região promotora do gene da IL-6 (AY170325-1), foram desenhadas com o auxílio do programa MethPrimer Design for Methylation PCR (LI E DAHIYA, 2002). As reações de PCR foram realizadas em um volume total 25 μ l, contendo 200 ng de DNA, 0,5 μ l de cada primer a 20 pm e 12,5 μ l de mastermix (Phoneutria). As reações foram incubadas no termociclador Eppendorf AG (Germany) por 3 min a 94° C, seguidos de 35 ciclos de 94° C por 1 min, 60° C por 35 seg para o primer M e 55° C por 35 seg o primer U; 72° C por 30 seg, com extensão final de 5 min a 72° C. As reações de MSP resultaram em um produto de 104pb. 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 totalmente metilado (Qiagen) foi usado como controle positivo para as reações envolvendo DNA não-metilado. Os produtos da PCR foram analisados após eletroforese em gel de acrilamida a 6,5% e corados pelo método da prata.

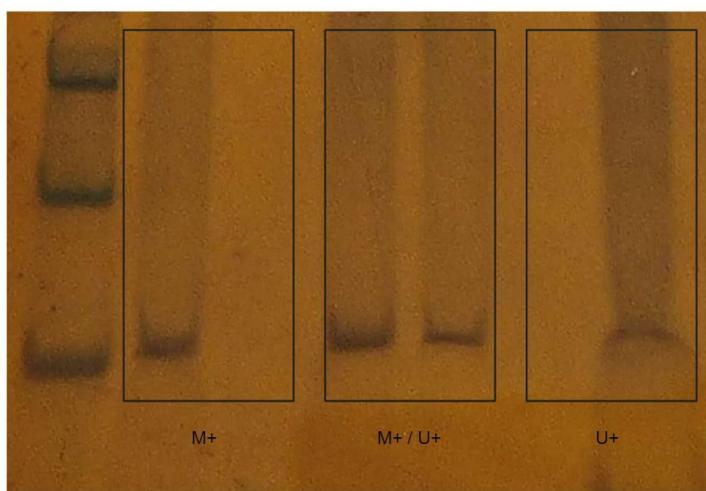


Figura 6: Representação dos diagnósticos sobre os status de metilação das amostras. M+: amostra totalmente metilada, M+/U+: amostra parcialmente metilada, U+: amostra totalmente não metilada.

3.9 Avaliação qualitativa e semi-quantitativa da técnica de MSP

Para o diagnóstico qualitativo do MSP, quando houve a amplificação da amostra apenas na reação com primers metilados (M), a amostra foi avaliada como metilação total (M+); quando houve a amplificação apenas na reação com primers não metilados (U) foi interpretada como uma amostra totalmente não metilada (U+). A metilação parcial (M+/U+) foi definida quando houve a amplificação da amostra para ambos os primers M e U, de acordo com Kwon et al. (2008).

Os níveis de metilação foram estimados a partir da metodologia semi-quantitativa, descrita por Keyes et al. (2007). Técnica baseada no cálculo da densidade óptica integrada (IOD), que é o produto do nível de cinza médio dos pixels da região selecionada pela área. Para a análise, as bandas geradas após o MSP, foram selecionadas e quantificadas usando o software ImageJ.

O percentual de metilação para cada amostra foi calculado utilizando a 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: $\% \text{ metilação} = 100 \times \frac{IODm}{IODm + IODu}$, onde IODm e IODu são as densidades ópticas integradas do metilado e não metilado de cada amostra, respectivamente.

3.10 Análise estatística

Foram realizadas análises estatísticas com os resultados obtidos utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 8.0. Os dados qualitativos foram avaliados pelo teste qui-quadrado. Os dados quantitativos inicialmente foram avaliados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. A partir desse teste, se haviam duas variáveis 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. Se havia três variáveis, foi utilizado Kruskal-Wallis. Em todos os casos, o nível de significância assumido foi de 5%.

4- RESULTADOS

4.1 Caracterização do grupo de estudo

Na tabela 1, estão detalhados os dados clínicos e bioquímicos do grupo de estudo. As crianças do grupo com obesidade apresentaram maior peso, IMC, circunferência de cintura (CC), glicemia de jejum (GJ) e LDL, comparado ao grupo controle. Por outro lado, tiveram menores níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL) e menor altura comparado ao grupo controle.

Tabela 1 Características clínicas e bioquímicas dos indivíduos

	Grupo Controle (C)	Grupo Obeso (O)	Valor de p
n, total	44	44	
Gênero			0,077
Masculino	27 (61,33%)	19 (43,2%)	
Feminino	17 (38,63%)	25 (56,8%)	
Idade	9,409 ± 1,675	9,591 ± 1,618	0,6050
Altura (cm)	154,0 ± 26,40	145,1 ± 9,630	0,0004**
Peso (kg)	38,89 ± 12,02	59,23 ± 14,31	<0,0001***
IMC (kg)	17,99 ± 2,940	27,42 ± 3,882	<0,0001***
GJ	82,50 ± 10,29	88,07 ± 10,99	0,0201*
Insulina	17,51 ± 10,16	14,94 ± 8,324	0,5788
LDL	92,91 ± 25,29	107,0 ± 31,06	0,0289*
HDL	48,93 ± 8,021	37,93 ± 7,403	< 0,0001***
Circ.C	65,11 ± 5,662	87,09 ± 10,40	< 0,0001***

GJ: glicemia de jejum; LDL: lipoproteína de baixa densidade; HDL: lipoproteína de alta densidade; Circ.C.: circunferência de cintura. 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. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão. * p< 0,05; ** p< 0,01; *** p< 0,001.

4.2 Estudo genotípico

As frequências dos genótipos e alelos referentes ao polimorfismo rs1800795 do gene *IL6* nos grupos controle e obeso estão descritas na tabela 2. Os resultados não foram diferentes entre os grupos. O GG foi o genótipo predominante e o genótipo CC menos frequente em ambos os grupos.

Tabela 2: Frequências dos genótipos e alelos referentes ao polimorfismo rs1800795 (IL-6 G/C) na posição -174 nos grupos controle e obeso

	Controle (n=44)	Obeso (n=44)	Valor de P
GG (%)	25 (56,8)	27 (61,4)	
GC (%)	15 (34,1)	13 (29,5)	0,8959
CC (%)	4 (9,1)	4 (9,1)	
Alelo			
G (%)	65 (73,9)	67 (76,1)	0,8620
C (%)	23 (26,1)	21 (23,9)	

As análises foram realizadas pelo teste qui-quadrado.

Uma vez que o polimorfismo genético avaliado é a troca de G por C na posição -174, comparamos a frequência dos genótipos com a presença do alelo polimórfico (genótipo C+) em relação ao genótipo com ausência do alelo polimórfico nos grupos de estudo (genótipo C-). Não foi observada diferença entre os grupos (Tabela 3).

Tabela 3: Frequência dos genótipos C+ versus genótipo C- para o polimorfismo rs1800795 (IL6 G/C) na posição -174.

	Controle (n=44)	Obeso(n=44)	Valor de P
Genótipo C+ (GC + CC) (%)	19 (43,2)	17 (38,6)	
Genótipo C- (GG) (%)	25 (56,8)	27 (61,4)	0,6646

As análises foram realizadas pelo teste qui-quadrado.

4.3 Associação do Polimorfismo genético *IL6* (G/C) rs1800795 com parâmetros clínicos e bioquímicos dos indivíduos

Na Tabela 4, estão representados os dados referentes às medidas antropométricas e parâmetros laboratoriais nos indivíduos com os genótipos C+ e C- do polimorfismo *IL6* nos grupos estudados. Foi observada associação da glicemia de jejum e a circunferência de cintura com o SNP, representada pelo aumento valores de GJ e diminuição da Circ. C, na presença do alelo C no grupo obeso. No grupo controle, genótipos com a presença do alelo C foram associados ao aumento de insulina. A tabela 5 estão detalhados os dados considerando os genótipos GG, GC e CC em cada grupo.

Tabela 4- Associação entre as medidas antropométricas e parâmetros laboratoriais com genótipos C+ e C- do polimorfismo rs1800795 (*IL6* G/C) nos grupos estudados

	Controle			Obeso		
	GG	GC+CC	Valor de p	GG	GC+CC	Valor de p
N	25	19	-	27	17	-
J	82,44 (± 10,27)	82,58 (± 10,58)	0,8924	84,70 (± 10,04)	93,41 (± 10,56)	0,0123*
DL	89,44 (± 25,04)	97,47 (± 25,55)	0,2966	106,2 (± 29,03)	108,10 (± 34,93)	0,8464
DL	49,96 (± 7,26)	47,58 (± 8,95)	0,2159	36,41 (± 6,51)	40,35 (± 8,26)	0,1609
Insulina	14,81 (± 9,41)	21,07 (± 10,24)	0,0266*	15,64 (± 8,91)	13,81 (± 7,43)	0,4263
Circ.C	64,28 (± 6,87)	66,21 (± 3,39)	0,7413	89,56 (± 9,64)	83,18 (± 10,64)	0,0463*

Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão. GJ: glicemia de jejum; LDL: lipoproteína de baixa densidade; HDL: lipoproteína de alta densidade; Circ.C: circunferência de cintura. 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, classificados pelo teste Shapiro-Wilk. *p<0,05

Tabela 5- Associação entre as medidas antropométricas e parâmetros laboratoriais entre genótipos GG, GC e CC do polimorfismo rs1800795 (*IL6* G/C) nos grupos estudados

	Controle				Obeso			
	GG	GC	CC	Valor de p	GG	GC	CC	Valor de p
GJ	87 (74-89)	86 (76-92)	80,5 (71,25-92)	0,9407	87 (76-90)	89 (88-98,5)	95 (91-98,25)	0,0289*
LDL	80 (78-99)	88 (78-110)	104 (81,3-125,3)	0,3261	106 (78-130)	96 (78,5-145)	107(90,5-116,8)	0,9473
HDL	47 (45-55)	46 (43-48)	51,5 (43,5-67,8)	0,2613	38 (33-39)	40 (34-44)	36,5 (32,5-57)	0,3209
Insulina	12 (7,15-20,5)	20 (9,2-31)	28 (21,5-33,75)	0,0252*	13,7 (10-20)	11 (10-18,5)	10,25(5,8-21,8)	0,6447
Circ.C	65 (60-70)	67 (65-70)	65 (65-67,25)	0,7657	89 (84-94)	79 (74,5-90)	86,5 (72,75-103,3)	0,0794

Os resultados estão expressos como mediana (intervalo interquartil). GJ: glicemia de jejum; LDL: lipoproteína de baixa densidade; HDL: lipoproteína de alta densidade; Circ.C.: circunferência de cintura. Foi avaliada a normalidade pelo teste Shapiro-Wilk, e posteriormente foi realizado Kruskal-Wallis para os dados que seguiram distribuição normal e ANOVA para os que seguiram a distribuição normal.

4.4 Metilação do gene *IL6*

O diagnóstico qualitativo das bandas geradas no experimento MSP, revelou um perfil de metilação parcial na maioria das amostras, em ambos os grupos (Tabela 6), apesar do grupo controle ser o único a apresentar amostras totalmente metiladas (11,4%). A análise qualitativa de metilação revelou diferença significativa entre os grupos, sugerindo a diminuição da metilação da região promotora de *IL6* no grupo com obesidade (Tabela 6; $p=0,0221$).

Tabela 6: Resultado qualitativo da técnica de MSP para o gene *IL6*.

	Controle (n=44)	Obeso (n=44)	Valor de P
M+ (%)	5 (11,4%)	0	
U+ (%)	4 (9,1%)	1 (2,3%)	$p=0,0221$
M+/U+ (%)	35 (79,5%)	43 (97,7%)	

M+: metilação total; U+: não-metilação total; M+ /U+: metilação parcial; * p-valor calculado pelo teste exato de Fisher.

Na análise semi-quantitativa, não houve diferença significativa ($p=0,5009$) entre os grupos controle e com obesidade para o promotor de *IL6* (Figura 7).

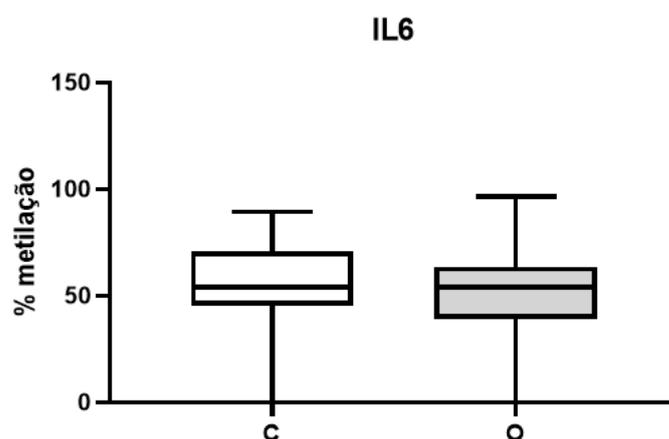


Figura 7: Análise semi-quantitativa da metilação no gene da citocina *IL6* na obesidade infantil. O gráfico destaca a mediana e o intervalo interquartil. O: amostras do grupo com obesidade; C: amostras do grupo controle. Teste t $p=0,5009$

4.5 Correlação da metilação de *IL6* com parâmetros clínicos e bioquímicos dos indivíduos

Correlações entre as medidas clínicas e bioquímicas foram realizadas a partir das porcentagens de metilação de cada amostra, obtidas pela análise semi-quantitativa (Tabela 7). Assim como nos achados do SNP, a GJ correlacionou-se com o percentual de metilação das amostras do estudo ($p=0,0495$). Considerando apenas o grupo obeso, manteve-se a correlação positiva entre a porcentagem de metilação e GJ ($p= 0,0234$).

Tabela 7: Correlação entre parâmetros bioquímicos e metilação semi-quantitativa de IL-6 das amostras totais.

GJ: glicemia de jejum; LDL: lipoproteína de baixa densidade; HDL: lipoproteína de alta densidade; INS:

	GJ	LDL	HDL	INS	Circ.C
Met I-L6	0,0495*	0.1962	0,8355	0,9278	0,3218

insulina; Circ.C.: circunferência de cintura. n para essa análise foi de 88 (n=44 do grupo controle e n=44 do grupo com obesidade). * $p<0,05$. As correlações foram determinadas pelo teste de Pearson e pelo teste de Spearman.

4.6 Expressão de IL-6

A partir da análise por citometria de fluxo, pode-se observar que a frequência de células expressando a citocina IL-6 está aumentada no grupo de crianças com obesidade em comparação com o grupo controle (Figura 8).

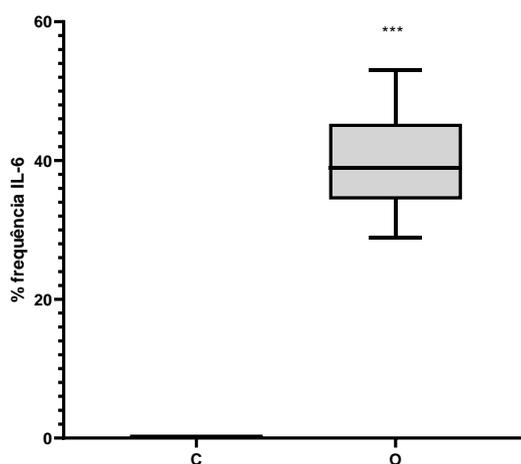


Figura 8: Frequência de células expressando IL-6 no sangue periférico de crianças dos grupos obeso e controle. n=9 do grupo controle e n=11 do grupo com obesidade. Teste de Mann-Whitney. $p< 0,0001$

4.7 Correlação da frequência de células expressando IL-6 com parâmetros clínicos e bioquímicos dos indivíduos

Ao correlacionar os parâmetros clínicos e bioquímicos com a frequência de células expressando a citocina IL-6, foram observadas correlações positivas considerando os parâmetros GJ, HDL e Circ.C (Tabela 8). Tais resultados não foram encontrados nas análises em que as amostras dos grupos controle e com obesidade foram separadas.

Tabela 8: Correlação entre parâmetros clínicos e bioquímicos com a frequência de células expressando IL-6, considerando a amostra total

	GJ	LDL	HDL	INS	Circ.C
% frequência de células expressando IL-6	0,0096*	0,0583	0,0005*	0,3001	0,0001*

GJ: glicemia de jejum; LDL: lipoproteína de baixa densidade; HDL: lipoproteína de alta densidade; Circ.C: circunferência de cintura. n para essa análise foi de 20 (n=9 do grupo controle e n=11 do grupo com obesidade). * $p < 0,05$. As correlações foram determinadas pelo teste de Pearson e pelo teste de Spearman.

4.8 Associação da frequência de células expressando IL-6 com os genótipos do polimorfismo rs1800795 e com a porcentagem de metilação do gene *IL6*

Considerando as amostras avaliadas no experimento de expressão de IL-6 (n=20), não foi observada associação entre a expressão de IL-6 e o SNP avaliado. O mesmo foi observado em relação à metilação (Figuras 9 e 10)

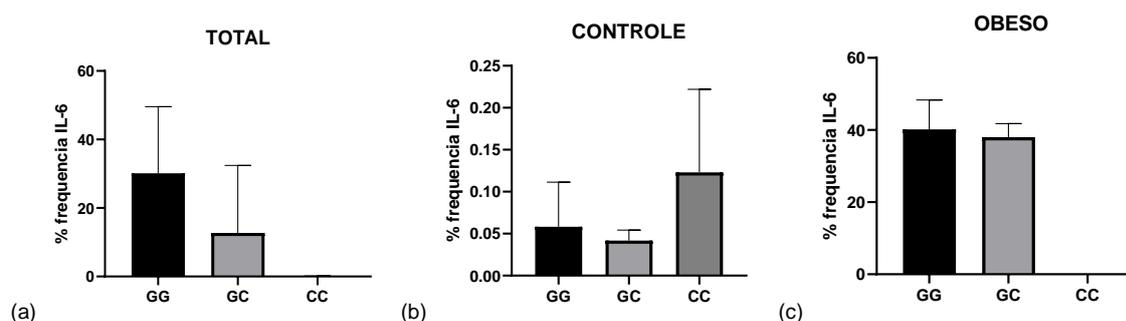


Figura 9: Análise entre a frequência de células expressando IL-6 e os genótipos do SNP rs1800795. (a) n= 20, p= 0,07; (b) n=9, p= 0,46; (c) n=11, p= 0,34. Teste Kruskal-Wallis.

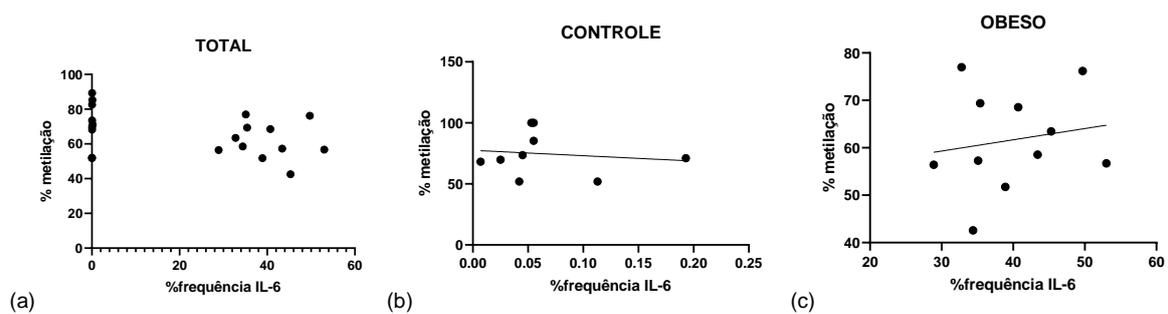


Figura 10: Análise de correlação entre a frequência de células expressando IL-6 e a % de metilação do gene *IL6*. (a) $n=20$, $p=0,27$; (b) $n=9$, $p=0,58$; (c) $n=11$, $p=0,59$. Teste de Spearman.

5- DISCUSSÃO

A OMS classifica a obesidade infantil como um dos mais sérios desafios de saúde pública do século 21. Esse problema é resultado da resposta inflamatória crônica, prolongada e suas decorrentes repercussões metabólicas (SINGER et al., 2017; HANNON et al., 2005; SRINIVASAN et al., 2002). São bem descritas na literatura as alterações bioquímicas e antropométricas apresentadas em crianças obesas. Concordando com os resultados obtidos no presente trabalho, outros estudos já verificaram diminuição dos níveis plasmáticos de HDL no grupo obeso (FREEDMAN et al., 2001; LYNGDOH et al., 2013; PORKKA et al., 1994); maior peso, IMC, circunferência de cintura (PYRZAK et al., 2009), LDL (GEISS et al., 2001; COOK et al., 2011) e glicemia de jejum no grupo obeso ao comparar com o grupo controle (MATTOS et al., 2016).

Alterações bioquímicas decorrentes da obesidade, como a dislipidemia e RI, são comuns e interligadas (JANGHORBANI et al., 2017). A literatura reconhece a RI como o distúrbio metabólico mais comum na obesidade, e que tem papel fundamental no desenvolvimento da dislipidemia, sendo assim classificada como “dislipidemia metabólica” (KLOP et al., 2013). Suas principais características são níveis elevados de TRIG e níveis reduzidos de HDL. E embora o número de partículas de LDL possa aumentar, concentrações ótimas ou moderadamente elevadas são possíveis (OTVOS et al., 2011).

O elo entre esses distúrbios pode ser resumido pelas alterações estruturais e funcionais das células adiposas frente à hiperinsulinemia. Ao inibir a lipase hormônio sensível (LSH), a insulina reduz a lipólise no TA, regulando assim a liberação de AGLs na corrente sanguínea (DIMITRIADIS et al., 2011). De maneira conjunta, ela reduz a capacidade do fígado de secretar VLDL e acelera a degradação da apolipoproteína B-100 (apoB-100) (HAAS et al., 2013). A insulina também promove a degradação de lipoproteínas ricas em TRIG, através do estímulo à atividade da lipase hepática (LH) e lipase lipoproteica (LPL) na circulação (HAAS et al., 2013). Em adição, atua nos processos de desfosforilação da 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMG-CoA) no fígado, ativando a enzima e aumentando a taxa de síntese de colesterol (DIMITRIADIS et al., 2011). É reconhecido que as adipocinas expressas pelo TA estressado são os mediadores moleculares mais significativos da RI relacionada à obesidade (HARDY et al., 2012). Além disso, adipócitos hipertrofiados inflamados são resistentes à insulina

e lipolíticos, contribuindo para o aumento de AGLs. Na outra via, o aumento da concentração de AGLs causa a dessensibilização do receptor de insulina e o consequente aumento da glicose plasmática (HABER et al., 2003).

Não houve associação entre o polimorfismo rs1800795 e os grupos estudados no presente trabalho. Pesquisas anteriores que analisaram a possível ligação entre o polimorfismo rs1800795 e a obesidade relataram resultados conflitantes (IBRAHIM, 2017; PYRZAK, 2009; SUASO, 2014; TODENDI, 2015; OANA et al., 2014; RAMREZLOPEZ et al., 2013). A presença do alelo C do polimorfismo do gene *IL6* foi associada à obesidade infantil no Egito e no México. No Egito, o grupo obeso teve predominância do genótipo GC em relação ao genótipo GG, mais frequente no grupo controle (IBRAHIM, 2017); no México, o grupo obeso teve predominância do genótipo CC em relação ao grupo controle (RAMREZ-LPEZ et al., 2013). Na Polônia, ao dividir crianças e adolescentes entre 10 e 18 anos de acordo com a presença do alelo C (genótipos C+ e C-), aqueles com o alelo C apresentaram menor espessura de tecido subcutâneo e maiores concentrações de HDL do que os indivíduos com o alelo G. Este estudo deu origem à hipótese de que o alelo C poderia ser protetor para o desenvolvimento de obesidade abdominal e síndrome metabólica, mesmo sendo o alelo mais frequente em obesos (PYRZAK, 2009). Um estudo recente, realizado com crianças iraquianas, associou o alelo C ao aumento do risco de obesidade (KADHIM et al., 2020). Por outro lado, estudos realizados no Chile (SUASO, 2014) e no Brasil (TODENDI, 2015) com crianças de origem germânica no Rio Grande do Sul, concordaram com os achados do presente estudo de que não havia relação entre o polimorfismo rs1800795 e a obesidade infantil.

A presente investigação revelou que o alelo G foi mais prevalente (75%) na população estudada do que o alelo C (25%), contudo os grupos avaliados não diferiram quanto à frequência de distribuição alélica. Esses achados são consistentes com pesquisas realizadas no Rio Grande do Sul, onde os grupos amostrais também apresentaram maior frequência do alelo G (67,2%) do que do alelo C (32,8%) (TODENDI, 2015). Saxena et al. (2014) relatou que o genótipo CC foi muito raro em seu estudo. No Egito, 64,1% dos indivíduos com obesidade possuíam o alelo G, enquanto o alelo C correspondeu a 35,9% (IBRAHIM, 2017). Na Polônia, o alelo G esteve presente em 62,4% do grupo obeso e o alelo C, em 37,6%. No Chile, o alelo C esteve presente em 23% das crianças com síndrome metabólica (SUASO, 2014). Finalmente, segundo RAMREZ-LPEZ

et al. (2013), 84,5% de todos os adolescentes mexicanos avaliados tinham o alelo G. Esses resultados demonstram que o alelo C é menos frequente, embora sejam perceptíveis diferenças percentuais na frequência de cada alelo dependendo da comunidade estudada. Tal fato se justifica pelo background genético inerente a cada população.

Foi demonstrado que o polimorfismo rs1800795 na região promotora influencia a transcrição de *IL6* (JOFFE et al. 2013). Estudos relacionam o alelo C ao aumento dos níveis de IL-6 em populações majoritariamente caucasianas (HADDY et al., 2005; BRULL, 2001; YU et al., 2012; HENNINGSSON et al., 2006; WALSTON et al., 2007), apesar da existência de estudos onde indivíduos com os genótipos GG e GC mostraram ter maiores níveis plasmáticos de IL-6, maior atividade transcricional e maior resposta induzida por IL-6 ao comparar com indivíduos CC (FISHMAN et al., 1998; KADHIM et al., 2020; TETZLAFF et al., 2018). Ademais, outros estudos não observaram impacto desse polimorfismo nos níveis séricos de IL-6 em doença arterial coronariana e infarto do miocárdio (NAUCK et al., 2002); em adultos iranianos (ROSTAMI et al., 2010) e em crianças e adolescentes brasileiras com obesidade (TODENDI et al., 2016). É interessante acentuar que diversos fatores como sexo, idade, consumo de tabaco, IMC, leucócitos e HDL podem influenciar diretamente nas concentrações de IL-6 (HADDY et al., 2005).

Nosso estudo encontrou associação entre o polimorfismo rs1800795 e os valores de GJ, Insulina e Circ.C. A GJ estava aumentada em crianças obesas com os genótipos C+. Resultado similar à pesquisa iraniana com participantes adultos, na qual pessoas obesas com o alelo C apresentavam níveis de glicose no sangue em jejum consideravelmente maiores do que aqueles com o alelo G (ROSTAMI et al., 2010). Em contrapartida, estudos da Espanha e Itália associaram o alelo C com níveis plasmáticos de glicose reduzidos (CRUDELE et al., 2021; FERNÁNDEZ-REAL et al., 2000), enquanto o estudo com crianças gregas não observou associação entre o SNP e a GJ (DEDOUSSIS et al., 2004). Apesar dos níveis plasmáticos de insulina não divergirem entre os grupos do estudo, os genótipos C+ foram associados à maiores níveis de insulina apenas para os indivíduos do grupo controle, resultado inédito na literatura. Em relação à Circ.C, foi verificado um aumento da circunferência nos indivíduos do grupo obeso com o genótipo C-. Diferentemente do achado em homens idosos suecos, onde as análises de correlação revelaram que o genótipo C+, gordura corporal total e abdominal estão

relacionados positivamente (STRANDBERG et al., 2008). Estes resultados discordam da pesquisa brasileira com crianças de Santa Catarina, na qual nenhuma associação entre o SNP e a Circ.C foi verificada (TODENDI, 2015). Estudos anteriores ressaltam a ligação entre os níveis plasmáticos de IL-6 com as concentrações de gordura abdominal, depósito de gordura mais lipolítico e inflamatório que secreta IL-6 proporcionalmente (FRIED et al., 1998; MALAVAZOS et al., 2007; ZICCARDI et al., 2002).

Uma vez que é descrita a influência transcricional do polimorfismo rs1800795, associações sobre variações na glicemia, insulina e acúmulo de gordura abdominal podem ser entendidas através das possíveis alterações nos níveis de IL-6, visto o seu papel no metabolismo de carboidratos e lipídeos. A IL-6 induz proteínas supressoras da sinalização de insulina (SOCS3) e, na sequência, ocorre a fosforilação do receptor de insulina 1 (IRS-1) em serina ao invés de tirosina. Com isso, a cascata de sinalização desse hormônio β -pancreático é prejudicada, impedindo a translocação do GLUT4 para a membrana celular e a subsequente captação da glicose plasmática (DANDONA, ALJADA, BANDYOPADHYAY, 2004). Além disso, a IL-6 estimula a lipólise e secreção de AGLs, derivados do tecido adiposo, que também contribuem para a resistência à insulina e aumento da geração de glicose hepática (CARTIER, 2008).

Portanto, é fundamental investigar a relação desse polimorfismo com o metabolismo da glicose e suas possíveis repercussões fisiológicas, pois é bem documentada a correlação entre a IL-6 e a RI, mesmo em crianças (VOZAROVA et al., 2000; OKMEYDANI, 2019). DM2 e RI, por exemplo, sofrem influência do SNP rs1800795 (DHAMODHARAN et al., 2015). A maioria dos estudos publicados em adultos com sobrepeso e obesidade sugeriram o alto risco de RI e outras desordens metabólicas na presença do alelo C, além da influência na concentração de insulina plasmática (HERBERT et al., 2006; STEPHENS et al., 2004; GOYENECHEA et al., 2007). Mais recentemente, um estudo iraquiano indicou que portadores do genótipo CC têm maior probabilidade de desenvolver o quadro de RI. Além disso, as pessoas que possuíam ao menos um alelo C tinham 2,04 vezes mais chances de desenvolver RI do que aquelas que herdaram um alelo G (KHDAER et al., 2022). Outro estudo também associou a presença do alelo C com risco de desenvolver diabetes em uma população caucasiana alemã (ILLIG et al., 2004). Em pacientes com obesidade mórbida submetidos a cirurgia bariátrica, o genótipo GG estava relacionado ao aumento da expressão de IL-6 no tecido adiposo e maior

susceptibilidade a desenvolver RI em comparação com o genótipo CC (CARDELLINI, 2005). No entanto, outro trabalho não encontrou associação entre o SNP com a obesidade e DM2 (TABASSUM et al., 2012). Por fim, uma revisão que abordou 21 estudos considerou o alelo C como protetor para o desenvolvimento de diabetes, resultado questionável diante das falhas metodológicas apresentadas (HUTH et al., 2006). Ainda sobre o papel da IL-6 no metabolismo glicídico, um estudo realizado com 1.525 adultos da coorte Framingham Heart Study (FHS) relacionou o IMC e o SNP rs1800795 com o desenvolvimento de RI e DM2, independentemente dos níveis plasmáticos da citocina. Foi sugerido que o genótipo CC favorece o aumento da incidência de RI e DM2, associado à obesidade enquanto o alelo G mostrou-se protetivo neste contexto (HERBERT et al., 2006).

Em relação ao perfil de metilação do gene *IL6*, a análise qualitativa mostrou que a região promotora estava diferencialmente metilada entre os grupos, sugerindo diminuição da metilação no grupo com obesidade. Apesar das porcentagens de metilação, procedentes do estudo semiquantitativo, também indicarem uma redução no grupo com obesidade, o cálculo estatístico não refletiu tal observação. Esse resultado controverso pode ser explicado pelas diferenças metodológicas de análises dos dados qualitativos e semiquantitativos. O método semiquantitativo é uma técnica indireta de análise, com limitações e deve ser interpretado com cautela.

São raros os achados na literatura que investigam a relação entre o perfil de metilação do gene *IL6* e a obesidade. Estudos asiáticos revelaram que indivíduos obesos apresentam níveis mais altos de metilação de *IL6* (NA, 2015; WEI et al., 2016). De forma igual, a hipermetilação da região promotora no gene *IL6* correlacionou-se com o IMC e Circ.C em uma população adulta do estado Minas Gerais, Brasil (CARRARO et al., 2016). Em outro estudo de caso-controle, os níveis de metilação de *IL6* em glóbulos brancos não diferiram entre os obesos e magros (ZHANG et al., 2012). Reforçando a ausência de concordância entre os estudos, uma coorte austríaca não relatou associação entre o IMC e a metilação do gene *IL6* em pessoas adultas (AUMUELLER et al., 2015). Essa desconexão entre os achados pode ser parcialmente devido ao tamanho de amostra, classificação de obesidade e eutrofia dos grupos e/ou diferenças nos locais de CpG analisados.

Os dados percentuais das bandas obtidas na MSP foram usados para correlacionar a metilação de *IL6* com os parâmetros clínicos e bioquímicos das

amostras. Como resultado, o percentual de metilação correlacionou positivamente com a GJ no grupo obeso, sinalizando a possível influência do perfil de metilação da região promotora do gene no metabolismo da glicose, assim como foi relatado nas investigações do SNP. Nenhum estudo abordou diretamente essa relação entre metilação de *IL6* e controle glicêmico, apesar do papel definitivo da citocina neste elo. Sabendo que a DM2 é resultado da incapacidade de o organismo metabolizar a glicose, é possível fazer um paralelo entre os achados que estudaram a relação da metilação de *IL6* e essa doença. Um estudo colombiano mostrou que a metilação do promotor de *IL6* não foi significativamente diferente entre indivíduos com DM2 e controle (PINZÓN-CORTÉS et al., 2017). Ao avaliar a correlação da metilação de *TLR4* e *IL6* com a RI em adolescentes obesos, nenhum resultado significativo foi observado (ATMAJA et al., 2016). Da mesma forma, a análise em amostras iranianas não encontrou correlação significativa entre os níveis de metilação CpG do promotor *GPX1* e *IL6* e o risco de DM2 (SADAT RAVARI et al., 2022).

Esta correlação entre GJ e o percentual de metilação das amostras pode ser resultado do aumento da expressão de IL-6 entre os indivíduos obesos com menores porcentagens de metilação de *IL6*. Há relatos sobre a interferência do status de metilação e a expressão gênica (BECKER et al., 1987; NAN et al., 1997). Na década de 90, foi demonstrado que o tratamento da linhagem de células de câncer de mama humano (MCF-7) com uma substância que reduz a metilação do DNA coincide com a hipometilação do gene *IL6* e o aumento da sua expressão. Estudos mais recentes, apesar de não abordarem o contexto da obesidade, reafirmam a relação entre a hipometilação do gene *IL6* e a expressão aumentada da citocina (POPLUTZ et al., 2014; KOBAYASHI et al., 2016).

Vale ressaltar que foi avaliado no presente estudo o DNA obtido de amostras de sangue periférico que é representado por vários tipos de células com vários perfis epigenéticos. As alterações epigenéticas podem variar a depender do tipo celular, assim como suas repercussões fisiológicas. Para entender melhor a desregulação epigenética no contexto da obesidade, são necessárias pesquisas futuras sobre o perfil epigenético de diferentes tipos de populações celulares, como o tecido adiposo e o hepático.

Em relação à expressão de IL-6, observou-se que crianças com obesidade apresentaram um aumento na frequência de células expressando IL-6 comparado ao grupo controle. Corroborando com nossos achados, em estudos com crianças

e adolescentes, a expressão de IL-6 foi descrita como elevada em populações da Letônia, Estados Unidos, Itália e Grécia (KUPČA et al., 2021; OLIVER et al., 2010; DE FILIPPO et al., 2015; ROSA et al., 2011; DEDOUSSIS et al., 2010). Este aumento da expressão sugere alterações nos mecanismos de expressão gênica em crianças com obesidade.

Em comparação com outros órgãos que expressam a citocina, como músculo esquelético que aumenta as concentrações de IL-6 em até 100 vezes durante o exercício muscular, ou o baço, coração, rins e pulmões, que juntos são responsáveis por cerca de 2% do conteúdo plasmático; o tecido adiposo é considerado o maior produtor por expressar entre 15 a 35% da IL-6 circulante (ARSLAN et al., 2010; BRAUNE et al., 2017; FEBBRAIO et al., 2002). Paralelamente, o aumento do IMC, AGLs e RI estão todos ligados à expressão elevada de IL-6 pelo TA (JORGE et al., 2018).

Considerando as investigações do presente trabalho, o aumento da expressão de IL-6, observada no grupo obeso, poderia ser entendida como o resultado da diminuição de metilação na região promotora do gene, verificada através da análise qualitativa do MSP (Tabela 6). No entanto não constatamos correlação entre porcentagem de metilação e os dados de expressão de IL-6 no grupo obeso, provavelmente devido à limitação amostral (Figura 10).

Apesar do enfoque nos efeitos do SNP rs1800795 e status de metilação da região promotora do gene *IL6* sobre a expressão da citocina, a literatura destaca inúmeros outros mecanismos envolvidos nessa regulação. NFIL6, NFkB, Fos/Jun, CRBP e receptor de glicocorticóide são alguns fatores de transcrição que controlam a produção de IL-6 (TERRY et al., 2000). Ao estudar a base molecular da repressão do promotor de IL-6, foi visto que glicocorticoides reprimem a transcrição desse gene (RAY; LAFORGE; SEHGAL, 1990). Além disso, a região promotora do gene *IL6* está sob regulação transcricional complexa, e uma variedade de fatores, incluindo hormônios, citocinas e seus fatores de transcrição, outros polimorfismos (rs1800796 e rs1800797) e fatores ambientais podem afetar a forma como essa citocina é expressa (OANA, 2014; RAMREZ-LPEZ et al., 2013; TERRY et al., 2000; MÜLLERSTEINHARDT; EBEL; HRTEL, 2006; CORTEZ et al., 2013).

Associações positivas foram encontradas quando os dados clínicos e bioquímicos foram comparados com o número de células que expressam a citocina IL-6, nos parâmetros GJ, HDL e Circ.C (Tabela 8). É estabelecido que o papel metabólico dessa interleucina está fortemente associado a estados inflamatórios

crônicos, incluindo a inflamação de baixo grau associada à obesidade e suas comorbidades (WELLEN E HOTAMISLIGIL, 2005). Inclusive, o DM2 e o infarto agudo do miocárdio são previstos por altos níveis plasmáticos de IL-6 (RIDKER et al., 2000; VOZAROVA et al., 2001). Ademais, a elevação dos níveis de glicose no sangue como resultado à administração de IL-6, foi demonstrada em indivíduos saudáveis de maneira dose dependente (TSIGOS et al., 1997).

Em 2005, Park et al. demonstraram que as concentrações séricas IL-6 foram significativamente correlacionadas com peso, IMC, Circ.C, circunferência de quadril e relação cintura-quadril. Outra investigação, abrangendo 105 crianças e adolescentes, demonstrou que os níveis plasmáticos circulantes de IL-6 foram consideravelmente elevados em pacientes obesos intolerantes à glicose em comparação com pacientes obesos normotolerantes e indivíduos controle (YESTE et al., 2007). Provavelmente, os achados citados traduzem o papel da IL-6 nos mecanismos iniciais de resistência à ação da insulina. É consenso na literatura que essa citocina diminui a secreção de adiponectina, aumenta a deposição de AGLs circulantes do tecido adiposo e inibe a transdução do sinal do receptor de insulina nos hepatócitos, todos os quais têm um impacto negativo na sensibilidade à insulina e consequente aumento da GJ. Este conjunto de achados reforçam o papel da citocina IL-6 como moduladora do metabolismo de glicose e lipídeos.

Uma quantidade crescente de pesquisas indica que a IL-6 é um regulador homeostático do metabolismo energético e da glicose, apesar de seu aparente impacto negativo no contexto da obesidade (TIMPER et al., 2017). Isso é apoiado por um corpo científico que associa a interleucina ao desenvolvimento de RI e obesidade de início tardio em animais com deficiência total de IL-6 (MATTHEWS, et al., 2010; WALLENIUS, et al., 2002). Foi descrito que os níveis plasmáticos de IL-6 tinham uma correlação mais forte com a obesidade e a RI do que o TNF- α (KERN et al., 2001). Este elo é devido ao papel mediador e regulador da IL-6 sobre

o peptídeo insulínico dependente de glicose (GIP), responsável pela secreção de insulina através do aumento da produção de GLP-1 e indução à expansão das células β -pancreáticas durante obesidade (DAOUSI et al., 2013; ELLINGSGAARD et al., 2020; ELLINGSGAARD et al., 2011). A partir dessas descobertas, é possível inferir que a produção aumentada de IL-6 durante a obesidade funciona como um mecanismo adaptativo para aumentar a produção de insulina e melhorar a tolerância à glicose em um esforço para combater a RI

associada à obesidade. Deve-se notar que a IL-6 também é classificada como uma miocina e funciona

como um sensor de energia no músculo esquelético, ativando a proteína AMPK e aumentando a lipólise, oxidação de gordura e captação de glicose (CAREY et al., 2006). Após exercícios prolongados, a IL-6 gerada no músculo esquelético é liberada na corrente sanguínea, onde pode ter um impacto antiobesidade no fígado e no tecido adiposo por meio da homeostase da glicose e da lipólise induzida pelo exercício (JANSSON et al., 2003; JONSDOTTIR et al., 2000). Foi demonstrado que a IL-6 reduz a resistência à insulina, aumenta a polarização do macrófago M2 e diminui os efeitos pró-inflamatórios do TNF- α (CHYLIKOVA et al., 2018; MAUER et al., 2014; PEDERSEN et al., 2001)

Ainda sobre os efeitos controversos da IL-6, uma pesquisa realizada em adultos e camundongos mostrou que a expressão de IL-6, pelos adipócitos, estimula o acúmulo de TA, enquanto a expressão de IL-6 por células mielóides e musculares inibe o acúmulo de TA. Estes efeitos controversos foram explicados por investigações a partir dos genes expressos por cada tipo celular do estudo, que observaram superexpressão das metaloproteases ADAM10 e ADAM17 pelo TA em camundongos com deficiência de IL-6 em células musculares ou mielóides, resultado não detectado em camundongos com deficiência de IL-6 em adipócitos (HAN et al., 2020). É interessante notar que ADAM10 e ADAM17 regulam a produção de sIL6-R que, por sua vez, modula a sinalização da citocina de um estado canônico (clássico) para não canônico (trans sinalização), via frequente na obesidade e que se associa aos efeitos prejudiciais da citocina (SCHELLER et al., 2011). Em conclusão, parece que enquanto a IL-6 produzida a partir do TA na obesidade pode causar RI, a IL-6 liberada pelo músculo esquelético pode ter efeitos positivos no controle da glicose. Para elucidar esses efeitos pleiotrópicos da citocina são necessárias mais investigações sobre o papel da IL-6 em contextos variados que estudem o metabolismo de glicose e lipídeos em diferentes populações e faixas etárias.

Considerando todas as análises e ponderações desenvolvidas ao longo do texto, destaca-se a complexidade da atividade biológica da citocina IL-6 e a escassez de estudos que abordam a influência genômica e imunológica sobre a obesidade infantil. Embora seja importante considerar: o número limitado de amostras submetidas às análises de citometria, a possível interferência de outras regiões no promotor do gene não investigadas, limitações inerentes às técnicas

experimentais aplicadas, além da possível presença de outros mecanismos capazes de modular a expressão de IL-6; nossos resultados sugerem um papel relevante de IL-6 na obesidade infantil assim como dos mecanismos relacionados à sua transcrição gênica.

6- CONCLUSÃO

Conclui-se que a diminuição da metilação e a presença do alelo polimórfico C rs1800795 no gene IL6, assim como a expressão alterada de IL-6 podem contribuir para as manifestações clínicas e bioquímicas na obesidade infantil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKBARI, Mohamad; HASSAN-ZADEH, Vahideh. IL-6 signalling pathways and the development of type 2 diabetes. **Inflammopharmacology**, v. 26, n. 3, p. 685-698, 2018.

AKIRA, Shizuo; TAGA, Tetsuya; KISHIMOTO, Tadamitsu. Interleukin-6 in biology and medicine. **Advances in immunology**, v. 54, p. 1-78, 1993.

ALTSHULER, David et al. A haplotype map of the human genome. **Nature**, v. 437, n. 7063, p. nature04226, 2005.

ARON-WISNEWSKY, Judith et al. Metabolism and metabolic disorders and the microbiome: the intestinal microbiota associated with obesity, lipid metabolism, and metabolic health—pathophysiology and therapeutic strategies. **Gastroenterology**, v. 160, n. 2, p. 573-599, 2021.

ATMAJA, Ratih Feraritra Danu et al. Correlation of methylation of toll-like receptor 4 (TLR4) and interleukin-6 (IL6) promoter with insulin resistance in obese adolescents. **Journal of the Medical Sciences (Berkala Ilmu Kedokteran)**, v. 48, n. 1, 2016.

AUMUELLER, Eva et al. Interleukin-6 CpG methylation and body weight correlate differently in type 2 Diabetes patients compared to obese and lean controls. **Lifestyle Genomics**, v. 8, n. 1, p. 26-35, 2015.

BARAN, Paul et al. The balance of interleukin (IL)-6, IL-6· soluble IL-6 receptor (sIL-6R), and IL-6· sIL-6R· sgp130 complexes allows simultaneous classic and trans-signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 18, p. 6762-6775, 2018.

BASTARD, Jean-Philippe et al. Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 85, n. 9, p. 3338-3342, 2000.

BECKER, Peter B.; RUPPERT, Siegfried; SCHÜTZ, Günther. Genomic footprinting reveals cell type-specific DNA binding of ubiquitous factors. **Cell**, v. 51, n. 3, p. 435-443, 1987.

BHAGAT, Kiran; VALLANCE, Patrick. Inflammatory cytokines impair endothelium-dependent dilatation in human veins in vivo. **Circulation**, v. 96, n. 9, p. 3042-3047, 1997.

BHUTANI, Nidhi; BURNS, David M.; BLAU, Helen M. DNA demethylation dynamics. **Cell**, v. 146, n. 6, p. 866-872, 2011.

BOETA-LOPEZ, K. et al. Association of interleukin-6 polymorphisms with obesity or metabolic traits in young Mexican-Americans. **Obesity science & practice**, v. 4, n. 1, p. 85-96, 2018.

BOGDANOVIĆ, Ozren; LISTER, Ryan. DNA methylation and the preservation of cell identity. **Current opinion in genetics & development**, v. 46, p. 9-14, 2017.

BORISH, Larry C.; STEINKE, John W. 2. Cytokines and chemokines. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, n. 2, p. S460-S475, 2003.

BOUCHARD, Claude. Genetic determinants of regional fat distribution. **Human reproduction**, v. 12, n. suppl_1, p. 1-5, 1997

CANELLA, Daniela Silva et al. Consumo de hortaliças e sua relação com os alimentos ultraprocessados no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 52, p. 50, 2018.

BRULL, D.J.; MONTGOMERY, H.E.; SANDERS, J.; DHAMRAIT, S.; LUONG, L.; RUMLEY, A.; LOWE, G.D.O.; HUMPHRIES, S.E. Interleukin-6 Gene -174G>C and -572G>C Promoter Polymorphisms Are Strong Predictors of Plasma Interleukin-6 Levels After Coronary Artery Bypass Surgery. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v.21, p.1458-1463, 2001.

CANNON, Christopher P. et al. Association of white blood cell count with increased mortality in acute myocardial infarction and unstable angina pectoris. **American Journal of Cardiology**, v. 87, n. 5, p. 636-639, 2001.

CARNINCI, Piero et al. Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution. **Nature genetics**, v. 38, n. 6, p. 626-635, 2006.

CERRETTI, Douglas Pat et al. Molecular cloning of the interleukin-1 β converting enzyme. **Science**, v. 256, n. 5053, p. 97-100, 1992.

CHAMBERS, John C. et al. Common genetic variation near MC4R is associated with waist circumference and insulin resistance. **Nature genetics**, v. 40, n. 6, p. 716-718, 2008.

CHANDRA, R. K.; KUTTY, K. M. Immunocompetence in obesity. **Acta Pædiatrica**, v. 69, n. 1, p. 25-30, 1980.

CHALARIS, Athena et al. The soluble Interleukin 6 receptor: generation and role in inflammation and cancer. **European journal of cell biology**, v. 90, n. 6-7, p. 484-494, 2011.

CHANG, Lilly; NEU, Josef. Early factors leading to later obesity: interactions of the microbiome, epigenome, and nutrition. **Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care**, v. 45, n. 5, p. 134-142, 2015.

CHEN, Taiping; LI, En. Structure and function of eukaryotic DNA methyltransferases. **Current topics in developmental biology**, v. 60, p. 55-89, 2004.

CHEN, Qing et al. Fever-range thermal stress promotes lymphocyte trafficking across high endothelial venules via an interleukin 6 trans-signaling mechanism. **Nature immunology**, v. 7, n. 12, p. 1299-1308, 2006.

CHOQUET, Hélène; MEYRE, David. Genetics of obesity: what have we learned?. **Current genomics**, v. 12, n. 3, p. 169-179, 2011.

COOK, Stephen; KAVEY, Rae Ellen W. Dislipidemia e obesidade pediátrica. **Clínicas Pediátricas**, v. 58, n. 6, pág. 1363-1373, 2011.

CORTEZ, Mayara et al. A high-fat diet increases IL-1, IL-6, and TNF- α production by increasing NF- κ B and attenuating PPAR- γ expression in bone marrow mesenchymal stem cells. **Inflammation**, v. 36, n. 2, p. 379-386, 2013.

CROSS, Sally H.; BIRD, Adrian P. CpG islands and genes. **Current opinion in genetics & development**, v. 5, n. 3, p. 309-314, 1995.

DANDONA, Paresh; ALJADA, Ahmad; BANDYOPADHYAY, Arindam. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. **TRENDS in Immunology**, v. 25, n.1, 2004.

DEDOUSSIS, George VZ et al. Expression of inflammatory molecules and associations with BMI in children. **European journal of clinical investigation**, v. 40, n. 5, p. 388-392, 2010.

DEMERATH, Ellen W. et al. Epigenome-wide association study (EWAS) of BMI, BMI change and waist circumference in African American adults identifies multiple replicated loci. **Human molecular genetics**, v. 24, n. 15, p. 4464-4479, 2015.

DHAMODHARAN, Umopathy et al. Genetic association of IL-6, TNF- α and SDF-1 polymorphisms with serum cytokine levels in diabetic foot ulcer. **Gene**, v. 565, n. 1, p. 62-67, 2015.

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.

DIMITRIADIS, George et al. Insulin effects in muscle and adipose tissue. **Diabetes research and clinical practice**, v. 93, p. S52-S59, 2011.

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.

DUNCAN, Elizabeth J.; GLUCKMAN, Peter D.; DEARDEN, Peter K. Epigenetics, plasticity, and evolution: How do we link epigenetic change to phenotype?. **Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution**, v. 322, n. 4, p. 208-220, 2014.

DRUMMOND, Elaine M.; GIBNEY, Eileen R. Epigenetic regulation in obesity. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 16, n. 4, p. 392-397, 2013.

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

EMANUELA, Faloia et al. Inflammation as a link between obesity and metabolic syndrome. **Journal of nutrition and metabolism**, v. 2012, 2012.

FAIENZA, Maria Felicia et al. Childhood obesity, cardiovascular and liver health: a growing epidemic with age. **World Journal of Pediatrics**, v. 16, n. 5, p. 438-445, 2020.

FARRAR, Michael A.; SCHREIBER, Robert D. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. **Annual review of immunology**, v. 11, n. 1, p. 571-611, 1993.

FERREIRA, Ana Vaz et al. Aleitamento materno e obesidade infantil nos Açores. **Family Medicine & Primary Care Review**, v. 23, n. 1, pág. 81-86, 2021.

FISHMAN, Daniel et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. **The Journal of clinical investigation**, v. 102, n. 7, p. 1369-1376, 1998.

FRADIN, Delphine et al. Genome-wide methylation analysis identifies specific epigenetic marks in severely obese children. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2017.

FRIED, Susan K.; BUNKIN, Dove A.; GREENBERG, Andrew S. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 83, n. 3, p. 847-850, 1998.

FREEDMAN, David S. et al. Relationship of childhood obesity to coronary heart disease risk factors in adulthood: the Bogalusa Heart Study. **Pediatrics**, v. 108, n. 3, p. 712-718, 2001.

FROY, Oren; GARAULET, Marta. The circadian clock in white and brown adipose tissue: mechanistic, endocrine, and clinical aspects. **Endocrine reviews**, v. 39, n. 3, p. 261-273, 2018.

GÁLLEGO-SUÁREZ, Cecilia et al. Enhanced myeloid leukocytes in obese children and adolescents at risk for metabolic impairment. **Frontiers in Endocrinology**, v. 11, p. 327, 2020.

GARBERS, Christoph et al. Interleukin-6: designing specific therapeutics for a complex cytokine. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 17, n. 6, p. 395-412, 2018.

GARCÍA-CALZÓN, Sonia et al. Association of telomere length with IL-6 levels during an obesity treatment in adolescents: interaction with the-174G/C polymorphism in the IL-6 gene. **Pediatric Obesity**, v. 12, n. 3, p. 257-263, 2017.

GEISS, H. C.; PARHOFER, K. G.; SCHWANDT, P. Parameters of childhood obesity and their relationship to cardiovascular risk factors in healthy prepubescent children. **International Journal of Obesity**, v. 25, n. 6, p. 830-837, 2001.

GIESTA, Juliana Mariante et al. Fatores associados à introdução precoce de alimentos ultraprocessados na alimentação de crianças menores de dois anos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 24, p. 2387-2397, 2019.

GKASTARIS, Konstantinos et al. Obesity, osteoporosis and bone metabolism. **Journal of musculoskeletal & neuronal interactions**, v. 20, n. 3, p. 372, 2020.

GHOLAMI, Morteza et al. Association of interleukin-6 polymorphisms with obesity: A systematic review and meta-analysis. **Cytokine**, v. 123, p. 154769, 2019.

GOODARZI, Mark O. Genetics of obesity: what genetic association studies have taught us about the biology of obesity and its complications. **The lancet Diabetes & endocrinology**, v. 6, n. 3, p. 223-236, 2018.

GORDON, Siamon; TAYLOR, Philip R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nature reviews immunology**, v. 5, n. 12, p. 953-964, 2005.

GRIMM, Richard H.; NEATON, James D.; LUDWIG, William. Prognostic importance of the white blood cell count for coronary, cancer, and all-cause mortality. **Jama**, v. 254, n. 14, p. 1932-1937, 1985.

HAAS, Mary E.; ATTIE, Alan D.; BIDDINGER, Sudha B. The regulation of ApoB metabolism by insulin. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 24, n. 8, p. 391-397, 2013.

HABER, E. P. et al. Pleiotropic effects of fatty acids on pancreatic β -cells. **Journal of cellular physiology**, v. 194, n. 1, p. 1-12, 2003.

HANNON, Tamara S.; RAO, Goutham; ARSLANIAN, Silva A. Childhood obesity and type 2 diabetes mellitus. **Pediatrics**, v. 116, n. 2, p. 473-480, 2005.

HARDY, Olga T.; CZECH, Michael P.; CORVERA, Silvia. What causes the insulin resistance underlying obesity?. **Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity**, v. 19, n. 2, p. 81, 2012.

HE, Fan et al. Association between DNA methylation in obesity-related genes and body mass index percentile in adolescents. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2019.

HEINK, Sylvia et al. Trans-presentation of IL-6 by dendritic cells is required for the priming of pathogenic TH17 cells. **Nature immunology**, v. 18, n. 1, p. 74-85, 2017.

HENNINGSSON, Susanne et al. Interleukin-6 Gene Polymorphism– 174G/C Influences Plasma Lipid Levels in Women. **Obesity**, v. 14, n. 11, p. 1868-1873, 2006.

HERBERT, Alan; LIU, Chunyu; KARAMOHAMED, Samer; LIU, Jun; MANNING, Alisa; FOX, Caroline S.; MEIGS, James B.; CUPPLES, Adrienne. BMI Modifies Associations of IL-6 Genotypes with Insulin Resistance: The Framingham Study. **Obesity**, v. 14, n. 8, p. 1454-1461, 2006.

HERVOUET, Eric et al. Specific or not specific recruitment of DNMTs for DNA methylation, an epigenetic dilemma. **Clinical epigenetics**, v. 10, n. 1, p. 1-18, 2018.

HIRANO, Toshio et al. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. **Nature**, v. 324, n. 6092, p. 73-76, 1986.

HILDRETH, Andrew D. et al. Single-cell sequencing of human white adipose tissue identifies new cell states in health and obesity. **Nature immunology**, v. 22, n. 5, p. 639-653, 2021.

HOTAMISLIGIL, Gökhan S.; SHARGILL, Narinder S.; SPIEGELMAN, Bruce M. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v. 259, n. 5091, p. 87-91, 1993.

HOTAMISLIGIL, Gokhan S. et al. Aumento da expressão do tecido adiposo do fator de necrose tumoral alfa na obesidade humana e resistência à insulina. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 95, n. 5, pág. 2409-2415, 1995.

HU, Man et al. Association between-174G> C polymorphism in the IL-6 promoter region and the risk of obesity: A meta-analysis. **Medicine**, v. 97, n. 33, 2018.

HUANG, Rae-Chi 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.

HURST, Suzanne M. et al. Il-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. **Immunity**, v. 14, n. 6, p. 705-714, 2001.

IBRAHIM, Ola M. et al. Influence of interleukin-6 (174G/C) gene polymorphism on obesity in Egyptian children. **Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences**, v. 5, n. 7, p. 831, 2017.

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

INTERNATIONAL HAPMAP CONSORTIUM et al. A haplotype map of the human genome. **Nature**, v. 437, n. 7063, p. 1299, 2005.

IRIZARRY, Rafael A. et al. The human colon cancer methylome shows similar hypo-and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. **Nature genetics**, v. 41, n. 2, p. 178-186, 2009.

JANGHORBANI, Mohsen et al. Risk of diabetes according to the metabolic health status and degree of obesity. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 11, p. S439-S444, 2017.

JELTSCH, Albert; JURKOWSKA, Renata 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. **Epigenetic alterations in oncogenesis**, p. 3-29, 2013.

JO, Junghyo et al. Hypertrophy and/or hyperplasia: dynamics of adipose tissue growth. **PLoS computational biology**, v. 5, n. 3, p. e1000324, 2009.

JOFFE, Yael T.; COLLINS, Malcolm; GOEDECKE, Julia H. The relationship between dietary fatty acids and inflammatory genes on the obese phenotype and serum lipids. **Nutrients**, v. 5, n. 5, p. 1672-1705, 2013.

JONES, Simon A. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 6, p. 3463-3468, 2005.

KADHIM, Manal M.; SALMAN, Intesar A. Interleukin-6 (174G/C) gene polymorphism and serum levels of IL-6, their association with risk of obesity in Iraqi childhood populations. **Prof.(Dr) RK Sharma**, v. 20, n. 4, p. 41830, 2020.

KANE, Harry; LINCH, Lídia. Controle imunológico inato da homeostase do tecido adiposo. **Trends in immunology**, v. 40, n. 9, pág. 857-872, 2019.

KERN, Philip A. et al. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. **American journal of physiology-endocrinology and metabolism**, 2001.

KEUSTERMANS, G. C. et al. Monocyte gene expression in childhood obesity is associated with obesity and complexity of atherosclerosis in adults. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2017.

KHDAER, Haider Mohammad; ALDABAGH, Muhammed AH; ALTAI, Galal AdbAli. FUNCTION ROLE OF IL-6-174 GENE POLYMORPHISMS IN ASSOCIATION WITH IL-6 LEVELS IN TYPE 2 DIABETES MELLITUS. **Wiadomosci Lekarskie (Warsaw, Poland: 1960)**, v. 75, n. 3, p. 659-663, 2022.

KISHIKAWA, Shotaro et al. Control elements of Dnmt1 gene are regulated in cell-cycle dependent manner. In: **Nucleic acids symposium series**. Oxford University Press, 2003. p. 307-308.

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

KOBAYASHI, Tetsuo; ISHIDA, Kohei; YOSHIE, Hiromasa. Increased expression of interleukin-6 (IL-6) gene transcript in relation to IL-6 promoter hypomethylation in gingival tissue from patients with chronic periodontitis. **Archives of Oral Biology**, v. 69, p. 89-94, 2016.

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.

LIMA, Rafael Silva; DE ASSIS SILVA GOMES, Juliana; MOREIRA, Paula Rocha. An overview about DNA methylation in childhood obesity: Characteristics of the studies and main findings. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 121, n. 5-6, p. 3042-3057, 2020.

LOCKE, Adam E. et al. Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. **Nature**, v. 518, n. 7538, p. 197-206, 2015.

LOUZADA, Maria Laura da Costa et al. Alimentos ultraprocessados e perfil nutricional da dieta no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 49, 2015.

LUMENG, Carey N. et al. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 121, n. 6, p. 2111-2117, 2011.

LUMENG, Carey N. et al. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, n. 1, p. 175-184, 2007.

LYNGDOH, Tanica et al. Cross-sectional and longitudinal associations between body mass index and cardiometabolic risk factors in adolescents in a country of the African region. **International journal of endocrinology**, v. 2013, 2013.

MAKKI, Kassem; FROGUEL, Philippe; WOLOWCZUK, Isabelle. Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines, and chemokines. **International Scholarly Research Notices**, v. 2013, 2013.

MALAVAZOS, Alexis E. et al. Proinflammatory cytokines and cardiac abnormalities in uncomplicated obesity: relationship with abdominal fat deposition. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 17, n. 4, p. 294-302, 2007.

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.

MĂRGINEAN, Cristina Oana et al. The adipokines and inflammatory status in the era of pediatric obesity. **Cytokine**, v. 126, p. 154925, 2020.

MARTH, Gabor T. et al. A general approach to single-nucleotide polymorphism discovery. **Nature genetics**, v. 23, n. 4, p. 452-456, 1999.

MARTÍNEZ-RAMÍREZ, O. C. et al. Association of NF κ B, TNF α , IL-6, IL-1 β , and LPL Polymorphisms with Type 2 Diabetes Mellitus and Biochemical Parameters in a Mexican Population. **Biochemical Genetics**, v. 59, n. 4, p. 940-965, 2021.

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.

MAUER, Jan et al. Signaling by IL-6 promotes alternative activation of macrophages to limit endotoxemia and obesity-associated resistance to insulin. **Nature immunology**, v. 15, n. 5, p. 423-430, 2014.

MCCURDY, Carrie E. et al. Attenuated Pik3r1 expression prevents insulin resistance and adipose tissue macrophage accumulation in diet-induced obese mice. **Diabetes**, v. 61, n. 10, p. 2495-2505, 2012.

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**, v. 57, n. 7, p. 2421-2430, 2018.

MESSERSCHMIDT, Daniel M.; KNOWLES, Barbara B.; SOLTER, Davor. DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos. **Genes & development**, v. 28, n. 8, p. 812-828, 2014.

MILANESCHI, Yuri et al. Depression and obesity: evidence of shared biological mechanisms. **Molecular psychiatry**, v. 24, n. 1, p. 18-33, 2019.

MILLS, Charles. M1 and M2 macrophages: oracles of health and disease. **Critical Reviews™ in Immunology**, v. 32, n. 6, 2012.

MINSHALL, Eleanor et al. IL-11 expression is increased in severe asthma: association with epithelial cells and eosinophils. **Journal of allergy and clinical immunology**, v. 105, n. 2, p. 232-238, 2000.

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.

MOGHBELI, Meysam et al. Cytokines and the immune response in obesity-related disorders. **Advances in Clinical Chemistry**, v. 101, p. 135-168, 2021.

MOHAMED-ALI, V. et al. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor- α , in vivo. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 82, n. 12, p. 4196-4200, 1997.

MOORE, Lisa D.; LE, Thuc; FAN, Guoping. DNA methylation and its basic function. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 1, p. 23-38, 2013.

MORTUSEWICZ, Oliver et al. Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 25, p. 8905-8909, 2005.

MÜLLER-STEINHARDT, M.; EBEL, B.; HÄRTEL, C. The impact of interleukin-6 promoter-597/-572/-174 genotype on interleukin-6 production after lipopolysaccharide stimulation. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 147, n. 2, p. 339-345, 2007.

NAGAREDDY, Prabhakara R. et al. A hiperglicemia promove a mielopoiese e prejudica a resolução da aterosclerose. **Metabolismo celular**, v. 17, n. 5, pág. 695-708, 2013.

NAGAREDDY, Prabhakara R. et al. Adipose tissue macrophages promote myelopoiesis and monocytosis in obesity. **Cell metabolism**, v. 19, n. 5, p. 821-835, 2014.

NAN, Xinsheng; CAMPOY, F. Javier; BIRD, Adrian. MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. **Cell**, v. 88, n. 4, p. 471-481, 1997.

NAUCK, Markus; WINKELMANN, Bernhard R.; HOFFMANN, Michael M.; BÖHM, Bernhard O.; WIELAND, Heinrich; MÄRZ, Winfried. The interleukin-6 G (-174)C promoter polymorphism in the LURIC cohort: no association with plasma interleukin6, coronary artery disease, and myocardial infarction. **Journal of Molecular Medicine**, v. 80, n. 8, p.507-513, 2002.

NEGRIN, Kimberly A. et al. IL-1 signaling in obesity-induced hepatic lipogenesis and steatosis. **PloS one**, v. 9, n. 9, p. e107265, 2014.

NICOLETTI, Carolina Ferreira et al. DNA methylation and hydroxymethylation levels in relation to two weight loss strategies: energy-restricted diet or bariatric surgery. **Obesity surgery**, v. 26, n. 3, p. 603-611, 2016.

NIEMAN, David C. et al. Influence of obesity on immune function. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 99, n. 3, p. 294-299, 1999.

NISHIMOTO, Norihiro et al. Treatment of rheumatoid arthritis with humanized anti-interleukin-6 receptor antibody: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. **Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology**, v. 50, n. 6, p. 1761-1769, 2004.

NONOGAKI, Katsunori et al. Interleukin-6 stimulates hepatic triglyceride secretion in rats. **Endocrinology**, v. 136, n. 5, p. 2143-2149, 1995.

NOROUZIRAD, Reza; GONZÁLEZ-MUNIESA, Pedro; GHASEMI, Asghar. Hypoxia in obesity and diabetes: potential therapeutic effects of hyperoxia and nitrate. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2017, 2017.

OANA, Mărginean Cristina et al. The role of IL-6 572 C/G, 190 C/T, and 174 G/C gene polymorphisms in children's obesity. **European Journal of Pediatrics**, v. 173, n. 10, p. 1285-1296, 2014.

O'ROURKE, R. W. et al. Alterations in peripheral blood lymphocyte cytokine expression in obesity. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 146, n. 1, p. 39-46, 2006.

OTVOS, James D. et al. Clinical implications of discordance between low-density lipoprotein cholesterol and particle number. **Journal of clinical lipidology**, v. 5, n. 2, p. 105-113, 2011.

PARRISH-NOVAK, Julia et al. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. **Nature**, v. 408, n. 6808, p. 57-63, 2000.

PETERSEN, E. W. et al. Acute IL-6 treatment increases fatty acid turnover in elderly humans in vivo and in tissue culture in vitro. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 288, n. 1, p. E155-E162, 2005.

PICKUP, John C. Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. **Diabetes care**, v. 27, n. 3, p. 813-823, 2004.

PINI, Maria; RHODES, Davina H.; FANTUZZI, Giamila. Hematological and acute-phase responses to diet-induced obesity in IL-6 KO mice. **Cytokine**, v. 56, n. 3, p. 708-716, 2011.

PÎRSEAN, Corina et al. The salivary levels of leptin and interleukin-6 as potential inflammatory markers in children obesity. **PLoS One**, v. 14, n. 1, p. e0210288, 2019.

PHILLIPS, Catherine M. et al. Additive effect of polymorphisms in the IL-6, LTA, and TNF- α genes and plasma fatty acid level modulate risk for the metabolic syndrome and its components. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 95, n. 3, p. 1386-1394, 2010.

PINZÓN-CORTÉS, Jairo Arturo et al. Effect of diabetes status and hyperglycemia on global DNA methylation and hydroxymethylation. **Endocrine connections**, v. 6, n. 8, p. 708-725, 2017.

PYRZAK, Beata et al. Association between metabolic disturbances and G-174C polymorphism of interleukin-6 gene in obese children. **European Journal of Medical Research**, v. 14, n. 4, p. 1-5, 2009.

POPKO, K. et al. Influence of proinflammatory cytokine gene polymorphism on childhood obesity. **European Journal of Medical Research**, v. 14, n. 4, p. 1-4, 2009.

POPLUTZ, Magdalena K. et al. Regulation of the Interleukin-6 gene expression during monocytic differentiation of HL-60 cells by chromatin remodeling and methylation. **Immunobiology**, v. 219, n. 8, p. 619-626, 2014.

PORKKA, Kimmo VK et al. Tracking and predictiveness of serum lipid and lipoprotein measurements in childhood: a 12-year follow-up: the Cardiovascular Risk in Young Finns study. **American journal of epidemiology**, v. 140, n. 12, p. 1096-1110, 1994.

QI, Lu et al. Genetic variation in IL6 gene and type 2 diabetes: tagging-SNP haplotype analysis in large-scale case-control study and meta-analysis. **Human molecular genetics**, v. 15, n. 11, p. 1914-1920, 2006.

QI, Lu et al. Interleukin-6 genetic variability and adiposity: associations in two prospective cohorts and systematic review in 26,944 individuals. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 92, n. 9, p. 3618-3625, 2007.

QUINTANA-MURCI, Lluís; FELLOUS, Marc. The human Y chromosome: the biological role of a "functional wasteland". **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 18-24, 2001.

RAMÍREZ-LÓPEZ, Guadalupe et al. Interleukin-6 polymorphisms are associated with obesity and hyperglycemia in Mexican adolescents. **Archives of Medical Research**, v. 44, n. 1, p. 62-68, 2013.

REILLY S. M., SALTIE A.R. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. **Nature Reviews Endocrinology**, 2017.

RIDKER, Paul M. et al. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. **Circulation**, v. 101, n. 15, p. 1767-1772, 2000.

RIVERA-CHAVEZ, Fernando A. et al. Interleukin-6 promoter haplotypes and interleukin-6 cytokine responses. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 20, n. 3, p. 218, 2003.

ROHM, Theresa V. et al. Inflammation in obesity, diabetes, and related disorders. **Immunity**, v. 55, n. 1, p. 31-55, 2022.

ROSE-JOHN, Stefan. IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. **International journal of biological sciences**, v. 8, n. 9, p. 1237, 2012.

ROSE-JOHN, Stefan. The soluble interleukin 6 receptor: advanced therapeutic options in inflammation. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 102, n. 4, p. 591-598, 2017.

ROSTAMI, Fatemeh; HAJHOSSEINI, Reza; SHARIFI, K; DANESHPOUR, Maryam S.; AZIZI, Fatemeh ; HEDAYATI, Mehdi. Association of G-174C Polymorphism of the Interleukin-6 Gene Promoter with Obesity in Iranian

Population. *International Scholarly and Scientific Research; Innovation*, v. 4, n.9, 2010.

RÓSZER, Tamás. Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms. **Mediators of inflammation**, v. 2015, 2015.

ROUGIER, Nathalie et al. Chromosome methylation patterns during mammalian preimplantation development. **Genes & development**, v. 12, n. 14, p. 2108-2113, 1998.

SACHECK, Jennifer. Pediatric obesity: an inflammatory condition?. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 32, n. 6, p. 633-637, 2008.

SADAT RAVARI, Mehrnaz et al. Association between GPX1 and IL-6 promoter methylation and type 2 diabetes. **Gene Reports**, v. 26, p. 101530, 2022.

SAMBLAS, Mirian; MILAGRO, Fermín I.; MARTÍNEZ, Alfredo. DNA methylation markers in obesity, metabolic syndrome, and weight loss. **Epigenetics**, v. 14, n. 5, p. 421-444, 2019.

SHELLER, Jürgen et al. The pro-and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1813, n. 5, p. 878-888, 2011.

SCHIRMACHER, Peter et al. Hepatocellular hyperplasia, plasmacytoma formation, and extramedullary hematopoiesis in interleukin (IL)-6/soluble IL-6 receptor double-transgenic mice. **The American journal of pathology**, v. 153, n. 2, p. 639-648, 1998.

SCHUSTER, Mark A. et al. Changes in obesity between fifth and tenth grades: A longitudinal study in three metropolitan areas. **Pediatrics**, v. 134, n. 6, p. 1051-1058, 2014.

SEHGAL, PRAVINKUMAR B. et al. Regulation of the acute phase and immune responses in viral disease. Enhanced expression of the beta 2-interferon/hepatocyte-stimulating factor/interleukin 6 gene in virus-infected human fibroblasts. **The Journal of experimental medicine**, v. 167, n. 6, p. 1951-1956, 1988.

SIITERI, Pentti K. Adipose tissue as a source of hormones. **The American journal of clinical nutrition**, v. 45, n. 1, p. 277-282, 1987.

SILVA, Hernandez Moura et al. Vasculature-associated fat macrophages readily adapt to inflammatory and metabolic challenges. **Journal of Experimental Medicine**, v. 216, n. 4, p. 786-806, 2019.

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

SHAH, Tanvi J.; LEIK, Courtney E.; WALSH, Scott W. Neutrophil infiltration and systemic vascular inflammation in obese women. **Reproductive sciences**, v. 17, n. 2, p. 116-124, 2010.

SKINNER, Asheley Cockrell et al. Multiple markers of inflammation and weight status: cross-sectional analyses throughout childhood. **Pediatrics**, v. 125, n. 4, p. e801-e809, 2010.

SMITH, Zachary D.; MEISSNER, Alexander. DNA methylation: roles in mammalian development. **Nature Reviews Genetics**, v. 14, n. 3, p. 204-220, 2013.

SRINIVASAN, Sathanur R.; MYERS, Leann; BERENSON, Gerald S. Predictability of childhood adiposity and insulin for developing insulin resistance syndrome (syndrome X) in young adulthood: the Bogalusa Heart Study. **Diabetes**, v. 51, n. 1, p. 204-209, 2002.

STALLONE, Daryth D. The influence of obesity and its treatment on the immune system. **Nutrition reviews**, v. 52, n. 2, p. 37, 1994.

STEVENS, Aaron J.; RUCKLIDGE, Julia J.; KENNEDY, Martin A. Epigenetics, nutrition and mental health. Is there a relationship?. **Nutritional Neuroscience**, v. 21, n. 9, p. 602-613, 2018.

STRANDBERG, Louise et al. IL6 and IL1B polymorphisms are associated with fat mass in older men: the MrOS Study Sweden. **Obesity**, v. 16, n. 3, p. 710-713, 2008.

SUASO, Jose et al. Association between genetic polymorphisms of interleukin 6 (IL6), IL6R and IL18 with metabolic syndrome in obese Chilean children. **Revista Medica de Chile**, v. 142, n. 3, p. 290-298, 2014.

TABASSUM, Rubina et al. Common variants of IL6, LEPR, and PBEF1 are associated with obesity in Indian children. **Diabetes**, v. 61, n. 3, p. 626-631, 2012.

TARTAGLIA, Louis A.; GOEDDEL, David V. Two TNF receptors. **Immunology today**, v. 13, n. 5, p. 151-153, 1992.

TEKCAN, Akin et al. The investigation of obesity susceptibility with IL-4 gene intron 3 VNTR and IL-6 gene-597G/A polymorphisms in a turkish population. **International Journal of Human Genetics**, v. 13, n. 4, p. 209-213, 2013.

TETZLAFF, Walter F. et al. - 174 G> C IL-6 polymorphism and primary iron overload in male patients. **Annals of Hematology**, v. 97, n. 9, p. 1683-1687, 2018.

TODENDI, Pâmela F. et al. Association of IL-6 and CRP gene polymorphisms with obesity and metabolic disorders in children and adolescents. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, p. 915-924, 2015.

TRACEY, Kevin J. et al. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. **Nature**, v. 330, n. 6149, p. 662-664, 1987.

TRELLAKIS, Sokratis et al. Low adiponectin, high levels of apoptosis and increased peripheral blood neutrophil activity in healthy obese subjects. **Obesity facts**, v. 5, n. 3, p. 305-318, 2012.

TRIM, William; TURNER, James E.; THOMPSON, Dylan. Parallels in immunometabolic adipose tissue dysfunction with ageing and obesity. **Frontiers in immunology**, p. 169, 2018.

TRIM, W. V.; LYNCH, L. Immune and non-immune functions of adipose tissue leukocytes. **Nature Reviews Immunology**, v. 22, n. 6, p. 371-386, 2022.

TSIGOS, Constantine et al. Dose-dependent effects of recombinant human interleukin-6 on glucose regulation. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 82, n. 12, p. 4167-4170, 1997.

TURCOT, Valérie et al. Protein-altering variants associated with body mass index implicate pathways that control energy intake and expenditure in obesity. **Nature genetics**, v. 50, n. 1, p. 26-41, 2018.

UCIECHOWSKI, Peter; DEMPKE, Wolfram CM. Interleukin-6: a masterplayer in the cytokine network. **Oncology**, v. 98, n. 3, p. 131-137, 2020.

VAN DIJK, SJ et al. Epigenética e obesidade humana. **Revista Internacional de Obesidade**, v. 39, n. 1, pág. 85-97, 2015.

VEKIC, Jelena et al. Obesity and dyslipidemia. **Metabolism**, v. 92, p. 71-81, 2019.

VOZAROVA, Barbosa; FERNÁNDEZ-REAL, José-Manuel; KNOWLER, William C.; GALLART, Luis; HANSON, Robert L.; GRUBER, Jonathan D.; RICART, Wilfredo; VENDRELL, Joan; RICHART, Cristóbal; TATARANNI, Antonio; WOLFORD, Johanna K. The interleukin-6 (-174) G/C promoter polymorphism is associated with type-2 diabetes mellitus in Native Americans and Caucasians. *Human Genetics*, v. 112, n.4, p.409-413, 2003.

WALLENLIUS, Ville et al. Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. **Nature medicine**, v. 8, n. 1, p. 75-79, 2002.

WALSTON, Jeremy D. et al. IL-6 gene variation is associated with IL-6 and C-reactive protein levels but not cardiovascular outcomes in the Cardiovascular Health Study. **Human genetics**, v. 122, n. 5, p. 485-494, 2007.

WCULEK, Stefanie K. et al. Metabolismo de macrófagos teciduais em homeostase e patologia. **Imunologia Celular e Molecular**, v. 19, n. 3, pág. 384-408, 2022.

WEI, Li et al. Predictors of white blood cell interleukin-6 DNA methylation levels in healthy subjects. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 9, n. 11, p. 22162-22168, 2016.

WEISBERG, Stuart P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **The Journal of clinical investigation**, v. 112, n. 12, p. 1796-1808, 2003.

WERNSTEDT, I. et al. A common polymorphism in the interleukin-6 gene promoter is associated with overweight. **International journal of obesity**, v. 28, n. 10, p. 1272-1279, 2004.

YARNELL, J. W. G. et al. Haemostatic/inflammatory markers predict 10-year risk of IHD at least as well as lipids: the Caerphilly collaborative studies. **European heart journal**, v. 25, n. 12, p. 1049-1056, 2004.

YESTE, Diego et al. Interleukin-6 in obese children and adolescents with and without glucose intolerance. **Diabetes care**, v. 30, n. 7, p. 1892-1894, 2007.

YING, Wei et al. The role of macrophages in obesity-associated islet inflammation and β -cell abnormalities. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 16, n. 2, p. 81-90, 2020.

YU, Zhangbin et al. Genetic polymorphisms in adipokine genes and the risk of obesity: a systematic review and meta-analysis. **Obesity**, v. 20, n. 2, p. 396-406, 2012.

YU, Panxi et al. Tecido adiposo, envelhecimento e metabolismo. **Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research**, v. 5, p. 11-20, 2019.

XU, Haiyan et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **The Journal of clinical investigation**, v. 112, n. 12, p. 1821-1830, 2003.

ZALDIVAR, F. et al. Body fat and circulating leukocytes in children. **International journal of obesity**, v. 30, n. 6, p. 906-911, 2006.

ZHANG, Y. Proenca r, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. **Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature**, v. 372, p. 425-432, 1994.

ZHANG, Fang Fang et al. White blood cell global methylation and IL-6 promoter methylation in association with diet and lifestyle risk factors in a cancer-free population. **Epigenetics**, v. 7, n. 6, p. 606-614, 2012.

ZHANG, Wu; XU, Jie. DNA methyltransferases and their roles in tumorigenesis. **Biomarker research**, v. 5, n. 1, p. 1-8, 2017.

ZHAO, Jianhua et al. The role of obesity-associated loci identified in genome-wide association studies in the determination of pediatric BMI. **Obesity**, v. 17, n. 12, p. 2254-2257, 2009.

ZICCARDI, Patrizia et al. Reduction of inflammatory cytokine concentrations and improvement of endothelial functions in obese women after weight loss over one year. **Circulation**, v. 105, n. 7, p. 804-809, 2002.

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 marcadores de risco para obesidade em crianças e adolescentes, possibilitando detecção precoce de biomarcadores de risco cardio metabólico 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 terá liberdade para pedir esclarecimentos sobre qualquer questão, bem como para desistir de participar da pesquisa em qualquer momento que desejar, sem 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 o meu consentimento a qualquer momento, sem 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



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

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 Naze ré de Andrade, Rodovia Jorge Amado, Km 16, Bairro

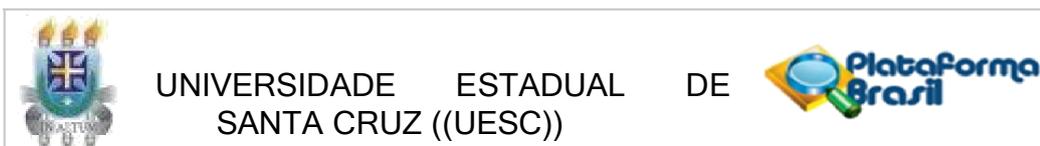
Bairro: CENTRO

CEP: 45.662-900

Município

Telefone: (73)3680-5319

Fax: (73)3680-5319 **E-mail:**



Continuação do Parecer: 150.426

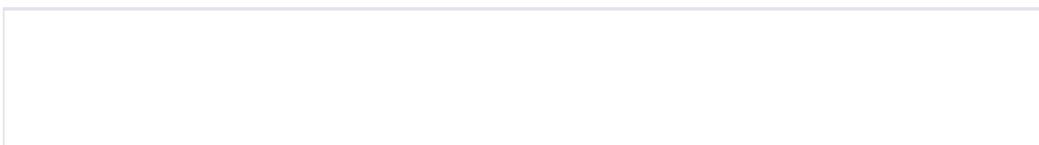
O presente estudo constará de três etapas: a primeira etapa consiste na seleção das crianças e adolescentes dos casos e controles; a segunda etapa consiste na avaliação clínica e de dosagens laboratoriais e, por fim, a terceira etapa consiste na análise molecular para determinação dos polimorfismos nas 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.

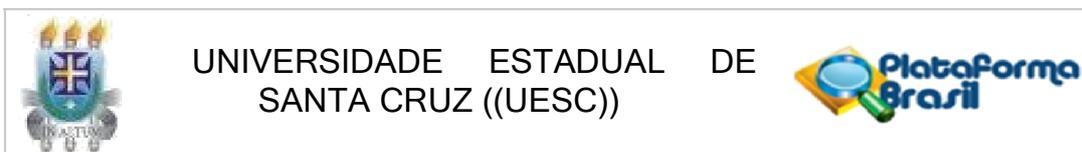
Objetivo da Pesquisa:

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 (Coordenador)