



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

**BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS E DE METILAÇÃO DO  
DNA EM CRIANÇAS COM OBESIDADE**

**DOUTORADO**

Rose Marie Mueller Linhares

FLORIANÓPOLIS  
2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

Rose Marie Mueller Linhares

**BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS E DE METILAÇÃO DO  
DNA EM CRIANÇAS COM OBESIDADE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Médicas da  
Universidade Federal de Santa Catarina,  
como requisito parcial à obtenção de  
grau de **Doutora** em Ciências Médicas

Orientador: Prof. Dr. Roger Walz

FLORIANÓPOLIS  
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Linhares, Rose Marie Mueller  
BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS E DE METILAÇÃO DO DNA  
EM CRIANÇAS COM OBESIDADE / Rose Marie Mueller  
Linhares ; orientador, Roger Walz, 2018.  
136 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Médicas-Novo, Florianópolis,  
2018.

Inclui referências.

1. Ciências Médicas-Novo. 2. Obesidade na  
infância. 3. Inflamação. 4. Proteína C ultrasensível.  
5. Metilação de DNA. I. Walz, Roger . II.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Médicas-Novo. III. Título.





**Dedico este trabalho a minha família  
querida, que sempre me apoiou com um  
amor incondicional.**

*Marcelo, Luisa e Sofía, amo vocês!*



## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Carlos e Rosi, por terem acreditado em meus sonhos e incentivado essa longa jornada profissional. Obrigada pelos valores, educação e pelo exemplo de dedicação à família.

À família Neves Linhares, que tanto amo e admiro, obrigada pelo zelo e carinho nos últimos trinta anos. Vocês são parte importante da minha história.

Ao meu amor Marcelo, por me lembrar todos os dias o quanto nossa vida é maravilhosa, Obrigada por estar comigo sempre!

Às minhas filhas, Luisa e Sofia, por terem trazido um sentido especial a minha vida. Obrigada, queridas, pela torcida e pelo carinho. O sorriso de vocês recarrega a minha energia todos os dias.

À Maria, por ajudar a organizar a minha vida pessoal enquanto me dedico mais à profissional.

Ao meu orientador e amigo Roger Walz, agradeço a oportunidade de trabalhar com uma equipe comprometida com a ciência. Admiro sua dedicação à pesquisa e sua capacidade de agregar tantos pesquisadores à sua volta.

Aos amigos Marcelo Ronsoni e Alexandre Hohl por terem me chamado para fazer parte deste grupo de pesquisa tão especial... Ronsoni, terei eterna gratidão por sua incansável ajuda neste trabalho.

Aos amigos e colegas da endocrinologia pediátrica Paulo César, Marilza, Edson, Juliana e especialmente ao Genoir, obrigada pelo apoio e torcida. E não poderia deixar de agradecer aos ex-residentes, hoje endocrinologistas pediátricos e amigos Diego, Thais, Letícia e Vinícius, que sempre contribuíram muito no seguimento ambulatorial destes pacientes. Esta conquista eu compartilho com vocês!

À amiga Marjorana por aceitar ajudar nas coletas de sangue e preparar o material de laboratório com tanta dedicação e rigor.

Aos amigos do Ambulatório do HU, por tantas alegrias e angústias compartilhadas neste período, às queridas Cinara e Ivana por estarem sempre junto comigo nas coletas e organização do material.

A professora Alexandra Latini, sempre solícita, e sua equipe do LABOX, em especial a Roberta Martins e Karina Ghisoni, pela ajuda e pelo exemplo de trabalho e compromisso com a pesquisa, muito obrigada.

Aos pacientes do ambulatório de endocrinologia pediátrica, especialmente aos que participaram desta pesquisa, obrigada por contribuir para nosso trabalho.

Agradeço a todos que de uma forma direta ou indireta, colaboraram para essa conquista.

**“Foi o tempo que dedicastes à tua  
rosa que a fez tão importante”**  
*(Antoine de Saint-Exupéry)*



## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A prevalência da obesidade infantil está crescendo em quase todos os países nas últimas três décadas, incluindo o Brasil. Fatores genéticos e ambientais contribuem para este quadro global. O sistema imune e a obesidade apresentam uma interação complexa e bidirecional e a associação entre o ganho de peso e a resposta inflamatória sistêmica envolve modificações epigenéticas. A alteração do metabolismo da glicose nas crianças com sobrepeso e obesidade tem início insidioso com a alteração da sinalização e secreção da insulina pela glicose e lipotoxicidade inicialmente nas células beta pancreáticas. A ativação de fatores pró-inflamatórios secretados pelo tecido adiposo por sua vez acarreta estresse oxidativo nos demais tecidos que por sua vez prejudicam a sinalização da insulina levando à hiperglicemia. A hiperglicemia crônica contribui para a alteração da metilação do DNA, resultando em mudanças epigenéticas. Estudos recentes mostram que a hiperglicemia crônica pode acarretar neuroinflamação repercutindo sobre a fisiologia do hipocampo, o que poderia contribuir para neurodegeneração, declínio cognitivo e eventualmente um quadro demencial. A determinação de biomarcadores pode ajudar no diagnóstico, desenvolvimento de modelos prognósticos, identificação de alvos terapêuticos para crianças obesas.

**MÉTODOS:** Comparou-se os níveis de proteína C reativa ultra sensível (PCR-US), interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), neopterin, metilação de DNA, ácido ascórbico no soro e do fator neuroprotetor REST em linfócitos de sangue periférico de crianças obesas (n=36) e de crianças não obesas (n=17) acompanhadas no ambulatório de pediatria do Hospital Universitário da UFSC e Hospital Infantil Joana de Gusmão (HIJG) em Florianópolis.

**RESULTADOS:** Houve um aumento nos níveis de metilação global do DNA, redução na expressão do fator REST e aumento na metilação do seu promotor em linfócitos do sangue de crianças com obesidade, em comparação às crianças eutróficas. Observou-se uma redução nos níveis séricos de ácido ascórbico das crianças com obesidade. Não houve diferença significativa nos níveis séricos de PCR-US entre as crianças obesas e não obesas. Crianças obesas apresentaram uma tendência para níveis séricos mais elevados de IL-1 $\beta$  e níveis mais baixos de neopterin, mas esta diferença não se manteve significativa após a correção para a distribuição das demais variáveis demográficas, clínicas e laboratoriais. Houve uma associação negativa e independente entre os

níveis séricos de neopterinina e de LDLc e a idade. Houve uma associação positiva e independente entre os níveis sérios de IL-1 $\beta$  e pressão arterial diastólica nas crianças estudadas.

**CONCLUSÃO:** A obesidade em crianças está associada à um aumento da metilação de DNA redução na expressão do fator REST e aumento na metilação do seu promotor em linfócitos do sangue periférico. Níveis séricos de ácido ascórbico estão reduzidos nas crianças obesas, porém os níveis de PCR-US, IL-1  $\beta$  e neopterinina não estão associados de forma independente à obesidade em crianças. Entretanto os níveis séricos de neopterinina estão associados negativamente aos níveis de LDLc e idade e os níveis séricos de IL-1  $\beta$  positivamente associados à pressão arterial diastólica. Os mecanismos envolvidos nestes achados necessitam ser investigados.

**Palavras-chave:** Obesidade na infância; inflamação; proteína C ultrasensível, interleucina -1  $\beta$ ; neopterinina, REST, Metilação de DNA.

## ABSTRACT

**BACKGROUND:** The prevalence of obesity in children is increasing worldwide, including in Brazil. Genetic and environmental factors contribute to this outcome. The immune system and obesity present a complex and bidirectional interaction and the relationship between weight gains and inflammation involves epigenetic mechanisms. The glucose metabolism impairment in overweight and obese children begins with alteration of insulin signaling and secretion by glyco and lipotoxicity. This occurs insidiously first in the pancreatic beta cells, and then in other tissues, resulting in the activation of pro-inflammatory factors secreted by adipose tissue leading to a systemic oxidative stress. This process, mediated by oxidative stress and by these inflammatory cytokines impairs the insulin signaling mechanisms. This chronic hyperglycemia state is also responsible for the alteration of DNA methylation and epigenetic changes. Chronic hyperglycemia may cause a neuroinflammation state affecting the hippocampal neurons that may contribute to neurodegeneration and dementia. Biomarkers identification may help the diagnosis, prognostic models development and identification of therapeutic targets for obese children.

**METHODS:** We compared the levels of ultra-sensitive reactive protein C (US-RCP), interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), neopterin, and ascorbic acid in the serum and levels of DNA methylation, REST factor in the lymphocytes of peripheral blood of obese (n=36) and non-obese children (n=17) followed at pediatric out clinic of Hospital Universitário da UFSC e Hospital Infantil Joana de Gusmão (HIJG) em Florianópolis.

**RESULTS:** Obese children showed higher levels of Global DNA methylation, lower levels of REST factor and increased methylation of REST promoter in their peripheral lymphocytes. There were lower serum levels of ascorbic acid. Obese children showed a trend for higher levels of serum IL-1 $\beta$  and lower levels of serum Neopterin but this trend remain not significant after correction for imbalances in the demographic, clinical and laboratory variables. There was a negative and independent association between serum levels of neopterin and LDLc levels and age. There was an independent association between the serum levels of IL-1 $\beta$  the diastolic arterial blood pressure.

**CONCLUSIONS:** There are higher levels of DNA methylation, lower levels of REST and higher levels of its methylation in the peripheral blood lymphocytes of obese children. Serum ascorbic acid levels are reduced in the obese children. The serum levels of US-RCP, IL-1  $\beta$  and

neopterin are not independently associated with obesity in children. Serum levels of neopterin are independently and negatively associated with LDLc levels and age. Serum levels of IL-1  $\beta$  are independently and positively associated with diastolic arterial blood pressure. The mechanisms involved in these findings deserve further investigations.

**Key words:** Children obesity; inflammation; Ultra-sensitive C reactive protein; interleukin 1 $\beta$ ; neopterin.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b>	Ativação de macrófagos tipo 1 em pacientes com obesidade	<b>43</b>
<b>Figura 2:</b>	Mecanismos e biomarcadores envolvidos na pré-diabetes em crianças e adolescentes	<b>44</b>
<b>Figura 3:</b>	Níveis de metilação global de DNA e expressão do REST em linfócitos de crianças obesas e eutróficas	<b>66</b>
<b>Figura 4:</b>	Níveis de metilação global de DNA e expressão do REST em linfócitos de crianças estratificadas de acordo com a distribuição do percentil do peso corporal	<b>66</b>
<b>Figura 5:</b>	Correlação entre a variação nos níveis da metilação global de DNA expressos em percentagem de metilação do DNA global em linfócitos e a variação do índice de massa corporal (IMC)	<b>67</b>
<b>Figura 6:</b>	Níveis de metilação do promotor do REST em linfócitos e de ácido ascórbico sérico	<b>67</b>
<b>Figura 7:</b>	Representação esquemática do envolvimento do ácido ascórbico na demetilação passiva da citosina	<b>68</b>



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Diagnóstico de composição corporal em crianças de zero a dez anos de idade incompletos de acordo com o escore Z do IMC	<b>32</b>
<b>Tabela 2.</b>	Diagnóstico de composição corporal em adolescentes de acordo com o escore Z do IMC	<b>32</b>
<b>Tabela 3:</b>	Diagnóstico de sobrepeso e obesidade em adultos com base no IMC ( $\text{kg}/\text{m}^2$ )	<b>33</b>
<b>Tabela 4:</b>	Referência dos pontos de corte para circunferência da cintura abdominal de acordo com a IDF	<b>34</b>
<b>Tabela 5:</b>	Combinação das medidas de IMC e CA para análise de risco de complicações metabólicas	<b>34</b>
<b>Tabela 6.</b>	Referência dos pontos de corte para circunferência da cintura abdominal de acordo com a IDF ( <i>International Diabetes Federation</i> )	<b>35</b>
<b>Tabela 7:</b>	Características demográficas e clínicas das crianças obesas e controles	<b>64</b>
<b>Tabela 8:</b>	Perfil laboratorial das crianças obesas e controles	<b>65</b>
<b>Tabela 9:</b>	Características demográficas, crianças e laboratoriais das crianças eutróficas e obesas	<b>69</b>
<b>Tabela 10:</b>	Modelo Final de regressão logística binária mostrando as variáveis independentemente associadas com obesidade em crianças	<b>71</b>
<b>Tabela 11:</b>	Variáveis associadas de forma independente ao nível sérico de neopterinina e IL-1 $\beta$	<b>72</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS

ABESO	Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica
AGEs	<i>Advanced Glication End Products</i>
ANOVA	Análise da Variância
BDNF	<i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i>
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CA	Circunferência Abdominal
DCV	Doença Cardio Vascular
DM2	<i>Diabetes Mellitus</i> tipo 2
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DNMT	DNA metiltransferases
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
EGTA	<i>Ethylene Glycol Tetraacetic Acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
eNOS	<i>Endothelial Nitric oxide synthase</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
FSH	<i>Folicle Stimulating Hormone</i>
FTO	<i>Fat Mass and Obesity-Associated Protein</i>
GFAP	<i>Glial Fibrillary Acid Protein</i>
GH	<i>Growth Hormone</i>
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HbA1C	Hemoglobina Glicada A1c
HDL	High-density lipoprotein
HDLc	High Density Lipoprotein Cholesterol
HIJG	Hospital Infantil Joana de Gusmão
HOMA-IR	<i>Homeostasis model assessment-insulin resistance</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	Intervalo de confiança
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IMC	Índice de Massa Corporal
INF- $\gamma$	Interferon gama
IOTF	<i>International Obesity Task Force</i>
IRS-1	<i>Insulin Receptor Substrate-1</i>

JNK	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LDL-c	<i>Low Density Lipoprotein Cholesterol</i>
L	Dopa LevoDopa
LH	<i>Lutein Hormone</i>
LINE-1	<i>Long Interspersed nuclear Elements 1</i>
LMT	<i>Letter Memory Test</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
MECP2	<i>Methyl CpG Binding Protein 2</i>
MOPS	<i>3-(N-morpholino) propanesulfonic acid</i>
NADH	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>
NHANES	<i>National Health and Nutrition Examination Survey</i>
NOS	<i>Nitric oxide synthase</i>
NRF-1	<i>Nuclear Respiratory Factor 1</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Pressão Arterial
PCR-US	Proteína C reativa ultrasensível
PNAD	Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios
PNS	Pesquisa Nacional de Saúde
REST	<i>Repressor Element-1 Silencing Transcription Factor</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RxR2	<i>Retinol X Receptor 2</i>
SC	Santa Catarina
SM	Síndrome Metabólica
SNC	Sistema Nervoso Central
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TAB	Tecido Adiposo Branco
TAF-1.	<i>Transcription Initiation Factor</i>
TAM	Tecido Adiposo Marrom
TCLE	Termo de Consentimento Livre Esclarecido
TET	<i>Ten-Eleven Translocation</i>
TGO	Transaminase Glutâmico Oxalacética
TGP	Transaminase Glutâmico Pirúvica
TNF- alfa	<i>Tumor Necrosis Factor alfa</i>
TSH	<i>Thyroid Stimulating Hormone</i>
TV	Televisão
T4 livre	Tiroxina livre
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
US	<i>United States</i>
USA	<i>United States of America</i>

US-CRP	<i>Ultra-Sensitive C reactive protein</i>
WARG	Wilms Tumor, Anirida, Genitourinary anomalies and intelectual disability
WHO	<i>World Health Organization</i>
Z-IMC	Escore Z do índice de Massa Corporal
5-mC	5-metilcitosina
5hmC	5-hidroximetilcitosina



# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>27</b>
<b>1.1. OBESIDADE INFANTIL E O PANORAMA MUNDIAL</b> .....	<b>27</b>
<b>1.2. CONCEITO E AVALIAÇÃO DA OBESIDADE</b> .....	<b>30</b>
<b>1.3. FATORES DE RISCO PARA A OBESIDADE EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES</b> .....	<b>35</b>
<b>1.4. EPIGENÉTICA, BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS E METILAÇÃO DE DNA</b> .....	<b>37</b>
<b>1.5. O TECIDO ADIPOSEO E INFLAMAÇÃO</b> .....	<b>40</b>
<b>1.6. HIPERGLICEMIA E IMPACTO NO CÉREBRO E NA COGNIÇÃO</b> .....	<b>49</b>
<b>1.7. MODELO EXPERIMENTAL DE HIPERGLICEMIA CRÔNICA E CÉREBRO</b>	<b>50</b>
<b>1.8. REST, METILAÇÃO DE DNA E NEUROPLASTICIDADE CEREBRAL</b> .....	<b>51</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>53</b>
<b>2.1. OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>53</b>
<b>2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>53</b>
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>55</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>57</b>
<b>4.1. CAPÍTULO I – BIOMARCADORES DA OBESIDADE INFANTIL E SÍNDROME METABÓLICA: METILAÇÃO DE DNA E REST</b> .....	<b>57</b>
<b>4.1.1. Tipo de estudo</b> .....	<b>57</b>
<b>4.1.2. População e amostras analisadas</b> .....	<b>57</b>
<b>4.1.3. Quantificação de metilação de DNA e REST</b> .....	<b>58</b>
<b>4.1.4. Análise Estatística</b> .....	<b>59</b>
<b>4.2. CAPÍTULO II – NÍVEIS SÉRICOS DE PROTEÍNA C REATIVA ULTRASSENSÍVEL, INTERLEUCINA 1 BETA E NEOPTERINA EM CRIANÇAS BRASILEIRAS OBESAS: ESTUDO CASO-CONTROLE</b> .....	<b>60</b>
<b>4.2.1. Tipo de estudo</b> .....	<b>60</b>
<b>4.2.2. População e amostras analisadas</b> .....	<b>60</b>
<b>4.2.3. Quantificação da Neopterina, IL-1 <math>\beta</math> e PCR-US- Artigo II</b> .....	<b>60</b>
<b>4.2.4. Análise Estatística</b> .....	<b>61</b>
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>63</b>
<b>5.1. CAPÍTULO I: BIOMARCADORES DA OBESIDADE INFANTIL E SÍNDROME METABÓLICA: METILAÇÃO DE DNA E REST</b> .....	<b>63</b>
<b>5.2. CAPÍTULO II: NÍVEIS SÉRICOS DE PROTEÍNA C REATIVA ULTRASSENSÍVEL, INTERLEUCINA 1 BETA E NEOPTERINA EM CRIANÇAS BRASILEIRAS OBESAS: ESTUDO CASO-CONTROLE</b> .....	<b>63</b>
<b>5.3. CAPÍTULO I – BIOMARCADORES DA OBESIDADE INFANTIL E SÍNDROME METABÓLICA: METILAÇÃO DE DNA E RES</b> .....	<b>63</b>
<b>5.3. CAPÍTULO II – NÍVEIS SÉRICOS DE PROTEÍNA C REATIVA ULTRASSENSÍVEL, INTERLEUCINA 1 BETA E NEOPTERINA EM CRIANÇAS BRASILEIRAS OBESAS: ESTUDO CASO-CONTROLE</b> .....	<b>68</b>

<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>75</b>
6.1. CAPÍTULO I: BIOMARCADORES DA OBESIDADE INFANTIL E SÍNDROME METABÓLICA: METILAÇÃO DE DNA E REST .....	75
6.2. CAPÍTULO II: NÍVEIS SÉRICOS DE PROTEÍNA C REATIVA ULTRASENSÍVEL, INTERLEUCINA 1 BETA E NEOPTERINA EM CRIANÇAS BRASILEIRAS OBESAS: ESTUDO CASO-CONTROLE.....	76
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>79</b>
<b>8. APOIO .....</b>	<b>81</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>83</b>
<b>APÊNDICE A: INSTRUMENTO DE COLETA .....</b>	<b>97</b>
<b>APÊNDICE B: TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .</b>	<b>99</b>
<b>ANEXO A: GRÁFICOS DE ESTATURA, PESO E IMC EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES - OMS.....</b>	<b>101</b>
<b>ANEXO B .....</b>	<b>109</b>
<b>ANEXO C: SERUM LEVELS OF ULTRA-SENSITIVE C-REACTIVE PROTEIN, INTERLEUKIN-1<math>\beta</math> AND NEOPTERIN IN BRAZILIAN OBESE CHILDREN: A CASE CONTROL-STUDY .....</b>	<b>111</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Obesidade infantil e o panorama mundial

A prevalência da obesidade está aumentando nos últimos 30 anos, associada às mudanças no estilo de vida, principalmente em áreas urbanas de países em desenvolvimento, incluindo o Brasil (Gigante, Moura, & Sardinha, 2009; Lobstein et al., 2015b; Sousa, Olinda, & Pedraza, 2016). O ganho de peso excessivo da população nos países em desenvolvimento vem ganhando a atenção em saúde pública, tomando o lugar desnutrição e doenças infecciosas (Atkinson, 1998; World Health Organization, 1998). O aumento de peso está ocorrendo em todas as idades, inclusive na infância e adolescência, cujo risco para o desenvolvimento precoce de comorbidades é elevado (Burke, 2006).

Devido à sua elevada prevalência e morbimortalidade (Cox, West, & Cripps, 2015; Han, Lawlor, & Kimm, 2010) a Organização Mundial de Saúde (OMS) aponta a obesidade como um dos maiores problemas de saúde pública no mundo atual (WHO, 2017).

Em 2016, a OMS registrou 1,9 bilhões de pessoas adultas (18 anos ou mais) com sobrepeso no mundo. Destes, cerca de 650 milhões são obesos, ou seja, 39% da população adulta (39% homens e 40% mulheres) está acima do peso e cerca de 13% está obesa (11% homens e 15% mulheres) (WHO, 2017).

Estima-se que 1/5 da população mundial infantil esteja acima do peso, o que pode resultar em uma futura geração de obesos, uma vez que as crianças obesas tem maior chance de se tornar adolescentes obesos, e 80% destes chegam à vida adulta também com obesidade (Burke, 2006; Weiss et al., 2017). Atualmente há aproximadamente 340 milhões de crianças entre 5 e 19 anos acima do peso, correspondendo a 18% da população nesta faixa etária, (18% sexo feminino e 19% sexo masculino) e destas, 124 milhões estão obesos (6% sexo feminino e 8% sexo masculino). Estima-se que 41 milhões de crianças menores de 5 anos sejam obesas ou estejam acima do peso, o que é equivalente à metade da população mundial nesta faixa etária (WHO, 2017).

Apesar de existirem diversos estudos brasileiros sobre a prevalência de excesso de peso e obesidade, eles representam amostras de grupos populacionais distintos em nosso país. No Brasil, existe uma avaliação periódica da população através de pesquisas domiciliares para adquirir dados sobre percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas. Este monitoramento é realizado pelo Instituto Brasileiro de

Geografia e Estatística (IBGE) através de questionários aplicados em uma amostra de domicílios, que investiga diversas características socioeconômicas da população, a Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios (PNAD). Em 2013, esta pesquisa incluiu avaliação de peso, estatura e circunferência abdominal de indivíduos adultos entrevistados, com coleta de sangue para investigação laboratorial. Dados deste estudo, denominado Pesquisa Nacional de Saúde (PNS), revelou o estado nutricional da população brasileira com idade maior ou igual a 18 anos, através da medida do índice de massa corporal (IMC), seguindo as recomendações da OMS. A prevalência de excesso de peso em adultos, no Brasil, foi de 56,9% (cerca de 82 milhões), sendo masculino 55,6% e feminino 58,2%. A prevalência de obesidade foi de 20,8%, sendo 16,8% em homens e 24,4% mulheres (Brasil, 2015; IBGE, 2013), 24,6% em crianças de 10 a 19 anos, e 35,9% em crianças de 5 a 9 anos. Florianópolis é a capital do país com menor prevalência de obesos (Malta et al., 2015; Malta, Andrade, Claro, Bernal, & Monteiro, 2014). Vale lembrar que na década de 1990, a prevalência de sobrepeso era de 4,9% em crianças de 6 a 9 anos, e 3,7% em jovens entre 10 e 18 anos (Malta et al., 2014).

A PNS em 2013 também revelou aumento da circunferência abdominal em adultos sendo que 52,1% das mulheres e em 21,8% dos homens entrevistados apresentavam níveis acima do limite da normalidade (maior ou igual a 88 cm em mulheres e maior ou igual a 102 em homens). A análise da pressão arterial (PA), indicou prevalência de hipertensão em 22,3% da população avaliada (PA sistólica maior ou igual a 140 mmHg ou PA diastólica maior ou igual a 90 mmHg). A prevalência em mulheres foi de 19,5% e em homens, de 25,3% (Brasil, 2015).

O excesso de peso e a obesidade são prevalentes em crianças e adolescentes de ambos os sexos, em todos os grupos de renda e praticamente em todas as regiões brasileiras (IBGE, 2010). Este fato é atribuído às mudanças de hábitos nesta população. Através do questionário da PNS em 2013 estimou-se que 60,8% das crianças com menos de 2 anos de idade comiam biscoitos, bolachas ou bolo, e que 32,3% tomavam refrigerante ou suco artificial (Brasil, 2015; IBGE, 2013).

Pesquisas na área da obesidade são necessárias para a compreensão de sua etiologia, epidemiologia, evolução, prevenção e tratamento. Estudos recentes evidenciaram redução na expectativa de vida de indivíduos adultos com obesidade em 0,8 a 7 anos (cerca de 6 anos em homens e 7 anos em mulheres) (E E Calle, Thun, Petrelli, Rodriguez, & Heath,

1999; Eugenia E Calle, Teras, & Thun, 2005; Weiss et al., 2017). A obesidade é atualmente a segunda causa de morte evitável nos Estados Unidos da América, só ficando atrás do tabagismo (E E Calle et al., 1999; Weiss et al., 2017). Estudos epidemiológicos demonstram que a associação entre obesidade e maior risco de morte precoce em adultos deve-se às comorbidades associadas à obesidade, e acomete homens e mulheres em todas as idades, mais frequentes em brancos que em afrodescendentes (Peeters et al., 2003). Estas comorbidades associadas ao ganho de peso são a síndrome metabólica (inclui a resistência insulínica, dislipidemias e hipertensão arterial), *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2), doenças cardiovasculares (DCV), doença renal crônica e esteatose hepática não alcoólica (Burke, 2006; Choi, Joseph, & Pilote, 2013; Cox et al., 2015; Lobstein et al., 2015b).

A obesidade na infância e adolescência também está associada a estas mesmas comorbidades, e estudos mostram que há uma intolerância à glicose com evolução mais rápida na população pediátrica que em adultos (Weiss et al., 2005, 2017). É frequente encontrar resistência insulínica, hipertensão, DM2, dislipidemia, estresse oxidativo e inflamação sistêmica de baixo grau nas crianças e adolescentes obesos (Duncan, 2006; Weiss et al., 2017). À medida que aumenta o número de crianças com sobrepeso e obesidade, também aumenta a prevalência destas doenças na infância e adolescência com maior risco de doenças cardiovasculares (Weiss et al., 2017). O aumento dos fatores de risco para distúrbios cardiovasculares e metabólicos, por sua natureza crônica e insidiosa, requer um acompanhamento cuidadoso na infância, visando uma detecção precoce e o estabelecimento de intervenções para prevenir complicações na vida adulta (Burke, 2006; Moura & Claro, 2012).

Uma coorte norte-americana do *US National Longitudinal Study of Adolescent Health*, que acompanhou adolescentes até a idade adulta, verificou que a obesidade na adolescência foi significativamente associada ao aumento do risco de obesidade grave no futuro. Há muitas repercussões negativas que afetam a qualidade de vida das crianças nessa condição ainda na infância, além de certamente contribuir para doenças no futuro (Lin et al., 2017). As sequelas cardiovasculares, com espessamento de íntima média, hipertrofia ventricular esquerda e aterosclerose são frequentes. Quanto mais tempo o indivíduo se mantiver acima do peso, maior será o risco de complicações. Há um aumento de morbimortalidade nos adultos que foram obesos no período da infância e adolescência, mesmo que haja melhor controle do peso no futuro. É um poderoso preditor de efeitos adversos à saúde na vida adulta (Burke, 2006; Eugenia E Calle et al., 2005).

De acordo com a tendência secular, é provável que aumente cada vez mais a prevalência e gravidade da obesidade na infância e na adolescência, assim como suas comorbidades (Boyle, Thompson, Gregg, Barker, & Williamson, 2010). Em países desenvolvidos, o aumento da prevalência da obesidade atenuou-se nos últimos 8 anos, mas continua aumentando nos países em desenvolvimento, e nenhum país teve redução significativa na obesidade nos últimos 33 anos. (Halpern et al., 2010). Este é um dos mais sérios desafios da saúde pública atual.

## **1.2. Conceito e avaliação da obesidade**

A obesidade é definida como doença crônica associada ao excesso de gordura corporal, com etiologia complexa e multifatorial, resultando da interação de fatores genéticos e ambientais. Ocorre devido à hipertrofia e hiperplasia de adipócitos. Estudos mostram que sua presença está associada a maiores riscos de morbimortalidade no indivíduo devido ao processo inflamatório crônico insipiente observado nos indivíduos obesos (Boyle et al., 2010; Wang, Monteiro, & Popkin, 2002). A adiposidade localizada na região central do corpo, mais especificamente a abdominal, está associada a um maior risco cardiometabólico (Polat, Urganci, Caliskan, & Akyildiz, 2008).

Apesar de o conceito de obesidade ser baseado no acúmulo de tecido adiposo no organismo, o sistema de classificação mundialmente aceito e proposto pela OMS para a avaliação de crianças e adolescentes obesos não utiliza a quantidade ou a distribuição de gordura corporal como critério básico (Blüher et al., 2017; Gigante et al., 2009).

A medida ideal de sobrepeso e obesidade seria um índice que refletisse o grau de adiposidade e sua distribuição, bem como sua associação com riscos para a saúde, de uma forma unificada, considerando sexo, idade e grupos étnicos, mas este índice não existe. Há algumas formas de avaliar a adiposidade: medidas antropométricas, impedância bioelétrica, densitometria, tomografia computadorizada, ultrassonografia, ressonância magnética, pletismografia. Algumas técnicas são mais onerosas e requerem equipamento complexo e treinamento, limitando seu emprego em larga escala como ocorre nos estudos populacionais (M. Mancini, 2015).

A ferramenta mais utilizada para definir a obesidade em estudos populacionais é baseada no índice de massa corporal (IMC). O IMC é o parâmetro utilizado entre todas as faixas etárias para determinar

sobrepeso e obesidade (Bellizzi & Dietz, 1999). O IMC consiste em um cálculo simples e rápido, utilizando dados antropométricas de peso e estatura do indivíduo. Este cálculo foi desenvolvido por Adolphe Quételet (1796-1874), um estatístico belga, no fim do século XIX, em 1832, também conhecido por índice de Quételet, e denominado como índice de massa corporal em 1972 por Ancel Keys (1904-2004), tornando-se uma medida internacional de obesidade adotado pela OMS em 1997, após ser aceito pelo *International Obesity Task Force (IOTF) Childhood Obesity Working Group*, embora não discriminasse massa gorda de massa magra em sua avaliação (Bellizzi & Dietz, 1999; Eknoyan, 2008).

O cálculo do IMC consiste na razão entre o peso em quilogramas e o quadrado da altura em metros (Bellizzi & Dietz, 1999). Um IMC elevado pode ser razoavelmente assumido como um excesso de massa gorda, sendo um índice de obesidade aceitável, embora não forneça informações sobre a composição corporal ou sua distribuição. (Samuel & Shulman, 2012). A combinação de IMC com medidas antropométricas relacionadas com a distribuição de gordura pode ajudar a resolver alguns problemas do seu uso (Bellizzi & Dietz, 1999).

A medida do IMC tem como objetivo avaliar se a pessoa está no peso ideal e identificar a associação entre IMC e doença crônica ou mortalidade. O IMC é uma ferramenta essencial para a saúde pública, em estudos epidemiológicos, na avaliação do perfil nutricional de uma população no decorrer do tempo, apesar de apresentar limitações na avaliação individual (Bellizzi & Dietz, 1999; Gigante et al., 2009).

Em crianças e adolescentes há uma variação da distribuição de gordura durante o crescimento, e a interpretação difere de acordo com sexo e faixa etária. O limite de normalidade é estabelecido por curvas de percentil e escore Z do IMC, de acordo com a idade e o sexo (Wang et al., 2002). O Brasil adota as curvas da OMS desde 2007 ajustadas para idade e sexo para diagnóstico de obesidade em crianças e adolescentes, assim como a do IMC (Anexo A) (M. Mancini, 2015). O diagnóstico de obesidade é considerado quando o IMC está acima do percentil 95 (P95) ou do Z-IMC  $> +2$  desvios padrão para idade e sexo; é considerado sobrepeso quando o IMC está entre os percentis 85 e 95 (P85-95) ou Z-IMC entre  $+1$  e  $+2$  (Wang et al., 2002).

**Tabela 1.** Diagnóstico de composição corporal em crianças de zero a dez anos de idade incompletos de acordo com o escore Z do IMC.

VALORES CRÍTICOS		ÍNDICES ANTROPOMÉTRICOS						
		CRIANÇAS DE 0 A 5 ANOS INCOMPLETOS			CRIANÇAS DE 5 A 10 ANOS INCOMPLETOS			
		Peso para idade	Peso para estatura	IMC para idade	Estatura para idade	Peso para idade	IMC para idade	Estatura para idade
<Percentil 0,1	<Escore z -3	Muito baixo peso para a idade	Magreza acentuada	Magreza acentuada	Muito baixa estatura para a idade	Muito baixo peso para a idade	Magreza acentuada	Muito baixa estatura para a idade
≥Percentil 0,1 e <percentil 3	≥Escore z -3 e <escore z -2	Baixo peso para a idade	Magreza	Magreza	Baixa estatura para a idade	Baixo peso para a idade	Magreza	Baixa estatura para a idade
≥Percentil 3 e <percentil 15	≥Escore z -2 e <escore z -1	Peso adequado para a idade	Eutrofia	Eutrofia	Estatura adequada para a idade <sup>1</sup>	Peso adequado para a idade	Eutrofia	Estatura adequada para a idade <sup>2</sup>
≥Percentil 15 e ≤percentil 85	≥Escore z -1 e ≤escore z +1		Risco de sobrepeso	Risco de sobrepeso			Sobrepeso	
>Percentil 85 e ≤percentil 97	>Escore z +1 e ≤escore z +2	Peso elevado para a idade <sup>1</sup>	Sobrepeso	Sobrepeso	Peso elevado para a idade <sup>1</sup>	Obesidade	Obesidade	Obesidade grave
>Percentil 97 e ≤percentil 99,9	>Escore z +2 e ≤escore z +3		Obesidade	Obesidade				
>Percentil 99,9	>Escore z +3							

Fonte: Organização Mundial da Saúde (OMS). Adaptado

**Tabela 2.** Diagnóstico de composição corporal em adolescentes de acordo com o escore Z do IMC

VALORES CRÍTICOS		ÍNDICES ANTROPOMÉTRICOS PARA ADOLESCENTES	
		IMC para idade	Estatura para idade
<Percentil 0,1	<Escore z -3	Magreza acentuada <sup>1</sup>	Muito baixa estatura para a idade
>Percentil 0,1 e <percentil 3	≥Escore z -3 e <escore z -2	Magreza	Baixa estatura para a idade
≥Percentil 3 e <percentil 15	≥Escore z -2 e <escore z -1	Eutrofia	Estatura adequada para a idade <sup>2</sup>
≥Percentil 15 e ≤percentil 85	≥Escore z -1 e ≤escore z +1		
>Percentil 85 e ≤percentil 97	>Escore z +1 e ≤escore z +2	Sobrepeso	Estatura adequada para a idade <sup>2</sup>
>Percentil 97 e ≤percentil 99,9	>Escore z +2 e ≤escore z +3	Obesidade	
>Percentil 99,9	>Escore z +3	Obesidade grave	

Fonte: Organização Mundial da Saúde (OMS). Adaptado

**Tabela 3.** Diagnóstico de sobrepeso e obesidade em adultos com base no IMC ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ):

Classificação	IMC ( $\text{kg}/\text{m}^2$ )	Risco de comorbidades
Baixo peso	< 18,5	Baixo
Peso normal	18,5-24,9	Médio
Sobrepeso	$\geq 25$	-
Pré-obeso	25,0 a 29,9	Aumentado
Obeso I	30,0 a 34,9	Moderado
Obeso II	35,0 a 39,9	Grave
Obeso III	$\geq 40,0$	Muito grave

Fonte: Organização Mundial da Saúde (OMS). Adaptado.

O tecido adiposo está anatomicamente distribuído em diferentes proporções no corpo humano, sendo este padrão de distribuição individual e dependente de vários fatores como: sexo, idade, raça, etnia, dieta, atividade física, níveis hormonais e medicamentos. Nos indivíduos com sobrepeso e obesidade, a localização do excesso de gordura é importante para melhor avaliar os riscos de saúde. Tanto a quantidade como a distribuição da adiposidade corporal devem ser adequadamente mensuradas. Assim, um padrão de distribuição androide de gordura (em tronco ou central) tem mais associação com a síndrome metabólica e risco cardiovascular para a saúde do que um padrão de distribuição ginecóide (em extremidades ou periférica) (Boyle et al., 2010; Polat et al., 2008). Para esta avaliação, a medida da circunferência abdominal (CA) reflete o conteúdo de gordura visceral. Esta medida é usada mundialmente. O paciente deve ser medido em posição ortostática, ereto, sem roupas e sapatos, no ponto médio da distância entre o rebordo costal inferior e a crista ilíaca, visto do aspecto anterior (M. C. Mancini, 2009; Polat et al., 2008).

A CA em adultos é um fator preditivo forte da quantidade de gordura visceral, a principal responsável pelo aparecimento de alterações metabólicas e de doença cardiovascular, como DM2 e hipertensão arterial sistêmica. Os pontos de corte preconizados pela OMS foram capazes de identificar indivíduos adultos com alto risco de doenças crônicas e apresentaram alta sensibilidade e especificidade na identificação de indivíduos classificados com sobrepeso e obesos pelo IMC (Cox et al., 2015; Polat et al., 2008).

**Tabela 4.** Referência dos pontos de corte para circunferência da cintura abdominal de acordo com a IDF (*International Diabetes Federation*)

Grupo étnico	Sexo	Circunferência de cintura (cm)
Europeus	Homem	≥ 94 cm
	Mulher	≥ 80 cm
Sul-asiáticos	Homem	≥ 90 cm
	Mulher	≥ 80 cm
Chineses	Homem	≥ 90 cm
	Mulher	≥ 80 cm
Japoneses	Homem	≥ 85 cm
	Mulher	≥ 90 cm
Centro e sul-americanos	Usar medidas sul-asiáticas até que estejam disponíveis referências específicas	
Africanos sub-saarianos	Usar medidas europeias até que estejam disponíveis referências específicas	

Fonte: Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica (ABESO). Adaptado

**Tabela 5.** Combinação das medidas de IMC e CA para análise de risco de complicações metabólicas.

Risco de complicações metabólicas	IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Circunferência abdominal (cm)	
		Homem: 94-102	102+
Baixo peso	< 18,5	Mulher: 80-88	88+
Peso saudável	18,5-24,9	-	Aumentado
Sobrepeso	25-29,9	Aumentado	Alto
Obesidade	≥ 30	Alto	Muito alto

Fonte: Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica (ABESO). Adaptado

Em 2006, foi publicada uma avaliação norte-americana dos últimos quatro NHANES (*National Health and Nutrition Examination Survey*) (1988-1994, 1999-2000, 2001-2002 e 2003-2004), na qual foi estabelecido o ponto de corte em relação ao sexo e à idade do percentil 90 da CA. Porém, ainda não foram definidos parâmetros de medida de CA para crianças e adolescentes e, embora nesta faixa etária este seja um bom preditor de adiposidade visceral, pode ser difícil detectar diferença na composição corporal por meio desse parâmetro devido à puberdade e às variações inter-raciais e étnicas (Boyle et al., 2010).

**Tabela 6.** Distribuição em percentis da circunferência abdominal segundo gênero e idade

Idade (anos)	BRANCOS						NEGROS					
	Meninos			Meninas			Meninos			Meninas		
	Percentil			Percentil			Percentil			Percentil		
	N	50	90	n	50	90	N	50	90	N	50	90
5	28	52	59	34	51	57	36	52	56	34	52	56
6	44	54	61	60	53	60	42	54	60	52	53	59
7	54	55	61	55	54	64	53	56	61	52	56	67
8	95	59	75	75	58	73	54	58	67	54	58	65
9	53	62	77	84	60	73	53	60	74	56	61	78
10	72	64	88	67	63	75	53	64	79	49	62	79
11	97	68	90	95	66	83	58	64	79	67	67	87
12	102	70	89	89	67	83	60	68	87	73	67	84
13	82	77	95	78	69	94	49	68	87	64	67	81
14	88	73	99	54	69	96	62	72	85	51	68	92
15	58	73	99	58	69	88	44	72	81	54	72	85
16	41	77	97	58	68	93	41	75	91	34	75	90
17	22	79	90	42	66	86	31	78	101	35	71	105

Fonte: Organização Mundial da Saúde (OMS). Adaptado

### 1.3. Fatores de risco para a obesidade em crianças e adolescentes

Os fatores de risco para a obesidade na infância e adolescência estão associados às condições familiares genéticas e ambientais (Lobstein et al., 2015b). Fatores genéticos estão envolvidos no ganho de peso de seres humanos (Bell et al., 2005). Estudos realizados no final dos anos 80 e início dos anos 90 com gêmeos e crianças adotadas indicaram que até 80% da variação do IMC é atribuída a fatores genéticos (Bouchard, 1992; Loos & Bouchard, 2003). Outros estudos baseados na composição corporal de gêmeos criados separados e estudos comparando a composição corporal de crianças adotadas com seus pais biológicos e com seus pais adotivos também sugerem forte influência genética sobre a composição corporal e distribuição da gordura (Barnes, 2007).

Atualmente, diferentes estratégias são utilizadas para abordar os determinantes genéticos da obesidade, incluindo estudos de associação, análises de varredura genômica (*genome-wide scan*), o estudo das formas monogênicas de obesidade e o estudo de síndromes genéticas com anomalias do desenvolvimento associadas à obesidade (Kousta et al., 2009). A última atualização do *Human obesity gene Map*, publicada

em 2006, apresentou 127 genes candidatos, resultado de 426 associações positivas com o fenótipo obesidade (Rankinen et al., 2006).

Dentre as obesidades genéticas já descritas, estão as monogênicas e as associadas a síndromes. A obesidade monogênica se caracteriza por uma mutação em genes que codificam proteínas com provável função na regulação de apetite. Nestes casos, a obesidade é o fenótipo mais evidente, com ganho de peso em idade muito precoce, e não há associação com síndromes genéticas (Bell et al., 2005). Estudos sobre formas monogênicas de obesidade revelaram diversos genes e mutações envolvidos no equilíbrio de energia, fornecendo entendimento sobre alguns dos mecanismos relacionados à regulação do peso corporal (Kousta et al., 2009). Mutações nos genes da leptina, no receptor da leptina, na pro-opiomelanocortina, no pró-hormônio convertase, no receptor-4 de melanocortina, e a presença do gene Fat mass and obesity-associated protein (FTO) afetam a regulação do apetite resultando em um fenótipo de obesidade grave devido à hiperfagia, indicando que estas vias são muito importantes na regulação do peso e adiposidade em seres humanos (Barness, 2007; Frayling et al., 2007).

As crianças com obesidade sindrômica apresentam outras alterações além do aumento de peso, em geral com atraso do desenvolvimento neuropsicomotor e características dismórficas específicas de sua síndrome (Mutch et al., 2006). Nestes indivíduos parece haver defeitos estruturais e/ou funcionais do hipotálamo que estão relacionados ao comportamento alimentar e a liberação de insulina, porém os mecanismos fisiopatológicos exatos não são totalmente conhecidos. Alguns exemplos destas síndromes são: Prader-Willi, Bardet-Biedl, Alström, Cohen, e o tumor de Wilms associado à aniridia, anomalias genitourinárias e deficiência intelectual (WARG). Em geral, o início da obesidade também é precoce (Barness, 2007; Mutch et al., 2006).

Quanto aos fatores ambientais, o peso da mãe antes da gravidez, o ganho de peso materno durante a gestação, fumo durante a gestação, desmame precoce e introdução inadequada de alimentos complementares, emprego de fórmulas lácteas incorretamente preparadas, não consumo do café da manhã, horas em frente à TV, consumo frequente de bebidas adoçadas, sedentarismo, consumo de alimentos frequente em restaurantes, baixo nível educacional materno e baixo nível socioeconômico contribuem para o ganho de peso na população infantil. De acordo com alguns estudos, o aleitamento materno está associado a uma redução na incidência de sobrepeso e obesidade na infância. Lactentes com aleitamento materno exclusivo por 3 a 5 meses apresentam probabilidade 35% menor de serem obesos

quando entram na escola. Estudos demonstram que há uma relação inversa entre a duração da amamentação e o risco de apresentar excesso de peso (Geloneze, Mancini, & Coutinho, 2009). Crianças pré-escolares tem 2,43 vezes mais chance de ter obesidade se os pais são obesos, e 2,22 vezes mais se a mãe apresenta baixo nível educacional, e 2,68 vezes mais se há restrição alimentar e a 1,56 vez mais se a criança assiste a mais de 2 h de TV por dia (Geloneze et al., 2009).

Os pais têm um papel importante no desenvolvimento das preferências alimentares e na atividade física de seus filhos (Geloneze et al., 2009). O diagnóstico de obesidade em qualquer período da infância aumenta o risco de o adolescente apresentar excesso de peso. Em lactentes este risco é de 3,63, em pré-escolares é 17,79 e em escolares é 6,87 vezes. Todas as fases da infância desempenham um papel importante na obesidade, porém, a adolescência representa um período crítico para o desenvolvimento do excesso de peso. Nessa etapa do crescimento, o indivíduo apresenta grande modificação da sua composição corporal, adquirindo aproximadamente 25% da sua estatura final e 50% da sua massa corporal (Geloneze et al., 2009; M. Mancini, 2015).

São extensos os estudos na literatura mostrando a importância e os benefícios do aumento da atividade física e da diminuição do sedentarismo associados com uma dieta equilibrada para redução e prevenção do excesso de peso. O ganho de peso é diretamente proporcional ao número de horas na frente da TV (Geloneze et al., 2009).

A obesidade é uma doença multifatorial que envolve uma complexa interação entre componentes genéticos e influências ambientais. A interação destes fatores genômicos sob influência ambiental pode esclarecer o aumento dos riscos de obesidade e comorbidades em todas as faixas etárias (Rönn et al., 2015).

#### **1.4. Epigenética, biomarcadores inflamatórios e metilação de DNA**

A influência do meio ambiente sobre o perfil genético de seres humanos, definida como epigenética, pode explicar o aumento da prevalência atual do sobrepeso, da obesidade e das doenças metabólicas associadas a este ganho de peso (Cox et al., 2015; Lobstein et al., 2015b).

A epigenética é um processo regulatório dinâmico que controla a expressão gênica sem alterar a sequência do DNA, que muda com a exposição ao ambiente. Uma vez mudadas, podem ser reversíveis ou ficar estáveis e serem herdadas nas próximas divisões celulares e serem

transmitidas geneticamente de uma geração para a outra (Akash, Rehman, & Chen, 2013). As mudanças epigenéticas são fortemente influenciadas pelo ambiente. Qualquer alteração ambiental, ataque de patógenos, tipo de alimentação pode acarretar em mudanças epigenéticas. O estresse ambiental é determinante na ocorrência de variações epigenéticas (Rönn et al., 2015).

Existem dois mecanismos principais envolvidos na epigenética: alterações nas histonas e padrão de metilação do DNA, que envolve modificações na estrutura das ligações covalentes do DNA. Esses mecanismos atuam modificando a acessibilidade da cromatina para a regulação da transcrição local ou global, pelas modificações no DNA pelas modificações ou rearranjos dos nucleossomos.

Os nucleossomos e as histonas são estruturas associadas ao DNA com a função de organização da cromatina. Mudanças na estrutura da cromatina influenciam a expressão dos genes, sendo que estes genes estão inativos quando a cromatina está condensada e são expressos quando a cromatina estiver aberta, ou seja, não condensada. Esses estados dinâmicos da cromatina são controlados por padrões epigenéticos reversíveis de metilação do DNA e de modificações das histonas. Quando o DNA estiver hipometilado, a cromatina estará ativa, permitindo a transcrição dos genes. Porém, quando o DNA estiver hipermetilado a cromatina estará inativa, impedindo a expressão dos genes.

A metilação do DNA consiste na adição de um radical metil (CH<sub>3</sub>) no carbono 5 da base nitrogenada citosina, que é seguida por uma base guanina. Após a adição do radical metil, a base nitrogenada metilada passa a se chamar 5-metil-citosina. Essa adição é feita por enzimas DNA-metil-transferases (DNMTs) que podem ser de 3 tipos: DNMT3A e DNMT3B, responsáveis por fazer novas metilações; enquanto a DNMT1 cuida da manutenção da metilação. A manutenção feita pela enzima DNMT1 é importante, uma vez que a desmetilação do DNA pode ocorrer de forma passiva ao longo das várias etapas da replicação. Se não houver a atividade da DNMT1, a citosina será desmetilada. A metilação do DNA leva ao recrutamento de proteínas que causam a compactação da cromatina, impedindo que a enzima RNA-polimerase se ligue à molécula. Dessa forma, não ocorre a expressão gênica, uma vez que a RNA-polimerase é a enzima responsável pela transcrição, ou seja, pela síntese de RNA a partir da informação contida na fita do DNA (Rönn et al., 2015; Rönn & Ling, 2015).

A modificação das histonas pode ocorrer por acetilação ou metilação. A acetilação consiste na adição de um radical acetil (COCH<sub>3</sub>) nos resíduos

de lisina das histonas e ocorre por meio de enzimas chamadas Histona Acetil-Transferases (HATs). A acetilação das histonas resulta na descompactação da cromatina, o que permite a expressão gênica. As enzimas Histonas Desacetilases (HDACs) retiram o radical acetil, promovendo a compactação da cromatina e inibindo a transcrição. A metilação das histonas é feita pelas enzimas HMTs (histonas metil-transferases) e, dependendo de onde ocorre, pode tanto suprimir quanto ativar genes (Bernstein, Meissner, & Lander, 2007).

Fatores epigenéticos estão envolvidos na regulação da expressão gênica e explicam parte dos mecanismos da interação entre genoma e fatores ambientais, e podem contribuir para o aparecimento de doenças comuns (Day et al., 2017; Rönn et al., 2015).

Alguns modelos de fatores epigenéticos em doenças complexas comuns, são por exemplo, gêmeos monozigóticos, que não apresentam 100% de concordâncias para doenças, devido às diferenças epigenéticas. Outro exemplo é a programação intraútero, onde o metabolismo fetal é adaptado para situações de privação de nutrientes. A alteração epigenética pode se intensificar com a exposição a um determinado ambiente. A memória metabólica continua em certa proporção presente nos pacientes que já foram obesos e conseguiram perder peso, por isso seguem sendo pacientes de risco para doenças cardiovasculares, também pode ser explicado por este mecanismo (Rönn et al., 2015).

Alguns estudos identificaram alterações da expressão de genes envolvidos em vias inflamatórias em adolescentes com obesidade quando comparados aos seus pares magros (Lobstein et al., 2015b). Estes achados sugerem uma explicação para a inflamação, com alteração na sinalização de insulina e função mitocondrial em obesidade e síndrome metabólica. Acredita-se que estas alterações transcriptômicas sejam devido à regulação epigenética (Rönn et al., 2015).

Biomarcadores são todas as características biológicas que podem identificar e/ou monitorar o curso de uma doença. Estes podem ser não invasivos como o cálculo do IMC e aferição da pressão arterial, e invasivos, como dosagem de glicemia, hemoglobina glicosilada A1c e níveis séricos de colesterol (Akash et al., 2013). Os biomarcadores genéticos podem ajudar a identificar indivíduos que correm mais risco de desenvolver doenças. A busca de biomarcadores é importante para identificar precocemente os riscos de obesidade, resistência insulínica, *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2), dislipidemia, hipertensão arterial sistêmica (HAS), síndrome metabólica (SM), e para prever a evolução da doença e prevenir a morbimortalidade, principalmente desfechos cardiovasculares (Akash et al., 2013).

Metilação aberrante do DNA tem sido descrita como a chave para estas doenças neurodegenerativas por reprimir a transcrição do DNA (Masliah, Dumaop, Galasko, & Desplats, 2013; Schlenzog et al., 2016; Smith et al., 2016). A influência dos fatores genéticos e ambientais na metilação de DNA fazem desta um biomarcador para doenças. Devido a essa ligação covalente, tem se tornado um biomarcador robusto (Rönn et al., 2015). Dieta rica em gorduras e açúcares promovem alteração da metilação do DNA (Rehman & Akash, 2016; Rönn et al., 2015). A expressão gênica do tecido adiposo e a secreção hormonal influenciam vários fenótipos metabólicos que podem cursar com doenças relacionadas à obesidade, como a SM (resistência insulínica, HAS, dislipidemia), DM2, insuficiência renal, esteatose hepática não alcoólica, alguns tipos de câncer e doenças cardiovasculares. A atividade física regular muda a metilação de DNA no tecido adiposo humano (Rönn et al., 2013). O envelhecimento também altera a metilação de DNA (Rönn et al., 2015).

Rönn et al. encontraram mudanças na metilação associadas ao envelhecimento, IMC e HbA1c séricos e em adipócitos para doenças metabólicas e câncer. Envelhecimento e aumento de IMC estão correlacionados a câncer, diabetes tipo 2 e doença cardiovascular (Rönn et al., 2015).

A hiperglicemia e hipertrigliceridemia crônicas também promovem mudanças epigenéticas no sistema nervoso central (SNC), causando uma maior suscetibilidade à neurodegeneração, comprometendo aprendizado e memória. Está descrito um declínio cognitivo relacionado às doenças crônicas causadas pelo ganho de peso, característicos de doenças como a obesidade, resistência insulínica, a síndrome metabólica e o DM2. A hiperglicemia crônica compromete o padrão de metilação do DNA em regiões do Sistema Nervoso Central (SNC), que compromete a expressão de genes neuroprotetores, aumentando o risco para alterações cognitivas, demências e doenças degenerativas (Craft, 2012).

### **1.5. O tecido adiposo e inflamação**

O tecido adiposo é um tecido metabolicamente muito ativo com peculiaridades genéticas em cada indivíduo, sob influência constante do meio ambiente. A obesidade foi reconhecida como doença em 1985 e, a partir de alguns estudos, foi definida como doença complexa, com sua própria fisiopatologia, comorbidades e incapacidades. Inicialmente a inflamação era considerada uma consequência da obesidade. Atualmente

há evidências de que o estado inflamatório crônico causado pelo consumo de alimentos ricos em açúcares e gorduras é causa de obesidade (Cox et al., 2015; Rehman & Akash, 2016).

Há dois tipos de tecido adiposo, o branco (TAB) e o marrom (TAM), que são diferentes em suas características e funções. O TAB tem a função de estocar energia em forma de triacilglicerol, deixando a célula aumentada de volume pelo acúmulo de gordura em seu interior. O TAM é responsável pela termogênese. São células menores que tem muitas mitocôndrias e produzem energia através da oxidação de ácidos graxos para gerar calor, sendo encontrado somente em fetos e recém nascidos (Molina, 2007). O TAB está distribuído em dois compartimentos, o subcutâneo e o visceral e secreta hormônios que interagem com o sistema imunológico e neurológico (Molina, 2007; Ota, 2015).

A visão estática do tecido adiposo no passado como órgão de reserva energética mudou para uma compreensão de um órgão que está em intensa atividade metabólica que participa do sistema endócrino e imunológico, contribuindo para homeostase energética (Rehman & Akash, 2016). Este tecido é composto por adipócitos, pré-adipócitos, linfócitos, macrófagos e células endoteliais. Além de estocar gordura com o excesso de calorias, os adipócitos secretam uma série de hormônios e células pró inflamatórias, que são citocinas e proteínas de fase aguda que, direta ou indiretamente, elevam a produção e circulação de fatores relacionados com inflamação (Rehman & Akash, 2016; Rönn et al., 2015). Uma disfunção desse tecido é comumente observada em indivíduos com ganho de peso, principalmente naqueles com predisposição genética à obesidade e suas comorbidades. (Cox et al., 2015; Lobstein et al., 2015b).

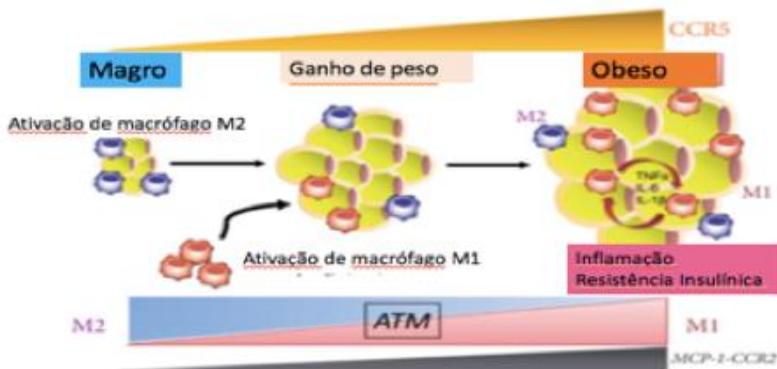
A obesidade e o sistema imunológico apresentam uma interação complexa e bidirecional (Das, 2001). Existem evidências demonstrando que o estado inflamatório pode ser devido à resistência à ação da insulina e outras desordens associadas à obesidade, como dislipidemia e síndrome metabólica. A inflamação pode ser o fator inicial responsável pelas comorbidades associadas à obesidade. A inflamação, inicialmente considerada uma consequência da obesidade, passou a ser visto como uma causa da obesidade. Das, em 2001, sugeriu que a obesidade é de fato o resultado de uma doença inflamatória (Das, 2001).

O consumo de dieta rica em açúcares e gorduras promove estas alterações porque leva a uma quebra na homeostase energética, com alterações na sinalização do apetite, saciedade, e gasto energético (Bray, 2014; Cox et al., 2015; González-Muniesa et al., 2017; Lobstein et al.,

2015b). Este consumo excessivo de carboidratos e gorduras leva a uma ativação de fatores pró-inflamatórios secretados pelo tecido adiposo, com consequente aumento do estresse oxidativo em vários tecidos. Esse processo, mediado pelo estresse oxidativo e por estas citocinas inflamatórias, interfere nos mecanismos de sinalização da insulina (Burke, 2006; Cox et al., 2015).

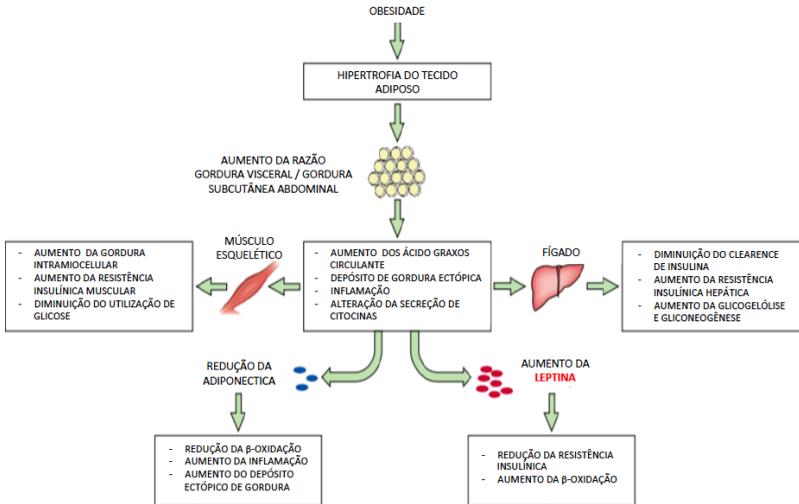
A alteração do metabolismo da glicose nas crianças com sobrepeso e obesidade tem início com a alteração da sinalização e secreção da insulina pela glicotoxicidade e lipotoxicidade. Este mecanismo ocorre de maneira insidiosa, primeiramente em célula beta do pâncreas, e depois em outros tecidos, evoluindo com hiperglicemia, que vai levar a uma diminuição progressiva da secreção de insulina pela célula beta pancreática, que fica resistente à insulina. Com a diminuição da secreção da insulina, também não há supressão adequada do glucagon, resultando em maior estado de hiperglicemia, e piora da sensibilidade à insulina, com piora da intolerância à glicose e resistência insulínica, que, por sua vez, pioram a alteração da secreção da insulina e também diminuem a sua sensibilidade, intensificando a resistência insulínica nos tecidos. Este estado de hiperglicemia crônica é responsável pela alteração da metilação do DNA, causando mudanças epigenéticas no indivíduo acometido, alterando a expressão de genes (Rehman & Akash, 2016; Rönn et al., 2013, 2015). Este mecanismo leva a uma gradativa falência de secreção de insulina por lesão de célula Beta e piora da sensibilidade à insulina com evolução para DM2. Embora no início este processo seja reversível, há um dano de célula beta, que será evidente se houver nova exposição aos mesmos estímulos (Akash et al., 2013).

O adipócito apresenta maior capacidade de armazenar gorduras que outras células, mas o aumento do fluxo de ácidos graxos livres para dentro da célula com o ganho de peso desencadeia o processo inflamatório crônico de baixo grau que leva a ativação de citocinas inflamatórias pelo tecido adiposo, chamadas de adipocinas, iniciando o processo de resistência insulínica, com formação de um tecido adiposo disfuncional, com aumento da quimiotaxia de macrófagos. Estes macrófagos que surgem neste tecido adiposo, apresenta uma atividade pró inflamatória mais intensa (macrófagos tipo 1 – M1) que os macrófagos tipo 2 – M2, que são os macrófagos encontrados em tecido adiposo em condições sem hipertrofia por excesso de alimentação como ilustrado na figura 1.



**Figura 1:** Ativação de macrófagos tipo 1 em pacientes com obesidade. Adaptado de Ota et al., 2013

Com essa resistência, aumenta o grau de glicotoxicidade e lipotoxicidade (Rehman & Akash, 2016). Uma vez desencadeado, este processo aumenta o estresse oxidativo em células beta da ilhota pancreática e tecidos periféricos, que impede a secreção de insulina pela célula beta e diminui a sensibilidade a insulina em células beta e tecidos periféricos, levando à hiperglicemia e a um processo inflamatório sistêmico, crônico, de baixo grau. Com a diminuição da secreção de insulina e o aumento da resistência à insulina nos tecidos, pioram os níveis de glicose na circulação e, conseqüentemente, piora o processo inflamatório (Rehman & Akash, 2016). A exposição crônica a este processo inflamatório, leva à ativação de várias vias de transcrição molecular e metabólica ( figura 2). (Rehman & Akash, 2016; Rönn et al., 2013, 2015).



**Figura 2:** Mecanismos e biomarcadores envolvidos na pré-diabetes em crianças e adolescentes. Adaptado de Weiss e colaboradores. *The Lancet Child and Adolescent Health* (2017).

As principais citocinas inflamatórias secretadas pelos adipócitos (adipocinas) são: leptina, TNF-alfa, IL-6, tecido inibidor de metaloproteinases-1, adiponectina, proteína ligadora retinóide e proteína quimiotática de monócito. A adiponectina é a única com ação anti-inflamatória. Todas as outras são pró-inflamatórias e têm ação local, no adipócito e também na circulação. A adiponectina melhora a sensibilidade à insulina e sua secreção é inversamente proporcional à quantidade de tecido adiposo (Rehman & Akash, 2016).

A proteína C-reativa (PCR), descrita inicialmente em 1930, é uma proteína de fase aguda da inflamação, produzida no fígado, em resposta ao estímulo das citocinas inflamatórias, sendo um marcador inespecífico de um processo inflamatório sistêmico (Rehman & Akash, 2016; Tillet & Francis, 1930). Este marcador vem sendo utilizado desde a década de 1970, para diagnóstico de estados inflamatórios e infecções. Em 1999, Visser et al. publicaram o primeiro trabalho relacionando obesidade em adultos e PCR. Desde então, várias outras pesquisas vêm sendo realizadas para elucidar tal associação (Visser, Bouter, McQuillan, Wener, & Harris, 1999).

A sua produção é fundamentalmente modulada pela IL-6, embora a IL-1 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) também participem desta modulação (Yudkin, Kumari, Humphries, & Mohamed-Ali, 2000).

Ratos *Knockout* para gene de IL-6 apresentam resposta inflamatória inadequada, enquanto os animais *Knockout* para IL-1 e TNF-alfa mantêm a produção das proteínas de fase aguda (Fantuzzi et al., 1996). Portanto, a PCR é um indicador direto dos níveis de IL-6 *in vivo* (Bataille & Klein, 1992).

A PCR faz parte da resposta imunológica inata e desempenha diversas funções. Sua principal função é ligar-se a patógenos e células lesadas e ou apoptóticas e iniciar sua eliminação por meio da ativação do sistema complemento e fagócitos. Ainda possui a capacidade de potencializar a produção de interleucinas como a IL-2, a IL-1 $\beta$ , o TNF  $\alpha$  e a IL-6 por macrófagos periféricos e monócitos sanguíneos (Choi et al., 2013; Ebersole, Machen, Steffen, & Willmann, 1997; Koenig & Khuseyinova, 2007).

A PCR é um constituinte normal do soro humano e, em condições normais, mantém concentrações baixas. Em uma condição inflamatória aguda, há elevação de seus níveis nas 6 a 8 horas iniciais, podendo atingir valores de até 300mg/dl em 48 horas. Apresenta características de boa reprodutibilidade e precisão (Koenig & Khuseyinova, 2007).

Os níveis elevados de PCR foram detectados em mais de 70 condições clínicas, incluindo infecções agudas, infarto agudo do miocárdio, doenças reumáticas e neoplasias. Após 2003, a PCR-US foi identificada não apenas como um marcador inflamatório de aterosclerose e eventos coronarianos, mas também um mediador de doença em função de sua contribuição na formação da lesão, na ruptura da placa e nos mecanismos de trombose coronariana. Seus efeitos diretos pró-aterogênicos estendem-se também às células musculares lisas, e assim suas funções como fator aterosclerótico e adicional com marcador de risco se fazem verdadeiros. Condições inflamatórias agudas e crônicas, infecciosas bacterianas, virais ou fúngicas, doenças reumatológicas, lesão tecidual e necrose promovem a liberação de IL-6 e outras citosinas por macrófagos e adipócitos, que desencadeiam a síntese hepática de PCR e fibrinogênio (Bodi et al., 2004).

Em concentrações conhecidas como preditoras de doença vascular, a PCR tem grande participação no favorecimento do estado pró-inflamatório, atuando na regulação endotelial da enzima óxido nítrico-sintase e também na transcrição das células endoteliais. Todo esse processo resultará na redução da liberação de óxido nítrico, também agindo em situações de isquemia crônica através da inibição da angiogênese, quando a PCR estiver presente em níveis elevados (S. Verma et al., 2002). A deficiência de óxido nítrico-sintase endotelial (eNOS) parece ser o ponto importante na aterogênese, levando assim a

aumento significativo das moléculas de adesão, os monócitos, e fazendo redução direta da expressão de eNOS (Venugopal, Devaraj, Yuhanna, Shaul, & Jialal, 2002). Age ainda como estimuladora de endotelina, reguladora das moléculas de adesão, facilitando também a entrada de LDL-colesterol no macrófago através da moléculas de proteína quimiotáxica de macrófago (MCP1), como observado em cultura de células de safena humana submetidas à PCR humana recombinante. É também regulador do fator nuclear kappa-beta, responsável pela facilitação de numerosos genes pró-ateroscleróticos, agindo ainda ao nível das prostaciclina vasodilatadoras, levando à redução de sua produção; alguns fármacos específicos podem atenuar esse processo (Venugopal, Devaraj, & Jialal, 2003; Subodh Verma et al., 2003). Há ainda ação ao nível das células endoteliais progenitoras e dos mecanismos de neovascularização, onde a PCR tem seu papel agente do mecanismo inibitório e compensatório de angiogênese em modelos de isquemia crônica. Possui também importante papel na instabilização da camada fibrosa do ateroma, através do estímulo da matriz da metaloproteinase-1 liberada com a degradação de colágeno e proteínas, assim como diminuindo a fibrinólise e promovendo a síntese do PAI-1. Observa-se um aumento da adesão e ativação plaquetária quando a PCR é liberada pelo fator tissular dos monócitos, reduzindo-se pelo óxido nítrico (NO) e pelas prostaciclina (Szmitko et al., 2003). A PCR age ainda como mediadora na formação da placa aterosclerótica, através de sua participação na inibição das proteínas mediadoras do complemento (Subodh Verma et al., 2004).

Pesquisas com crianças demonstraram associação entre PCR e altas concentrações de triglicérides, LDL e insulina, baixas concentrações de HDL e hipertensão arterial (Cook et al., 2000; Visser et al., 1999). Pesquisas tem demonstrado que a PCR constitui-se em um importante marcador de inflamação vascular subclínica crônica (inflamação de baixo grau) e de risco cardiovascular, apresentando valor preditivo positivo independente e adicional às dosagens de lípidos plasmáticos e presença de outros fatores de risco bem estabelecidos, através de estudos prospectivos (Grundy, Pasternak, Greenland, Smith, & Fuster, 1999; Zebreck, Muhlestein, Horne, & Anderson, 2002).. Níveis elevados deste marcador inflamatório têm sido associado à obesidade e ao diabetes mellitus, e diminuem com a perda de peso (Bulló, García-Lorda, Megias, & Salas-Salvadó, 2003; Trayhurn & Wood, 2004). É um biomarcador de inflamação local e sistêmica (Rehman & Akash, 2016).

Na população adulta, existem especulações se a elevação da PCR é consequência ou se está diretamente envolvida na fisiopatologia das doenças crônicas (Das, 2001). Níveis elevados deste marcador inflamatório têm sido associado à obesidade e ao diabetes mellitus, decaindo com a perda de peso (Bulló et al., 2003; Trayhurn & Wood, 2004).

Na infância a prevalência de doenças degenerativas é baixa, por isso a pesquisa deste marcador de inflamação nesta faixa etária é de grande valor para o esclarecimento dessas questões.

Uma metanálise mostrou uma correlação positiva de Pearson de 0,36 entre IMC e nível sérico de PCR (intervalo de confiança [IC] de 95%, 0,30-0,42) em adultos e 0,37 (IC, 0,31-0,43) em crianças (Choi et al., 2013).

Interleucina 1 beta (IL-1  $\beta$ ) é uma citocina produzida pela ativação de macrófagos que media a resposta inflamatória e está envolvida em proliferação e diferenciação celular e apoptose. Esta citosina pró-inflamatória induz a ativação transcripcional do gene NF-kb para a expressão de moléculas de adesão e citocinas. A IL-1  $\beta$  aumenta a expressão das moléculas de adesão endotelial, facilitando a agregação de outras células inflamatórias no endotélio ativado, e ainda, juntamente com o TNF-a, estimula a produção de IL-6 por células musculares lisas e aumenta a expressão de macrófagos, fator de crescimento derivado de plaquetas e fator de crescimento de fibroblastos, associados com a progressão do processo inflamatório da aterosclerose (Volp et al., 2008).

Quando há infecção ou dano tecidual, a IL-6 é prontamente sintetizada e ativa resposta imune aguda, induzindo a diferenciação de células B ativa em plasmócitos produtores de anticorpos e também células T CD4<sup>+</sup> imaturas em efetoras. Além disso, estimula hepatócitos para produção de proteínas de fase aguda como a PCR, proteína amiloide A sérica, fibrinogênio, hepcidina e antiqumiotripsina- $\alpha$ ; o aumento no nível dessas proteínas propaga um sinal de estresse emergencial, contribuindo, juntamente com a indução da hematopoiese, para a defesa do organismo (Heinrich PC et al, 1990). A IL-6 tem também a habilidade de estimular a ativação de células *natural killers* e a geração de linfócitos T citotóxicos (Takai Y et al, 1988; Okada M et al, 1988). A produção de IL-6 é regulada transcripcionalmente e pós-transcripcionalmente e, assim que o sistema volta a homeostase, a produção é interrompida. Todavia, em algumas doenças, a síntese

contínua e desregulada de IL-6 tem sido descrita, incluindo a obesidade (Donath, Dalmas, Sauter, & Böni-Schnetzler, 2013).

A IL-1 $\beta$  é o principal mediador que regula a expressão de vários outras citocinas pró inflamatórias. Induz a inflamação através da ligação com o receptor do tipo I da interleucina-1 (IL-1RI) e reduz a expressão do receptor de insulina substrato-1. A IL-1  $\beta$  está envolvida na patogênese do DM2 (Donath et al., 2013), mas pouco se sabe sobre seus níveis em crianças obesas. Recentemente, níveis elevados de IL-1  $\beta$  e interleucina 6 (IL-6) encontrados no primeiro dia de vida de recém natos foram associados com o aumento do IMC aos 2 anos de idade. Entretanto, após a análise da regressão linear múltipla, somente os níveis de IL-6 permaneceram significativamente associados ao aumento de IMC aos 2 anos (Perrin et al., 2017b).

O estresse oxidativo ocorre neste processo por causa do desequilíbrio entre a produção de espécies reativas do oxigênio (ROS) e o mecanismo antioxidativo contra a produção de ROS. A oxidação aumentada leva a maior lesão de célula B, adipócitos e tecidos periféricos (Rehman & Akash, 2016). O retículo endoplasmático é o local de maior produção de proteínas para a síntese de insulina e para a síntese de lipídeos e esterol. Qualquer estímulo que leva a um estresse deste local, leva à resistência à insulina em adipócitos e tecidos periféricos. O aumento de açúcares e gorduras na circulação ativa este mecanismo de estresse do retículo endoplasmático ativando a *c-Jun N-terminal kinases* (JNK) e inibindo a fosforilação da *Insulin Receptor Substrate-1* (IRS-1) nos tecidos adiposo e fígado, induzindo resistência insulínica e lesão de células endoteliais (Rehman & Akash, 2016, 2017).

O receptor de superfície extracelular da insulina está expresso em célula beta pancreática, cérebro, fígado, esqueleto, músculos e tecido adiposo (receptor *Toll like*). Em condições normais, este receptor regula a sensibilidade à insulina, mas quando em presença de processo inflamatório e ROS, gera sinal para a cascata inflamatória do sistema autoimune inato, levando ao desenvolvimento da resistência insulínica (Rehman & Akash, 2016, 2017).

Neopterin é um marcador produzido periféricamente pelos monócitos por interferon-gama (INF- $\gamma$ ) ou IL-1 $\beta$  encontrado nos fluidos biológicos de pacientes com doenças inflamatórias (Ghisoni et al., 2016; Grammer, Fuchs, Boehm, Winkelmann, & Maerz, 2009; Nageswara Rao G, Gurumurthy, E, & Cherian, 2013). Este é um marcador sensível para a ativação de imunidade celular em infecções e doenças neurodegenerativas, neurológicas e cardiovasculares (Ghisoni et al.,

2016; Grammer et al., 2009). O aumento da dosagem de neopterinina está associado a um aumento na produção de ROS e uma diminuição de antioxidantes (Murr, Widner, Wirleitner, & Fuchs, 2002). A neopterinina sérica foi avaliada e se mostrou elevada em crianças e adolescentes obesos na Índia (Nageswara Rao G et al., 2013), mas não estava elevada em adolescentes obesos na Áustria (Mangge et al., 2011a) e Turquia (Kabaroğlu et al., 2012).

### **1.6. Hiperglicemia e impacto no cérebro e na cognição**

Fatores genéticos são essenciais para desenvolver vários tipos de doenças neurodegenerativas e metabólicas, como DM, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, mas não explicam o total desenvolvimento destas doenças. Há fatores ambientais que potencializam a predisposição para o aparecimento destas doenças (Landgrave-Gã<sup>3</sup>mez, Mercado-Gã<sup>3</sup>mez, & Guevara-Guzmã;n, 2015). Acredita-se que modificações epigenéticas contribuam para o aparecimento de algumas doenças que comprometem o SNC (Landgrave-Gã<sup>3</sup>mez et al., 2015).

Estudos apontam a hiperglicemia crônica como sendo fator de risco para alterações cognitivas, demência e doenças degenerativas, com declínio cognitivo e redução de volume de hipocampo. A presença destas alterações é aumentada no grupo de pacientes com diabetes quando comparado ao grupo de não diabéticos, (Crane, Walker, & Larson, 2013). Esta hiperglicemia crônica aumenta o risco de demência e doenças neurodegenerativas tanto em pacientes diabéticos (40%) quanto em não diabéticos (18%)(Crane et al., 2013). Na doença de Parkinson, 50 a 80% dos pacientes são intolerantes à glicose, com o agravante do uso da medicação L Dopa, que é hiperglicemiante, intensificando a hiperglicemia e resistência insulínica previamente existente (Boyd, Lebovitz, & Feldman, 1971; D'Amelio et al., 2009; Dunn et al., 2014). Pacientes com doença de Parkinson associados ao DM2 apresentam um comprometimento motor e cognitivo muito mais severos (Finglewicz et al., 1996). Recentes estudos demonstraram um efeito protetor com o uso drogas anti-diabéticas nestes pacientes (Brauier et al., 2015). A doença de Alzheimer também é atribuída a um acúmulo metabólico a longo prazo no cérebro, somada aos fatores do envelhecimento (Craft, 2012). O processo inflamatório de baixo grau que ocorre na hiperglicemia crônica se manifesta também no cérebro, com necessidade de investigar marcadores inflamatórios sistêmicos e locais.

Há um biomarcador importante chamado repressor *element-1 silencing transcription factor* (REST), que é um fator de transcrição silenciador, e atua como neuroprotetor, diminuindo a expressão de genes ligados à morte celular em neurônios diferenciados e aumentando a expressão de outros genes que induzem à resistência ao processo de envelhecimento e preservam a função cognitiva (Dallagnol et al., 2017; Lu et al., 2014). A exposição do organismo à hiperglicemia crônica pode aumentar o risco de modificações epigenéticas deste fator REST, comprometendo a cognição e levando à neurodegeneração, e é justamente essa linha de pesquisa que nosso grupo investiga.

### 1.7. Modelo Experimental de Hiperglicemia Crônica e Cérebro

A fim de investigar os efeitos da hiperglicemia crônica e sua correlação com doenças neurodegenerativas, alterações cognitivas e demência, nosso grupo pesquisou marcadores inflamatórios e metilação de DNA em ratos *Wistar* adultos que foram submetidos a hiperglicemia com estreptozotocina produzindo um modelo experimental de diabetes. Neste modelo, a hiperglicemia crônica diminui a sensibilidade à insulina e aumentou o estresse oxidativo em ratos adultos *Wistar* e observamos:

Redução da produção de insulina, redução da altura das ilhotas, aumento da glicose sérica.

A manutenção do estado de hiperglicemia provoca a diminuição de peso devido à falta de insulina circulante. Este estado de hiperglicemia melhora com o tratamento com insulina.

Também reduz a leptina e leva a uma hiperfagia.

A alteração leva a um aumento de lipídios e aumento de triglicerídeos.

Aumento da gordura visceral

Aumento dos marcadores de estresse oxidativo no líquido cefaloespinal, com maior quantidade de peroxidação de lipídeos e redução dos níveis de Thiol e TET rahydrobiopterina. Também melhora se tratar com a insulina

Aumento do methioglixol cerebral, maior precursor para a formação de *Advanced Glycation End Products* (AGEs), que também leva à neurodegeneração.

Todos diminuem a insulina circulante e aumentam o estado de estresse oxidativo, e melhoram com o tratamento com insulina.

Redução da ativação de ERK, prejudicando a memória de longa duração (LMT)

Com a redução da ativação do ERK, também reduz o Fator neurotrófico cerebral (BDNF), reduzindo a memória espacial e plasticidade de memória.

Observou-se então que, nos modelos experimentais, este mecanismo é deletério ao cérebro. A expressão gênica alterada do hipocampo e o estresse induzido por hiperglicemia levou ao aumento de marcadores inflamatórios no cérebro, diminuição da síntese de neuroprotetores e diminuição da síntese de energia que levam à diminuição de desempenho cognitivo. Também foi encontrado um significativo aumento de IL10 e aumento de GFAP - astrogliose induzida por doença metabólica crônica. Embora estes resultados experimentais não sejam parte integrante desta tese, eles justificaram as avaliações realizadas nas crianças obesas que apresentamos aqui e que compuseram a abordagem translacional de um dos artigos anexos a esta tese.

### **1.8. REST, Metilação de DNA e neuroplasticidade cerebral**

O REST é um fator neuroprotetor de transcrição gênica silenciador que atua no núcleo das células como regulador de determinados genes, desligando alguns genes que promovem a morte celular. Há evidência de uma expressão elevada durante a fase de embriogênese. Uma alteração deste fator pode levar à apoptose celular e causar a morte e sua expressão volta a se evidenciar em idosos sem problemas neurológicos, enquanto que nas doenças neurodegenerativas a expressão está diminuída (Noh et al., 2012). O REST portanto atua em neurônios desde o desenvolvimento fetal até o envelhecimento, estando envolvido na plasticidade neuronal, com efeito anti-inflamatório, protegendo o cérebro contra insultos como o envelhecimento, diminuição de aporte energético, inflamação e estresse oxidativo (Dallagnol et al., 2017). O REST controla a plasticidade sináptica, crescimento axonal, transporte vesicular e liberação e condução iônica (Noh et al., 2012).

A expressão do REST ocorre em situação de baixa metilação, e o estado de insulto metabólico crônico pela hiperglicemia leva a uma hipermetilação do DNA, levando a uma expressão diminuída deste fator. O nível de metilação do DNA é mantido por dois principais grupos de enzimas chamadas *DNA metiltransferases* (DNMT) e *ten-eleven translocation* (TET). DNMTs adicionam um grupo metil na posição 5 da citosina, que gera a 5-metilcitosina (5-mC), o principal marcador genético. Padrões de metilação de DNA são inicialmente estabelecidos pelas metiltransferases de novo DNMT3A e DNMT3B e mantem a metiltransferase DNMT1 durante a divisão celular (Okano, Bell, Haber,

& Li, 1999). De uma forma semelhante, a hidroximetilação do DNA provocada pela oxidação de 5-mC em 5-hidroximetilcitosina (5hmC), através da enzima TET, controla a expressão gênica, já que é um produto do processo de desmetilação do DNA. (Wu & Zhang, 2010). As enzimas TETs podem continuar oxidando o 5-hmM em 5-formilcitosina e 5-carboxilcitosina, que pode ser removido do genoma (Noh et al., 2012).

O nível de metilação de DNA tem um papel na expressão gênica e a alteração da metilação do DNA aumenta o risco de doenças neurodegenerativas, neurológicas e metabólicas. A hipermetilação do DNA ocorre quando há redução da desmetilação, e é alterado por doenças metabólicas crônicas, como a hiperglicemia e o DM2, e a hidroximetilação do DNA global vai estar diminuída devido a baixa expressão do TET3 no hipocampo de rato (Noh et al., 2012).

Neste nosso estudo em ratos *Wistar* submetidos à hiperglicemia crônica, os animais apresentaram um aumento na metilação do DNA e redução na metilação do LINE-1 especialmente em hipocampo, quando o gene é silenciado. Houve aumento da metilação no promotor do REST no hipocampo dos animais, com diminuição da expressão do REST e aumento da expressão do REST4, um fator tóxico. O aumento na metilação de DNA também reduz muitos fatores de transcrição, NRF1, BDNF, MECP2, RxR2, TAF-1, entre outros. O REST é ligado a baixa metilação, se há aumento na metilação, há diminuição da expressão do REST e do BDNF (Noh et al., 2012).

Outro estudo experimental realizado por nosso grupo utilizando ratos mais velhos mostrou que houve aumento do REST e diminuição de fatores pró-inflamatórios IL-1B e IL-10 em ratos que faziam atividade física. O trabalho evidenciou aumento da expressão do REST e diminuição da expressão de IL-1B e IL-10 no hipocampo dos ratos que fizeram atividade física quando comparados aos sedentários, mostrando que o exercício aumenta a neurogênese (Dallagnol et al., 2017).

O REST está envolvido em um amplo espectro de doenças não neurológicas como câncer, diabetes e doenças cardíacas (Noh et al., 2012). O mecanismo de neurodegeneração ainda não está claro, mas sabe-se que um insulto como isquemia, estresse oxidativo e inflamação levam a uma remodelação da cromatina, fazendo alteração epigenética deste fator (Medford, Cox, Miller, & Marsh, 2014).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Avaliar a existência de associação entre a variação nos níveis de metilação de DNA, e do fator neuroprotetor REST em linfócitos de sangue periférico e níveis de marcadores inflamatórios e obesidade em crianças.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Comparar os níveis de alterações da metilação de DNA e da expressão gênica do fator neuroprotetor REST em linfócitos de sangue periférico entre crianças obesas e não-obesas;
- Avaliar a existência de associação entre os níveis de alterações da metilação de DNA e da expressão gênica do fator neuroprotetor REST em linfócitos de sangue periférico e o índice de massa corporal em crianças com obesidade;
- Avaliar a existência de associação entre os níveis séricos do anti oxidante ácido ascórbico e os níveis de metilação de DNA em linfócitos de sangue periférico em crianças com e sem obesidade.
- Comparar os níveis séricos de PCR-ultrassensível, IL-1 $\beta$  e neopterinina em crianças obesas e não-obesas;



### 3. JUSTIFICATIVA

A Organização Mundial de Saúde (OMS) aponta a obesidade como um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. Em 2016, a OMS registrou 39% da população mundial adulta com sobrepeso e 13% está obesa, destacando o aumento da prevalência na população infantil. O aumento do número de crianças obesas é um alerta para maior morbimortalidade, sendo o principal fator para doenças crônicas como a síndrome metabólica, o *diabetes mellitus* tipo 2, a hipertensão arterial sistêmica, as dislipidemias e doenças cardiovasculares. A obesidade e o sistema imunológico apresentam uma interação complexa e bidirecional.

Fatores genéticos são essenciais para o desenvolvimento de várias doenças crônicas, mas há fatores ambientais que potencializam a predisposição para o aparecimento destas. Alterações epigenéticas têm sido estudadas e descritas como importantes modificadores da expressão destas doenças.

O estado inflamatório crônico da obesidade e da hiperglicemia promovem disfunção na metilação de DNA, modificando a expressão de genes que são essenciais para a sobrevivência celular. Da mesma forma, a hiperglicemia crônica pode ativar a neuroinflamação no hipotálamo, afetando a capacidade da resposta à saciedade e a estímulos adipostáticos e, com isso, promover um declínio cognitivo com possível evolução para demência e neurodegeneração.

Biomarcadores inflamatórios podem ajudar a identificar indivíduos que possuem maior risco de desenvolver doenças crônicas. Entre esses biomarcadores, a metilação de DNA pode ser importante para identificar possíveis mudanças epigenéticas. Identificar biomarcadores inflamatórios associados com obesidade infantil pode ser útil para diagnóstico, seguimento, identificação de alvos terapêuticos e prever desfechos a curto e longo prazo.



## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Aspectos Éticos**

O trabalho foi realizado considerando os pressupostos éticos da resolução CNS 466/12. Foi obtido TCLE e assentimento de todos os pacientes para a inclusão no estudo. O Projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para Pesquisa em Humanos da Universidade federal de Santa Catarina (CAAE 33173314.7.0000.0121 // Número do parecer 724.414)

Os materiais e métodos empregados nesta tese de doutorado estão relacionados a 2 estudos apresentados respectivamente em 2 capítulos:

- Capítulo I - Biomarcadores da Obesidade Infantil e Síndrome Metabólica: Metilação de DNA e REST
- Capítulo II - Níveis séricos de Proteína C Reativa Ultrassensível, Interleucina 1 beta e Neopterinina em Crianças Brasileiras Obesas: Estudo Caso-Controlle

### **4.1. CAPÍTULO I – Biomarcadores da Obesidade Infantil e Síndrome Metabólica: Metilação de DNA e REST**

#### **4.1.1. Tipo de estudo**

- Estudo analítico, observacional, caso-controlle

#### **4.1.2. População e amostras analisadas**

Amostras de sangue foram obtidas através de punção venosa em 53 pacientes pediátricos consecutivos, brancos, acompanhados no ambulatório de Endocrinologia Pediátrica do Hospital Universitário (UFSC) e Hospital Infantil Joana de Gusmão (HIJG) em Florianópolis, entre maio de 2015 e maio de 2016. Os pacientes eram acompanhados devido ao diagnóstico isolado de obesidade (n=31), obesidade associada a outro diagnóstico (n=05), pacientes sem obesidade com outras patologias (n=11) e seis crianças saudáveis, sem patologia. As variáveis do exame físico analisadas foram: peso, altura, cálculo do IMC, pressão arterial, medida circunferência abdominal.

A amostra de sangue foi coletada para a análise da rotina laboratorial e o excedente utilizado para as análises propostas para esta pesquisa. Todos os participantes estavam clinicamente estáveis, sem

doenças infecciosas, e sem uso de medicamentos anti-inflamatórios nos 60 dias que precederam a coleta. Pacientes com neoplasia, doenças inflamatórias reumatológicas eram excluídos.

A avaliação laboratorial de rotina incluiu: glicemia, hemoglobina glicada, colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, triglicerídeos, creatinina, TGO, TGP, LH, FSH, estradiol, testosterona, TSH, T4 livre foram avaliadas no Laboratório de análises clínicas do Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago, e no Ciência Laboratório Médico, no Hospital Infantil Joana de Gusmão.

#### **4.1.3. Quantificação de metilação de DNA e REST**

As análises laboratoriais bioquímicas específicas relacionadas aos objetivos desta tese foram realizadas no laboratório de Bioquímica, Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo, coordenado pela Prof. Dra. Alexandra Latini, na UFSC. Após as amostras de sangue de crianças serem coletadas através de venopunção de veia cubital mediana em tubos com citrato de sódio 3,2% (Altermed, Rio do Sul, SC, Brasil) o plasma foi isolado por centrifugação a 700 giros por minuto por 20 minutos e utilizado para medir a glicose, produtos finais da glicosilação (AGEs), neopterinas e ácido ascórbico.

Células mononucleares de sangue periférico: o sangue foi diluído em um volume de solução de HANK's (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Após misturar cuidadosamente, o sangue diluído foi adicionado ao mesmo volume de Ficoll Paque e centrifugado a 1000 x g por 20 minutos. A camada média opaca foi separada como células mononucleares de sangue periférico e lavada 3 vezes, e após, utilizada para medir atividade de complexo I e marcadores epigenéticos.

Concentração de neopterinas no sangue: amostras de plasma foram precipitadas pela adição de um volume de 5% de ácido tricloroacético, após centrifugadas a 14000 x g por 10 minutos a 4 °C. Vinte microlitros de sobrenadante foi transferido para análise em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Aliance e2695, Waters, Midford, USA). Os sobrenadantes foram injetados em um sistema de acetato de sódio 50nM, ácido cítrico 5mM, EDTA 48µM e dithioerythritol 160µM. A identificação e quantificação de neopterinas foi feita por detector de multicomprimento de onda (module 2475, Waters, Milford, USA) com excitação do comprimento de onda de 350

nm e emissão de 430nm (Guisoni et al 2015). Sob estas condições, o tempo de retenção de neopterinas foi de aproximadamente 2,9 minutos, e tempo total de 5 minutos. Os resultados foram expressados em nmol/L.

Níveis de ácido ascórbico: as amostras de plasma foram precipitadas pela adição de volume de 5% de ácido metafosfórico e centrifugadas a 14000 x g por 10 minutos a 4 graus C. 20 microlitros de sobrenadante foi transferido para HPLC (Aliance e2695, Waters, Midford, USA) para análise. Esta fase consiste em 90mM de fosfato de sódio, 50mM de ácido cítrico, 2,5mM de heptanesulfonato, 50µM EDTA e 200mM de cloreto de sódio. A detecção foi realizada por um detector eletroquímico (module 2465, Waters, Midford, USA).

Níveis séricos de AGEs: amostras de plasma foram diluídas e testadas por componentes de Mailard (Remor et al.,2011). A detecção da fluorescência foi realizada em 370nm (excitação) e 440nm (emissão) com o uso de espectrofotômetro de fluorescência Tecan GmbH M200 (Tecan, Grödig/Salzburg, Áustria).

Atividade do Complexo I de células mononucleares de sangue periférico: o sedimento final de células mononucleares de sangue periférico foi suspenso em 4,4mM de fosfato de potássio em pH de 7,4, contendo 0,3 M de sucrose, 5mM MOPS, 1mM EGTA e 0,1% de albumina sérica bovina, para a avaliação de atividade de complexo I mitocondrial. Este foi medido por taxa de redução de NADH-ferricianida dependente em 420 nm. A atividade da enzima foi medida usando espectrofotômetro Varian Cary 50, com controle de temperatura (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA).

Determinação proteica: a concentração proteica foi determinada de acordo com Lowry et al. (1951) usando albumina sérica bovina como padrão (Hansen, 1951).

#### **4.1.4. Análise Estatística**

Os resultados obtidos das amostras foram analisados pelo teste “t” de Student ou ANOVA seguida do teste post hoc de Turkey quando indicado. Para avaliar as diferenças entre os grupos foi utilizado um nível de significância de  $p \leq 0,05$ . As análises foram realizadas com auxílio do Software SPSS (17.0) e as figuras através do GraphPad Prism 6.

## **4.2. CAPÍTULO II – Níveis séricos de Proteína C Reativa Ultrassensível, Interleucina 1 beta e Neopterin em Crianças Brasileiras Obesas: Estudo Caso-Controlle**

### **4.2.1. Tipo de estudo**

- Estudo analítico, observacional, caso-controlle

### **4.2.2. População e amostras analisadas**

As análises foram realizadas nas mesmas amostras de sangue dos pacientes e descritos no capítulo I. As variáveis demográficas, clínicas e laboratoriais de rotina investigadas foram as mesmas descritas no capítulo I.

As análises relacionadas aos objetivos do capítulo II foram realizadas no laboratório de Bioquímica, Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo, coordenado pela Prof. Dra. Alexandra Latini, na UFSC conforme descrito abaixo.

### **4.2.3 Quantificação da Neopterin, IL-1 $\beta$ e PCR-US- Artigo II**

PCR-US sérica foi determinada por fotolorimetria (Dimension RXL, Siemens). Os resultados foram expressos em mg/L.

IL-1  $\beta$  sérica foi determinada por kits de ELISA para dosagem de citocina humana de ReD Systems (Minneapolis, MN, USA). Os níveis de citocinas foram estimados por interpolação a partir de uma curva *standard* por medidas de calorimetria por a 450 nm (correlação de medida de onda de 540 nm) na placa de leitura do ELISA (Infinite 200 PRO TECAN Switzerland). A sensibilidade intra e inter ensaio foi de 1,5 pg/mL com coeficiente de variação < 10%. Os resultados foram expressos em pg/mL.

Os níveis de neopterin sérica foram feitos por ELISA, usando um kit comercial (IBL internacional GmbL, Hamburg, Germany). Os níveis de neopterin foram estimados por interpolação a partir de uma curva *standard* por medidas de calorimetria por a 45 nm na placa de leitura do ELISA (Infinite 200 PRO TECAN Switzerland) e expressos por nmol/L.

#### 4.2.4. Análise Estatística

As variáveis categóricas foram analisadas pelo Teste exato de Fisher e as variáveis contínuas foram analisadas pelo Teste “t” de Student. Regressões lineares uni e multivariadas foram usadas para identificar as variáveis preditivas independentes de níveis séricos de biomarcadores de interesse (variáveis dependentes). Regressão logística univariada e binária múltipla foi feita para identificar as variáveis preditivas independentes de obesidade (variáveis dependente). Variáveis preditivas que tenham mostrado uma associação com obesidade com o  $p < 0,15$  na análise univariada foram incluídos na regressão múltipla. Como havia uma hipótese com plausibilidade biológica e clínica previamente estabelecida e a amostra de pacientes relativamente pequena, não foi realizada correção para múltiplas comparações e valores de  $p < 0,05$  foram consideradas estatisticamente significativos.



## **5. RESULTADOS**

A apresentação dos resultados será realizada separadamente de acordo com os 2 capítulos aos quais estão respectivamente vinculados.

### **5.1. Capítulo I: Biomarcadores da Obesidade Infantil e Síndrome Metabólica: Metilação de DNA e REST**

### **5.2. Capítulo II: Níveis séricos de Proteína C Reativa Ultrassensível, Interleucina 1 beta e Neopterinina em Crianças Brasileiras Obesas: Estudo Caso-Controlado**

### **5.3. CAPÍTULO I – Biomarcadores da Obesidade Infantil e Síndrome Metabólica: Metilação de DNA e RES**

As variáveis demográficas e clínicas são apresentadas na Tabela 7 e evidenciaram o peso, o IMC, a CA, a PA e o modelo de avaliação de homeostase (homeostasis model assessment-insulin resistance [HOMA-IR]) mais elevados nas crianças com obesidade. Dentre as crianças com obesidade 35,3% apresentaram dislipidemia, 14,7% de hiperinsulinemia e 8,8% de hiperglicemia.

**Tabela 7.** Características clínicas das crianças obesas e controles.

<b>Características Clínicas</b>	<b>Crianças obesas (n = 36)</b>	<b>Controles (n = 17)</b>
Idade (anos)	11.3 ± 2.9	10 ± 3.4
Feminino (n; %)	14; 43.7	9; 47.4
IMC (kg/m <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	28.7 ± 6.0	17.0 ± 2.6
Peso (kg)	67.1 ± 25.5	32.0 ± 12.8
Circunferência Abdominal (cm)	85.1 ± 31.2	60.6 ± 7.7
Autismo(n; %)	-	1; 5.2
Hipotireoidismo (n; %)	3; 8.8	4; 21.0
Deficiência de GH (n; %)	-	5; 26.3
Deficiência Cardíaca Congenita(n; %)	-	1; 5.2
Hipertensão Arterial (n; %)	2; 5.9	-
Litíase Renal (n; %)	-	1; 5.2
Hiperplasia Adrenal (n; %)	-	1; 5.2
Dislipidemia (n; %)	12; 35.3	1; 5.2
Hiperglicemia (n; %)	3; 8.8	-
Hiperinsulinemia (n; %)	5; 14.7	-
Puberdade Precoce (n; %)	-	1; 5.2
Telarca Precoce (n; %)	-	1; 5.2
HOMA-IR <sup>b</sup>	2.3 ± 3.2	1.7 ± 2.5
Pressão Arterial Sistêmica (mmHg)	104.2 ± 36.5	94.4 ± 9.2
Pressão Arterial Diastólica (mmHg)	65.1 ± 23.1	53.8 ± 10.4

<sup>a</sup>Valor normal: 5<sup>o</sup> – 85<sup>o</sup> percentil; risco de sobrepeso: 85<sup>o</sup> – 95<sup>o</sup> percentil; obesidade: > 95<sup>o</sup> percentil.

<sup>b</sup> Do inglês homeostasis model assessment-insulin resistance: valor de corte determinado para a população brasileira 2.5 (Madeira et al., 2005)

Foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os obesos e controles nos níveis de triglicérides ( $p < 0,01$ ), de HDL ( $p < 0,001$ ), de LDL ( $p < 0,1$ ) e interleucina-1beta ( $p < 0,05$ ), dados que estão na Tabela 8.

**Tabela 8.** Perfil Laboratorial das crianças obesas e controles.

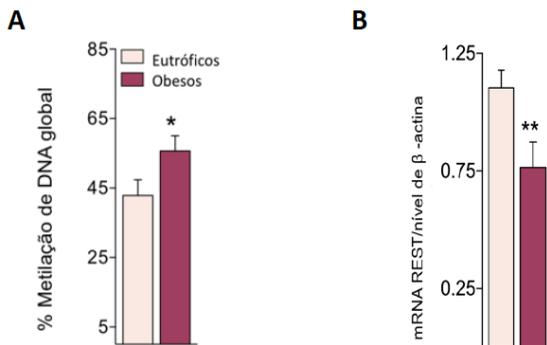
Concentração de Biomarcadores (valores de referência)	Crianças obesas (n = 36)	Controles (n = 17)
Glicose, mg/dL (70 – 110)	89.9 ± 11.9	87.0 ± 9.2
Insulina, $\square$ IU/mL (1.29 – 23)	23.1 ± 28.3	12.6 ± 15.5
HbA1C, % (4 – 6)	5.02 ± 0.4	5.02 ± 0.4
Triglicérides, mg/dL (< 130)	106.6 ± 52.0	67.9 ± 37.0**
Colesterol Total mg/dL (< 170)	158.5 ± 47.0	146.9 ± 48.7
Colesterol de alta densidade (HDL), mg/dL (> 60)	36.8 ± 6.8	49.4 ± 12.2***
Colesterol de baixa densidade (LDL), mg/dL (< 100)	98.5 ± 34.0	88.4 ± 36.0**
Aspartato aminotransferase, U/L (< 39)	23.2 ± 8.1	22.9 ± 5.9
Alanina transaminase, U/L (mulher < 31; homem < 41)	23.1 ± 6.5	16.9 ± 6.5
Proteína C reativa mg/L (< 5.0)	4.1 ± 6.1	3.8 ± 7.8
Interleucina-1 $\beta$	155.1 ± 269.0	66.3 ± 114.7*

\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ , Teste “t” de *Student* para variáveis independentes;

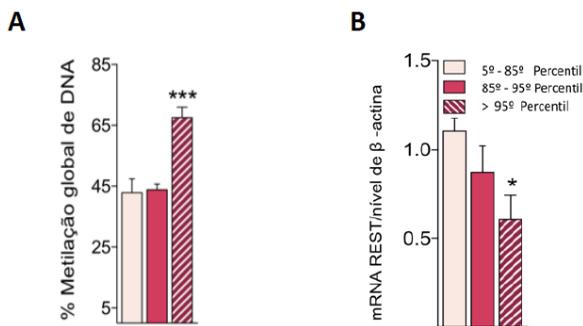
Níveis de referência de acordo com a Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial (sbpc.org.br).

As variáveis clínicas, de antropometria e bioquímica do grupo de crianças obesas e controles eutróficos está apresentado nas tabelas 7 e 8. Após a análise de células mononucleares de sangue periférico das crianças obesas e do grupo controle, evidenciou-se um aumento global de metilação de DNA (Figura 3A) e uma redução da expressão do REST (Figura 3B) e um aumento do promotor de metilação do REST nas amostras de sangue das crianças obesas (Figura 6A). Uma análise mais minuciosa demonstrou que estas modificações foram observadas no grupo com o percentil acima de 95, sugerindo que níveis de maior gravidade da obesidade estão associados à mudanças na regulação da metilação de DNA. (Figuras 4A e 4B) O aumento de uma unidade no IMC leva a um aumento de 0.5% de metilação de DNA ( $r = 0.7251$ ;  $r^2 = 0.54$ ;  $P < 0.01$ ) (Figura 4). Os níveis séricos de ácido ascórbico das crianças obesas também mostraram-se diminuídos quando comparados às crianças controle (Figura 6B). Como é mostrado esquematicamente na figura 7, esta redução do ácido ascórbico pode acarretar uma diminuição da expressão do TETs e acarretar modificações epigenéticas

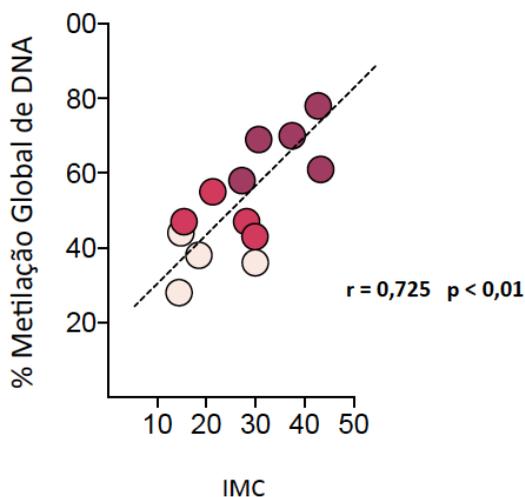
já que a redução da expressão do TETs levaria a uma diminuição do processo da demetilação do DNA, levando a hipermetilação.



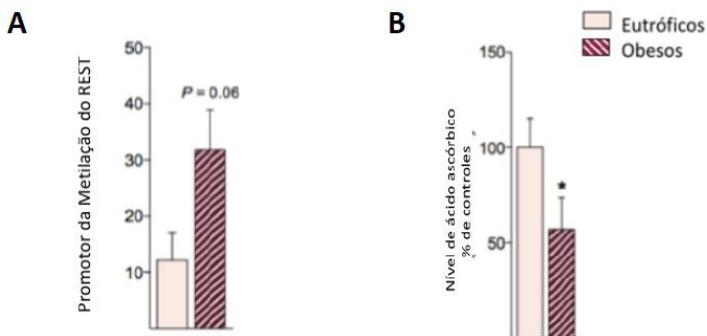
**Figura 3.** Níveis de metilação global de DNA e expressão do REST em linfócitos de crianças obesas e eutróficas. A) Variação nos níveis de metilação global de DNA expressos em porcentagem de metilação do DNA global; B) Níveis de expressão do REST expressos em mRNA de REST por nível de β-actina. As análises foram realizadas em linfócitos do sangue de crianças obesas (n = 34) e eutróficas (n = 19). Comparações feitas pelo teste “t” de Student, sem \* p < 0.05 e \*\* p < 0.01.



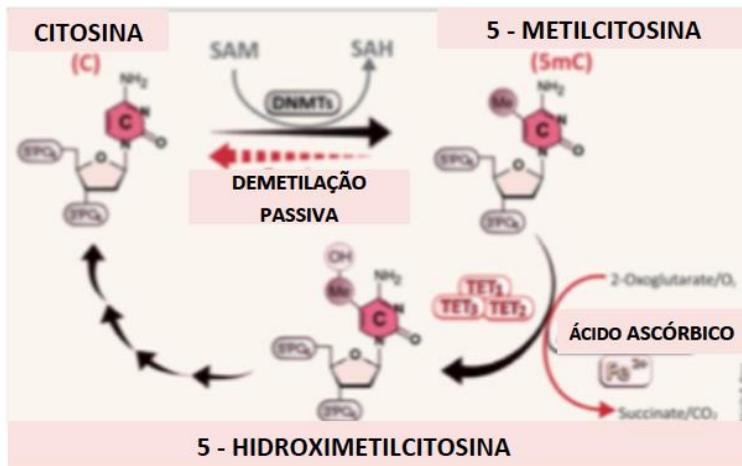
**Figura 4.** Níveis de metilação global de DNA e expressão do REST em linfócitos de crianças estratificadas de acordo com a distribuição do percentil do peso corporal. A) Variação nos níveis de metilação global de DNA expressos em porcentagem de metilação do DNA global; B) Níveis de expressão do REST em linfócitos de crianças obesas e eutróficas, expressos em mRNA de REST por nível de β-actina. As análises foram realizadas em linfócitos do sangue de crianças obesas (n = 34) e eutróficas (n = 19). Comparações entre os grupos de acordo com o percentil do IMC (eutrófico, Percentil 85º a 95º e Percentil > 95º) realizado através de ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni (pós-hoc). Sendo \* p < 0.05 e \*\*\* p < 0.01 a diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo eutrófico.



**Figura 5.** Correlação entre a variação nos níveis da metilação global de DNA expressos em percentagem de metilação de DNA global em linfócitos e a variação do índice de massa corporal (IMC).  $r$  = coeficiente de correlação de Pearson.



**Figura 6.** Níveis de metilação do promotor do REST em linfócitos e de ácido ascórbico sérico. A) Comparação entre a variação percentual nos níveis de metilação do promotor do REST de linfócitos de crianças eutróficas e obesas; B) Variação percentual dos níveis de ácido ascórbico no soro de pacientes com obesidade e relação ao grupo eutrófico (controles). \*  $p < 0.05$ .



**Figura 7.** Representação esquemática do envolvimento do ácido ascórbico na demetilação passiva da citosina.

### 5.3. CAPÍTULO II – Níveis séricos de Proteína C Reativa Ultrassensível, Interleucina 1 beta e Neopterin em Crianças Brasileiras Obesas: Estudo Caso-Controlle

A tabela 9 mostra as características demográficas e clínicas das crianças obesas e eutróficas. A média (SE) do IMC foi de 16,6 (0,6) no grupo de crianças eutróficas e 28,2 (1,0) no grupo de crianças obesas ( $p < 0,0001$ ). Crianças obesas eram mais velhas ( $p = 0,05$ ), tinham níveis mais elevados de pressão arterial sistólica e diastólica ( $p = 0,001$ ), e níveis mais baixos de HDL-c ( $p < 0,0001$ ). Crianças obesas também mostraram uma tendência não significativa para um maior nível sérico de LDL-c ( $p = 0,08$ ), triglicerídeos ( $p = 0,06$ ), hematócrito ( $p = 0,08$ ), e insulina ( $p = 0,07$ ). Os níveis séricos de PCR-US não diferiram entre os grupos investigados. Houve uma tendência não significativa para a ocorrência de níveis séricos mais baixos de IL-1  $\beta$  ( $p = 0,15$ ) e neopterin ( $p = 0,09$ ) nas crianças obesas quando comparadas ao grupo controle eutrófico.

**Tabela 9.** Características clínicas, demográficas e laboratoriais das crianças eutróficas e obesas

Variáveis	Todos os casos	Eutróficas	Obesas	Valor "p"
	<b>n = 53 (%)</b>	<b>n = 17 (%)</b>	<b>n = 36 (%)</b>	
<b>Gênero</b>				
Masculino	29 (54.7)	09 (52.9)	20 (55.6)	
<b>Diagnósticos associados</b>				
Hiperplasia Congênita	Adrenal 02 (3.8)	01 (5.9)	01 (2.8)	
Autismo	01 (1.9)	01 (5.9)	0	
Cardiomiopatia Congênita	01 (1.9)	0	01 (2.8)	
Dislipidemia Familiar	01 (1.9)	0	01 (2.8)	
Deficiência de GH	05 (9.4)	05 (29.4)	0	
Hipotireoidismo	04 (7.5)	03 (17.6)	01 (2.8)	
Puberdade Precoce	03 (5.7)	02 (11.8)	01 (2.8)	
Nenhum	36 (67.9)	05 (29.4)	31 (88.8)	N.A.
<b>Médias e Desvios Padrão (EP)</b>				
		<b>Média (EP)</b>	<b>Média (EP)</b>	
Idade (anos)	10 (0.4)	8.7 (0.8)	10.6 (0.5)	0.05
Peso (Kg)	54.5 (3.9)	31.0 (3.0)	65.6 (4.3)	< 0.0001
Altura (cm)	143 (2.7)	132.8 (4.7)	149.2 (3.0)	0.004
Índice de Massa Corpórea	24.5 (1.0)	16.6 (0.6)	28.2 (1.0)	< 0.0001
Pressão Arterial sistólica (mmHg)	109.0 (2.3)	93.8 (3.0)	113.8 (2.9)	0.001
Pressão Arterial diastólica (mmHg)	66.8 (2.0)	53.2 (4.3)	71.1 (2.0)	< 0.0001
Glicemia de jejum (mg/dl)	88.2 (1.5)	86.6 (2.3)	88.9 (1.9)	0.45
Hemoglobina glicada (%)	5.1 (0.1)	5.0 (0.1)	5.1 (0.1)	0.97
LDLc <sup>a</sup> (mg/dl)	91.1 (5.1)	80.1 (7.1)	98.8	0.08

(6.6)

HDLc <sup>b</sup> (mg/dl)	44.9 (1.7)	54.2 (2.7)	39.4 (1.6)	< 0.0001
Triglicerídeos (mg/dl)	81.3 (6.7)	65.7 (8.6)	91.6 (9.0)	0.06
Hematócrito(%)	39.2 (0.4)	38.3 (0.7)	39.8 (0.5)	0.08
Insulina (uU/mL)	16.9 (3.2)	9.8 (2.8)	20.7 (4.6)	0.07
Valores de biomarcadores imunológicos				
PCR-US <sup>c</sup> (mg/L)	3.8 (1.1)	4.8 (2.3)	3.5 (1.2)	0.57
Interleucina 1 $\beta$ <sup>d</sup> (pg / mL)	57.9 (25.5)	18.7 (12.3)	95.7 (36.0)	0.15
Neoptertina (nmol/L)	6.5 (0.6)	8.3 (1.6)	6.0 (0.5)	0.09

Crianças obesas apresentaram índice de massa corpórea (IMC) maior que o 95<sup>th</sup> percentil esperado para a idade e sexo. Crianças eutróficas tinham um IMC entre 5<sup>th</sup> e 95<sup>th</sup> percentil esperado para a idade e sexo;

<sup>a</sup> LDLc= Lipoproteína de baixa densidade; <sup>b</sup> HDLc= Lipoproteína de alta densidade;

<sup>c</sup> PCR-US = Proteína C Reativa Ultra-sensível C; <sup>d</sup> IL-1 $\beta$  = Interleucina 1 $\beta$ . N.A. – Não aplicado. EP = erro padrão.

A análise da regressão logística binária múltipla (tabela 10), mostrou que somente os níveis de LDLc e a pressão arterial diastólica, mas não os níveis de IL-1 $\beta$  e neoptertina, permaneceram independentemente associados ao grupo de crianças com obesidade. Os níveis de LDL e pressão arterial diastólica mostraram uma acurácia de 89,5% para predizer o diagnóstico de obesidade em nossa amostra (sensibilidade de 81,2% e especificidade de 92,6%). Por fim, como a neoptertina é produzida periféricamente por células monocíticas pelo estímulo da IL-1 $\beta$  (Ghisoni et al., 2016), nós analisamos existência ou não de associação entre os níveis séricos de IL-1 $\beta$  e neoptertina. Não houve associação entre os níveis de IL-1 $\beta$  e neoptertinas em nossos pacientes ( $r=0,09$ ,  $p=0,52$ ), excluindo-se assim a possibilidade de colinearidade entre a variação dos níveis de neoptertina e de IL-1 $\beta$ .

**Tabela 10.** Modelo Final de regressão logística binária mostrando as variáveis independentemente associadas com obesidade em crianças.

Variáveis Preditivas	Ajuste OR (CI 95%)	Valor “p”
Idade	0.78 (0.45 – 1.36)	0.39
Pressão Arterial Diastólica	1.67 (1.03 – 2.70)	0.04
LDLc <sup>a</sup>	1.13 (0.99 – 1.28)	0.06
IL-1 $\beta$ <sup>b</sup>	1.00 (0.98 – 1.03)	0.71
Neopterinina	0.75 (0.47 – 1.18)	0.21

<sup>a</sup> LDLc = Lipoproteína de baixa densidade;

<sup>b</sup> IL-1 $\beta$  = Interleucina 1 $\beta$ ;

Diagnóstico de obesidade na criança foi feito com o índice de massa corpórea (IMC) maior ou igual ao 95<sup>th</sup> percentil esperado para o sexo e idade. Não houve crianças com sobrepeso nesta amostra (IMC > 85% e < 95%);

A análise de regressão binária múltipla mostrou que ambos os níveis de IL-1 $\beta$  e neopterinina não foram independentemente associados com obesidade em crianças.

OR = razão de chances.

Tomados em conjunto, os níveis séricos de LDLc e pressão arterial diastólica os resultados mostram uma acurácia de 89,5% para prever a obesidade (Sensibilidade 81.2% e especificidade 92.6%).

Para melhor entender a tendência observada de associação entre obesidade, níveis séricos de IL-1 $\beta$  e neopterinina, foram identificadas outras variáveis associadas a estes dois biomarcadores inflamatórios, com nível de significância  $p < 0,15$  pela regressão linear. O modelo final de regressão linear múltipla mostrou que a idade e níveis de LDL foram variáveis preditivas independentes e negativamente associadas aos níveis séricos de neopterinina sendo capazes de 18% ( $r^2=0,18$ ) da sua variação em nossa amostra de pacientes. Houve uma tendência não significativa ( $r^2=0,07$ ,  $p=0,10$ ) para uma associação positiva entre a pressão arterial diastólica e o nível sérico de IL-1 $\beta$  em nossos pacientes (tabela 11).

**Tabela 11.** Variáveis associadas de forma independente ao nível sérico de neopterinina e IL-1 $\beta$ .

Variáveis Preditivas	Coeficientes de Regressão <sup>a</sup>			Valor "p"
	B	r	r <sup>2</sup>	
<b>Preditores de Neopterinina</b>				
<b>Modelo Inicial</b>				
Idade	- 0.53	0.34	0.12	0.01
Índice de Massa Corpórea	- 0.10	0.16	0.03	0.25
Pressão Arterial Sistólica	- 0.06	0.23	0.05	0.15
Pressão Arterial Diastólica	- 0.04	0.11	0.01	0.51
LDL <sup>a</sup>	- 0.04	0.29	0.08	0.04
HDL <sup>b</sup>	- 0.01	0.03	0.001	0.86
Triglicérides	- 0.02	0.19	0.03	0.20
Hematócrito	0.19	0.12	0.01	0.42
Insulina	- 0.03	0.13	0.02	0.38
IL-1 $\beta$	- 0.003	0.10	0.01	0.46
<b>Modelo Final 1</b>		0.42	0.18	0.01
Constante	14.7			< 0.0001
Idade	- 0.50			<b>0.05</b>
LDL-c <sup>a</sup>	- 0.05			<b>0.04</b>
<b>Preditores de IL-1<math>\beta</math></b>				
<b>Modelo Inicial</b>				
Idade	- 3.4	0.06	0.003	0.25
Índice de Massa Corpórea	0.80	0.03	0.001	0.81
Pressão Arterial Sistólica	0.40	0.03	0.001	0.83
Pressão Arterial Diastólica	3.87	0.26	0.07	0.10
LDLc <sup>a</sup>	- 0.64	0.21	0.04	0.16
HDLc <sup>b</sup>	- 0.40	0.04	0.002	0.77

Triglicérides	- 0.07	0.03	0.01	0.84
Hematócrito	0.17	0.005	0	0.97
Insulina	- 0.59	0.13	0.02	0.40
<b>Modelo Final 2</b>		0.26	0.07	0.10
Constante	-	184.8		
Pressão Arterial Diastólica	3.9			0.10

<sup>a</sup>LDLc = Lipoproteína de baixa densidade;

<sup>b</sup>HDLc = Lipoproteína de alta densidade.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os níveis séricos de PCR-US nas crianças eutróficas e as obesas. Crianças obesas apresentaram uma tendência a níveis mais elevados de IL-1 $\beta$  ( $p = 0,15$ ) e níveis mais baixos de neopterina ( $p = 0,09$ ). Após a correção para a distribuição das variáveis demográficas, clínicas e laboratoriais, não foi observado associação independente ( $p \geq 0,21$ ) entre obesidade e nível sérico de IL-1 $\beta$  e neopterina. Observamos uma fraca e negativa associação entre neopterina, colesterol LDLc e idade, e uma associação positiva entre IL-1 $\beta$  e a pressão arterial diastólica em nossas crianças.



## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. CAPÍTULO I: Biomarcadores da Obesidade Infantil e Síndrome Metabólica: Metilação de DNA e REST

Atualmente, estudos mostram que a hiperglicemia crônica e as gorduras saturadas podem ativar um estado gradual de neuroinflamação no hipotálamo, modificando a capacidade destes neurônios em responder apropriadamente à saciedade e estímulos adipostáticos (Cox et al., 2015; Lobstein et al., 2015b). A obesidade tem sido associada a um declínio cognitivo que pode evoluir com demência e neurodegeneração (Boyd et al., 1971; Craft, 2012; D'Amelio et al., 2009; Dunn et al., 2014). A hiperglicemia crônica aumenta o risco de demência em ambos os pacientes com doença de Parkinson, diabéticos 40% e 18% e não diabéticos .

Estudo realizado pelo nosso grupo, que avaliou ratos *Wistar* adultos machos, demonstrou que o metabolismo de animais submetidos a um período crônico de hiperglicemia, apresenta alterações do DNA com uma evidente hipermetilação de DNA, com diminuição de fator neuroprotetor REST. Esta hipermetilação é explicada pela falta da desmetilação que ocorre neste processo. Estes resultados confirmam que o insulto metabólico crônico provocado por hiperglicemia promove alterações epigenéticas em SNC em ratos *Wistar* adultos machos.

Em nosso estudo, após a avaliação de células mononucleares de sangue periférico das crianças obesas e do grupo controle, o grupo de crianças obesas demonstrou um aumento global de metilação de DNA e uma redução da expressão do REST, com um aumento do promotor de metilação do REST. Estas alterações foram confirmadas em crianças com o IMC maior que o percentil 85. Entretanto as modificações só foram observadas no grupo com o percentil acima de 95, indicando que o IMC é determinante na regulação da metilação de DNA. O ácido ascórbico das crianças obesas também estava diminuído nas amostras quando comparados aos controles, o que pode levar à diminuição da expressão do TETs, também interferindo para a alteração da epigenética. Com redução da expressão do TETs, há uma diminuição do processo da desmetilação do DNA, contribuindo para a hipermetilação de DNA.

Nosso grupo de crianças não passou por uma avaliação cognitiva, mas algumas alterações laboratoriais em sangue periférico foram detectadas nos marcadores inflamatórios coletados. Houve alteração nos resultados de valores de REST e metilação de DNA quando comparadas às crianças não obesas. Vale ressaltar que estas alterações só foram

observadas em crianças com IMC > 95<sup>o</sup>P. Assim, quanto maior o IMC das crianças avaliadas, maior foi a metilação do DNA e este aumento da metilação ocorre por alteração da desmetilação. Houve um evidente aumento na promoção da metilação do REST nas crianças com IMC acima do percentil 85, porém somente as crianças acima do 95<sup>o</sup>P apresentaram a diminuição da expressão deste fator neuroprotetor REST.

## **6.2. CAPÍTULO II: Níveis séricos de Proteína C Reativa Ultrassensível, Interleucina 1 beta e Neopterin em Crianças Brasileiras Obesas: Estudo Caso-Controlle**

O tecido adiposo é um órgão secretor. Sabe-se atualmente que existe um aumento do nível de citocinas inflamatórias e proteínas de fase aguda da inflamação nos indivíduos obesos. Um aumento do peso, com hipertrofia e hiperplasia deste tecido, confere alterações estruturais, com mudanças funcionais deste órgão. Obesidade e inflamação tem sido amplamente estudadas e se encontrou uma associação cíclica no agravamento de ambas. Inicialmente a inflamação era considerada uma consequência da obesidade. Atualmente há evidências de que o estado inflamatório crônico causado pelo consumo de alimentos ricos em açúcares e gorduras é causa de obesidade. Nosso estudo avaliou alguns marcadores inflamatórios em uma população de crianças obesas e comparou com controles eutróficos. Estes marcadores inflamatórios foram investigados em células mononucleares de sangue periférico destas crianças.

A PCR é a mais importante proteína secretada na fase aguda do processo inflamatório de resistência insulínica, e é um biomarcador de inflamação local e sistêmica (Rehman & Akash, 2016). Em nosso estudo não houve diferença significativa na dosagem de PCR-US entre as crianças obesas e as eutróficas. A baixa associação entre os níveis de PCR-US e obesidade em nossos pacientes foi um resultado inesperado. Nós acreditamos que possa estar relacionado com particularidades genéticas e o tempo de evolução de obesidade dos nossos pacientes. Não pudemos definir o tempo de duração de obesidade em nossa amostra e isso pode ser um ponto importante para ser investigado em um estudo prospectivo.

A IL-1  $\beta$  é uma citocina produzida pela ativação de macrófagos e é o principal mediador que regula a expressão de várias outras citocinas pró inflamatórias. A neopterin é um marcador produzido

periféricamente pelos monócitos por interferon-gama (INF- $\gamma$ ) ou IL-1  $\beta$  encontrado nos fluídos biológicos de pacientes com doenças inflamatórias. Este é um marcador sensível para a ativação de imunidade celular em infecções e doenças neurodegenerativas, neurológicas e cardiovasculares (Ghisoni et al., 2016; Grammer et al., 2009).

Em nosso trabalho houve uma tendência para baixos níveis de neopterinina e níveis elevados de IL-1  $\beta$  nas crianças obesas. Estes achados podem estar relacionados com os níveis LDLc e de pressão arterial diastólica dos pacientes obesos. A associação positiva entre IL-1 $\beta$  e a pressão arterial diastólica foi previamente demonstrada em crianças obesas polonesas (A Syrenicz, Garanty-Bogacka, Syrenicz, Gebala, & Walczak, 2006; Anhelli Syrenicz, Garanty-Bogacka, Syrenicz, Gebala, Dawid, et al., 2006a), mas a associação não se mostrou significativa após a análise de regressão múltipla. Quando injetado em pacientes com aplasia de medula óssea o IL-1  $\beta$  pode induzir hipertensão arterial sistêmica (85%) ou hipotensão (57%) (Nemunaitis et al., 1993). Porém, o mecanismo de alteração hemodinâmica pela IL-1  $\beta$  na homeostase da pressão arterial sistêmica em crianças obesas é desconhecido.

A falta de associação entre neopterinina e obesidade em nossas crianças estão em concordância com estudos prévios em adolescentes obesos da Áustria (Mangge et al., 2011a) e Turquia (Kabaroglu et al., 2012). Como nossas crianças obesas, os níveis de neopterinina sérica também não estiveram associados à obesidade em adultos obesos descendentes de germânicos (n=2312), mas foi negativa e independente com os níveis de LDLc e outros riscos cardiovasculares (Grammer et al., 2009). Na mesma amostra, os níveis de neopterinina também foram positiva e independente associados com a idade. Embora peculiaridades genéticas possam estar vinculadas a associação observada entre neopterinina e obesidade em crianças e adolescentes obesos na Índia (Nageswara Rao G et al., 2013), o resultado pode ter sido devido a um viés de confusão decorrente ao menos em parte de variações na distribuição dos níveis séricos de LDLc e outras variáveis não controladas no estudo indiano. Mais estudos multicêntricos envolvendo crianças de diferentes populações e amostras maiores de pacientes são necessários para esclarecer a existência ou não de associação entre estes marcadores inflamatórios em crianças obesas.



## 7. CONCLUSÕES

Observa-se uma forte associação positiva entre marcadores epigenéticos e IMC das crianças avaliadas, indicando que o aumento do IMC está associado a um aumento da metilação de DNA, sugerindo que o IMC é um fator que possa regular a metilação de DNA em crianças obesas. O desenho de nosso estudo em humanos entretanto não permite estabelecer uma relação de causa e efeito entre o aumento do IMC e aumento da metilação de DNA. A possibilidade de que ambos sejam epifenômenos relacionados a outros fatores vinculados à obesidade é um ponto importante a ser esclarecido.

Quanto aos marcadores inflamatórios, os níveis séricos de PCR-US, IL-1  $\beta$  e neopterinina não foram significativos e independentes associados com a obesidade nas crianças brasileiras de nossa amostra. A associação entre neopterinina, IL-1  $\beta$  e obesidade deveu-se a uma variação na distribuição de outras variáveis, incluindo o LDLc (para neopterinina) e pressão arterial diastólica (para IL-1  $\beta$ ). Se a neopterinina e a IL-1  $\beta$  estão diretamente envolvidas com a modulação ou somente um epifenômeno com o LDL-c e pressão arterial são pontos importantes a serem investigados. Mais estudos multicêntricos envolvendo crianças de diferentes populações e amostras maiores de pacientes são necessários esclarecer a existência ou não de associação entre estes marcadores inflamatórios em crianças obesas.



## **8. APOIO**

Projeto NENASC do Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX) , Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Santa Catarina (FAPESC).



## REFERENCIAS

Akash, M. S. H., Rehman, K., & Chen, S. (2013). Role of inflammatory mechanisms in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Journal of Cellular Biochemistry*, 114(3), 525–531.

Araujo, E. P., Moraes, J. C., Cintra, D. E., & Velloso, L. A. (2016). Mechanisms in endocrinology: Hypothalamic inflammation and nutrition. *European Journal of Endocrinology*.  
<https://doi.org/10.1530/EJE-15-1207>

Atkinson, A. B. (1998). Social Exclusion, Poverty and Unemployment. Exclusion, Employment and Opportunity, CASE Paper No 4, (January), 9–24. <https://doi.org/papers2://publication/uuid/23323176-487F-4C15-96E4-FE8AF1D92A06>

Barness, L. A. (2007). Obesity in children. *Fetal and Pediatric Pathology*, 26(2), 75–85. <https://doi.org/10.1080/15513810701448755>

Bataille, Rég., & Klein, B. (1992). C-reactive protein levels as a direct indicator of interleukin-6 levels in humans in vivo. *Arthritis & Rheumatism*. <https://doi.org/10.1002/art.1780350824>

Bell, C. G., Walley, A. J., & Froguel, P. (2005). The genetics of human obesity. *Nature Reviews Genetics*. <https://doi.org/10.1038/nrg1556>

Bellizzi, M. C., & Dietz, W. H. (1999). Workshop on childhood obesity: Summary of the discussion. In *American Journal of Clinical Nutrition* (Vol. 70). <https://doi.org/10.1016/j.bone.2007.05.003>

Bernstein, B. E., Meissner, A., & Lander, E. S. (2007). The Mammalian Epigenome. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.033>

Blüher, S., Käpplinger, J., Herget, S., Reichardt, S., Böttcher, Y., Grimm, A., ... Petroff, D. (2017). Cardiometabolic risk markers, adipocyte fatty acid binding protein (aFABP) and the impact of high-intensity interval training (HIIT) in obese adolescents. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 68, 77–87.

Bodi, V., Sanchis, J., Llacer, A., Facila, L., Nunez, J., Pellicer, M., ... Chorro, F. J. (2004). [Independent role of C reactive protein to predict

major events at one-month and at one-year in acute coronary syndrome without ST elevation]. *Medicina Clínica*, 122(7), 248–252.  
<https://doi.org/13058372> [pii]

Bouchard, C. (1992). Etiology of obesity: genetic factors. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 42(3 Suppl).

Boyd, A. E., Lebovitz, H. E., & Feldman, J. M. (1971). Endocrine function and glucose metabolism in patients with Parkinson's disease and their alternation by L-Dopa. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 33(5), 829–837.

Boyle, J. P., Thompson, T. J., Gregg, E. W., Barker, L. E., & Williamson, D. F. (2010). Projection of the year 2050 burden of diabetes in the US adult population: dynamic modeling of incidence, mortality, and prediabetes prevalence. *Population Health Metrics*, 8, 29.

Brasil. (2015). Pesquisa Nacional de Saúde 2013. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).  
<https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e3181949333>

Brauer, R., Bhaskaran, K., Chaturvedi, N., Dexter, D. T., Smeeth, L., & Douglas, I. (2015). Glitazone Treatment and Incidence of Parkinson's Disease among People with Diabetes: A Retrospective Cohort Study. *PLoS Medicine*, 12(7), e1001854.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001854>

Bray, G. A. (2014). *Handbook of Obesity -- Volume 1*. CRC Press.

Bulló, M., García-Lorda, P., Megias, I., & Salas-Salvadó, J. (2003). Systemic inflammation, adipose tissue tumor necrosis factor, and leptin expression. *Obesity Research*, 11(4), 525–531.  
<https://doi.org/10.1038/oby.2003.74>

Burke, V. (2006). Obesity in childhood and cardiovascular risk. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 33(9), 831–7.  
<https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2006.04449.x>

Calle, E. E., Teras, L. R., & Thun, M. J. (2005). Obesity and mortality. *The New England Journal of Medicine*, 353, 2197–2199.  
<https://doi.org/10.1056/NEJM200511173532020>

Calle, E. E., Thun, M. J., Petrelli, J. M., Rodriguez, C., & Heath, C. W. (1999). Body-mass index and mortality in a prospective cohort of U.S. adults. *New Engl J Med*, 341(15), 1097–105.  
<https://doi.org/10.1056/NEJM199910073411501>

Choi, J., Joseph, L., & Pilote, L. (2013). Obesity and C-reactive protein in various populations: A systematic review and meta-analysis. *Obesity Reviews*. <https://doi.org/10.1111/obr.12003>

Cook, D. G., Mendall, M. a, Whincup, P. H., Carey, I. M., Ballam, L., Morris, J. E., ... Strachan, D. P. (2000). C-reactive protein concentration in children: relationship to adiposity and other cardiovascular risk factors. *Atherosclerosis*, 149(1), 139–150.  
[https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(99\)00312-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(99)00312-3)

Cox, A. J., West, N. P., & Cripps, A. W. (2015). Obesity, inflammation, and the gut microbiota. *The Lancet Diabetes and Endocrinology*. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(14\)70134-2](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(14)70134-2)

Craft, S. (2012). Alzheimer disease: insulin resistance and AD--- extending the translational path. *Nature Reviews Neurology*, 8(7), 360–362.

Crane, P. K., Walker, R., & Larson, E. B. (2013). Glucose levels and risk of dementia. *New England Journal of Medicine*, 369(19), 1863–1864.

D'Amelio, M., Ragonese, P., Callari, G., Di Benedetto, N., Palmeri, B., Terruso, V., ... Savettieri, G. (2009). Diabetes preceding Parkinson's disease onset. A case-control study. *Parkinsonism & Related Disorders*, 15(9), 660–664.

Dallagnol, K. M. C., Remor, A. P., da Silva, R. A., Prediger, R. D., Latini, A., & Aguiar, A. S. (2017). Running for REST: Physical activity attenuates neuroinflammation in the hippocampus of aged mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 61, 31–35.

Das, U. N. (2001). Is obesity an inflammatory condition? *Nutrition*. [https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(01\)00672-4](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(01)00672-4)

- Day, S. E., Coletta, R. L., Kim, J. Y., Garcia, L. A., Campbell, L. E., Benjamin, T. R., ... Coletta, D. K. (2017). Potential epigenetic biomarkers of obesity-related insulin resistance in human whole-blood. *Epigenetics*, 12(4), 254–263.
- Donath, M. Y., Dalmas, É., Sauter, N. S., & Böni-Schnetzler, M. (2013). Inflammation in obesity and diabetes: Islet dysfunction and therapeutic opportunity. *Cell Metabolism*.  
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.05.001>
- Duncan, G. E. (2006). Prevalence of diabetes and impaired fasting glucose levels among US adolescents: National Health and Nutrition Examination Survey, 1999–2002. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*, 160(5), 523–528. <https://doi.org/10.1001/archpedi.160.5.523>
- Dunn, L., Allen, G. F., Mamais, A., Ling, H., Li, A., Duberley, K. E., ... Bandopadhyay, R. (2014). Dysregulation of glucose metabolism is an early event in sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, 35(5), 1111–1115.
- Ebersole, J. L., Machen, R. L., Steffen, M. J., & Willmann, D. E. (1997). Systemic acute-phase reactants, C-reactive protein and haptoglobin, in adult periodontitis. *Clinical and Experimental Immunology*, 107(2), 347–352. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1997.270-ce1162.x>
- Eknoyan, G. (2008). Adolphe Quetelet (1796–1874) - The average man and indices of obesity. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 23(1), 47–51. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfm517>
- Fantuzzi, G., Zheng, H., Faggioni, R., Benigni, F., Ghezzi, P., Sipe, J. D., ... Dinarello, C. A. (1996). Effect of endotoxin in IL-1 beta-deficient mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 157(1), 291–6. <https://doi.org/10.1179/096805106X153952>
- Figlewicz, D. P., Schwartz, M. W., Seeley, R. J., Chavez, M., Baskin, D. G., Woods, S. C., & Porte, D. (1996). Endocrine regulation of food intake and body weight. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*.  
[https://doi.org/10.1016/S0022-2143\(96\)90179-1](https://doi.org/10.1016/S0022-2143(96)90179-1)

Frayling, T. M., Timpson, N. J., Weedon, M. N., Freathy, R. M., Lindgren, C. M., Perry, J. R. B., ... McCarthy, M. I. (2007). A Common Variant in the FTO Gene Is Associated with Body Mass Index and Predisposes to Childhood and Adult Obesity. *Science*, 316(5826), 889–894. <https://doi.org/10.1126/science.1141634>

Geloneze, B., Mancini, M. C., & Coutinho, W. (2009). Obesity: knowledge, care, and commitment, but not yet cure. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia E Metabologia*, 53(2), 117–119.

Ghisoni, K., Aguiar, A. S., de Oliveira, P. A., Matheus, F. C., Gabach, L., Perez, M., ... Latini, A. (2015). Neopterin acts as an endogenous cognitive enhancer. *Brain, Behavior, and Immunity*, 56, 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.02.019>

Gigante, D. P., Moura, E. C. de, & Sardinha, L. M. V. (2009). Prevalence of overweight and obesity and associated factors, Brazil, 2006. *Revista de Saude Publica*, 43 Suppl 2, 83–89.

González-Muniesa, P., Martínez-González, M.-A., Hu, F. B., Després, J.-P., Matsuzawa, Y., Loos, R. J. F., ... Martínez, J. A. (2017). Obesity. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 17034. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.34>

Grammer, T. B., Fuchs, D., Boehm, B. O., Winkelmann, B. R., & Maerz, W. (2009). Neopterin as a predictor of total and cardiovascular mortality in individuals undergoing angiography in the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health study. *Clinical Chemistry*, 55(6), 1135–1146. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.118844>

Grundy, S. M., Pasternak, R., Greenland, P., Smith, S., & Fuster, V. (1999). Assessment of Cardiovascular Risk by Use of Multiple-Risk-Factor Assessment Equations : A Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association and the American College of Cardiology. *Circulation*, 100(13), 1481–1492. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.100.13.1481>

Halpern, A., Mancini, M. C., Magalhães, M. E. C., Fisberg, M., Radominski, R., Bertolami, M. C., ... Nery, M. (2010). Metabolic syndrome, dyslipidemia, hypertension and type 2 diabetes in youth: from diagnosis to treatment. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 2, 55.

Han, J. C., Lawlor, D. a., & Kimm, S. Y. S. (2010). Childhood Obesity – 2010 : Progress and Challenges. *Lancet*, 375(9727), 1737–1748.  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60171-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60171-7).Childhood

Hansen, P. J. (1951). Lowry Protein Assay. *Laboratory Procedures - University of Florida*, 13(5), 1–2. <https://doi.org/10.1021/jf1005935>.

IBGE. (2013). Pesquisa Nacional de Saúde 2013. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).  
<https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e3181949333>

Kabaroğlu, C., Onur, E., Barutçuoğlu, B., Özhan, B., Erdinç, S., Var, A., ... Ersoy, B. (2012). Inflammatory marker levels in obese adolescents with glucose intolerance: Increased chitotriosidase activity. *Clinical Biochemistry*, 45(4–5), 281–284.  
<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2011.12.007>

Kabaroğlu, C., Onur, E., Barutçuoğlu, B., Özhan, B., Erdinç, S., Var, A., ... Ersoy, B. (2012). Inflammatory marker levels in obese adolescents with glucose intolerance: Increased chitotriosidase activity. *Clinical Biochemistry*, 45(4–5), 281–284.  
<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2011.12.007>

Koenig, W., & Khuseyinova, N. (2007). Biomarkers of atherosclerotic plaque instability and rupture. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*.  
<https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000251503.35795.4f>

Kousta, E., Hadjiathanasiou, C. G., Tolis, G., & Papanthanasidou, A. (2009). Pleiotropic Genetic Syndromes with Developmental Abnormalities Associated with Obesity. *Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism*, 22(7), 581–592.

Landgrave-Gómez, J., Mercado-Gómez, O., & Guevara-Guzmán, R. (2015). Epigenetic mechanisms in neurological and neurodegenerative diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9.  
<https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00058>

Lin, X., Lim, I. Y., Wu, Y., Teh, A. L., Chen, L., Aris, I. M., ... GUSTO study group. (2017). Developmental pathways to adiposity begin before

birth and are influenced by genotype, prenatal environment and epigenome. *BMC Medicine*, 15(1), 50.

Lobstein, T., Jackson-Leach, R., Moodie, M. L., Hall, K. D., Gortmaker, S. L., Swinburn, B. A., ... McPherson, K. (2015a). Child and adolescent obesity: part of a bigger picture. *The Lancet*, 385(9986), 2510–2520. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61746-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61746-3)

Lobstein, T., Jackson-Leach, R., Moodie, M. L., Hall, K. D., Gortmaker, S. L., Swinburn, B. A., ... McPherson, K. (2015b). Child and adolescent obesity: Part of a bigger picture. *The Lancet*, 385(9986), 2510–2520. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61746-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61746-3)

Loos, R. J. F., & Bouchard, C. (2003). Obesity--is it a genetic disorder? *Journal of Internal Medicine*, 254(5), 401–25. <https://doi.org/1242> [pii]

Lu, T., Aron, L., Zullo, J., Pan, Y., Kim, H., Chen, Y., ... Yankner, B. A. (2014). REST and stress resistance in ageing and Alzheimer's disease. *Nature*, 507(7493), 448–454.

Malta, D. C., Andrade, S. C., Claro, R. M., Bernal, R. T. I., & Monteiro, C. A. (2014). Trends in prevalence of overweight and obesity in adults in 26 Brazilian state capitals and the Federal District from 2006 to 2012. *Revista Brasileira de Epidemiologia = Brazilian Journal of Epidemiology*, 17 Suppl 1, 267–276.

Malta, D. C., Stopa, S. R., Iser, B. P. M., Bernal, R. T. I., Claro, R. M., Nardi, A. C. F., ... Monteiro, C. A. (2015). Risk and protective factors for chronic diseases by telephone survey in capitals of Brazil, Vigitel 2014. *Revista Brasileira de Epidemiologia = Brazilian Journal of Epidemiology*, 18 Suppl 2, 238–255.

Mancini, M. (2015). *Tratado de obesidade* (2a. ed.).

Mancini, M. C. (2009). Metabolic syndrome in children and adolescents - criteria for diagnosis. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 1(1), 20.

Mangge, H., Freytag, F., Almer, G., Weghuber, D., Bauer-Denk, C., & Fuchs, D. (2011a). Serum neopterin is not increased in obese juveniles. *Journal of Obesity*, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/946795>

Mangge, H., Freytag, F., Almer, G., Weghuber, D., Bauer-Denk, C., & Fuchs, D. (2011b). Serum Neopterin Is Not Increased in Obese Juveniles. *Journal of Obesity*, 2011, 1–7.  
<https://doi.org/10.1155/2011/946795>

Maslah, E., Dumaop, W., Galasko, D., & Desplats, P. (2013). Distinctive patterns of DNA methylation associated with Parkinson disease: identification of concordant epigenetic changes in brain and peripheral blood leukocytes. *Epigenetics*, 8(10), 1030–1038.

Medford, H. M., Cox, E. J., Miller, L. E., & Marsh, S. A. (2014). Consuming a Western diet for two weeks suppresses fetal genes in mouse hearts. *AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 306(8), R519--R526.

Molina, P. E. (2007). *FISIOLOGIA ENDOCRINA*.

Moura, E. C., & Claro, R. M. (2012). Estimates of obesity trends in Brazil, 2006-2009. *International Journal of Public Health*, 57(1), 127–133.

Murr, C., Widner, B., Wirleitner, B., & Fuchs, D. (2002). Neopterin as a marker for immune system activation. *Current Drug Metabolism*, 3(2), 175–187. <https://doi.org/10.2174/1389200024605082>

Mutch, D. M., & Clément, K. (2006). Genetics of human obesity. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 20(4), 647–664. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2006.09.006>

Nageswara Rao G, S., Gurumurthy, P., E, S., & Cherian, K. M. (2013). The clinical and biochemical parameters in relation to the serum neopterin levels in Indian children and adolescents. *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR*, 7(4), 618–621.  
<https://doi.org/10.7860/JCDR/2013/5128.2866>

Nemunaitis, J., Appelbaum, F. R., Singer, J. W., Lilleby, K., Wolff, S., Greer, J. P., ... al., et. (1993). Phase I trial with recombinant human interleukin-3 in patients with lymphoma undergoing autologous bone marrow transplantation. *Blood*, 82(11), 3273–3278.

Nemunaitis, J., Ross, M., Meisenberg, B., O'Reilly, R., Lilleby, K., Buckner, C. D., ... Peters, W. P. (1994). Phase I study of recombinant human interleukin-1 beta (rhIL-1 beta) in patients with bone marrow failure. *Bone Marrow Transplantation*, 14(4), 583–8.

Noh, K. M., Hwang, J. Y., Follenzi, A., Athanasiadou, R., Miyawaki, T., Grealley, J. M., ... Zukin, R. S. (2012). Repressor element-1 silencing transcription factor (REST)-dependent epigenetic remodeling is critical to ischemia-induced neuronal death. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), E962--E971.

Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A., & Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 99(3), 247–257.

Ota, T. (2015). Obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Frontiers Media SA. Front. Endocrinol.* 5:204. doi: 10.3389/fendo.2014.00204

Peeters, A., Barendregt, J. J., Willekens, F., Mackenbach, J. P., Al Mamun, A., Bonneux, L., ... Nusselder, W. (2003). Obesity in adulthood and its consequences for life expectancy: A life-table analysis. *Annals of Internal Medicine*, 138(1), 24–32. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-138-1-200301070-00008>

Pereira da Cunha Sousa, C. I., Alves de Olinda, R., & Estatura Crescimento Sobrepeso Obesidade, C. (2016). Prevalence of stunting and overweight/obesity among Brazilian children according to different epidemiological scenarios: systematic review and meta-analysis. *Sao Paulo Med J. Sao Paulo Med J*, 134(1343), 251–62. <https://doi.org/10.1590/1516-3180.2015.02271211>

Perrin, E. M., O'Shea, T. M., Skinner, A. C., Bose, C., Allred, E. N., Fichorova, R. N., ... Leviton, A. (2017a). Elevations of inflammatory proteins in neonatal blood are associated with obesity and overweight among 2-year-old children born extremely premature. *Pediatric Research*. <https://doi.org/10.1038/pr.2017.313>

Perrin, E. M., O'Shea, T. M., Skinner, A. C., Bose, C., Allred, E. N., Fichorova, R. N., ... Leviton, A. (2017b). Elevations of inflammatory proteins in neonatal blood are associated with obesity and overweight

among 2-year-old children born extremely premature. *Pediatric Research*.

Polat, T. B., Urganci, N., Caliskan, K. C., & Akyildiz, B. (2008). Correlation of abdominal fat accumulation and stiffness of the abdominal aorta in obese children. *Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism : JPEM*, 21(11), 1031–1040.  
<https://doi.org/10.1515/JPEM.2008.21.11.1031>

Rankinen, T., Zuberi, A., Chagnon, Y. C., Weisnagel, S. J., Argyropoulos, G., Walts, B., ... Bouchard, C. (2006). The human obesity gene map: The 2005 update. *Obesity*, 14(4), 529–644.  
<https://doi.org/10.1038/oby.2006.71>

Rao G, S. N., Gurumurthy, P., E, S., & Cherian, K. M. (2013). The Clinical and Biochemical Parameters in Relation to the Serum Neopterin Levels in Indian Children and Adolescents. *JOURNAL of CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH*, 7(4), 618–21.  
<https://doi.org/10.7860/JCDR/2013/5128.2866>

Rehman, K., & Akash, M. S. H. (2016). Mechanisms of inflammatory responses and development of insulin resistance: how are they interlinked? *Journal of Biomedical Science*, 23(1), 87.

Rehman, K., & Akash, M. S. H. (2017). Mechanism of generation of oxidative stress and pathophysiology of type 2 diabetes mellitus: how are they interlinked? *Journal of Cellular Biochemistry*.

Rönn, T., & Ling, C. (2015). DNA methylation as a diagnostic and therapeutic target in the battle against Type 2 diabetes. *Epigenomics*, 7(3), 451–460.

Rönn, T., Volkov, P., Davegårdh, C., Dayeh, T., Hall, E., Olsson, A. H., ... Ling, C. (2013). A six months exercise intervention influences the genome-wide DNA methylation pattern in human adipose tissue. *PLoS Genetics*, 9(6), e1003572.

Rönn, T., Volkov, P., Gillberg, L., Kokosar, M., Perfilyev, A., Jacobsen, A. L., ... Ling, C. (2015). Impact of age, BMI and HbA1c levels on the genome-wide DNA methylation and mRNA expression patterns in

human adipose tissue and identification of epigenetic biomarkers in blood. *Human Molecular Genetics*, 24(13), 3792–3813.

Samuel, V. T., & Shulman, G. I. (2012). Mechanisms for Insulin Resistance: Common Threads and Missing Links. *Cell*, 148(5), 852–871.

Schlenzog, M., Magnus, L., Heide, T., Eschenbruch, J., Steib, F., Tator, M., ... Dahl, E. (2016). Epigenetic loss of putative tumor suppressor SFRP3 correlates with poor prognosis of lung adenocarcinoma patients. *Epigenetics*, 0.

Smith, A. R., Smith, R. G., Condliffe, D., Hannon, E., Schalkwyk, L., Mill, J., & Lunnon, K. (2016). Increased DNA methylation near TREM2 is consistently seen in the superior temporal gyrus in Alzheimer's disease brain. *Neurobiology of Aging*, 47, 35–40.

Sousa, C. P. da C., Olinda, R. A. de, & Pedraza, D. F. (2016). Prevalence of stunting and overweight/obesity among Brazilian children according to different epidemiological scenarios: systematic review and meta-analysis. *Sao Paulo Medical Journal*, 134(3), 251–262. <https://doi.org/10.1590/1516-3180.2015.0227121>

Syrenicz, A., Garanty-Bogacka, B., Syrenicz, M., Gebala, A., Dawid, G., & Walczak, M. (2006a). Relation of low-grade inflammation and endothelial activation to blood pressure in obese children and adolescents. *Neuro Endocrinology Letters*, 27(4), 459–464.

Syrenicz, A., Garanty-Bogacka, B., Syrenicz, M., Gebala, A., Dawid, G., & Walczak, M. (2006b). Relation of low-grade inflammation and endothelial activation to blood pressure in obese children and adolescents. *Neuro Endocrinology Letters*, 27(4), 459–64.

Syrenicz, A., Garanty-Bogacka, B., Syrenicz, M., Gebala, A., & Walczak, M. (2006). Low-grade systemic inflammation and the risk of type 2 diabetes in obese children and adolescents. *Neuro Endocrinol Lett*, 27(4), 453–458. <https://doi.org/NEL270406A18> [pii]

Syrenicz, A., Garanty-Bogacka, B., Syrenicz, M., Gebala, A., & Walczak, M. (2006). Low-grade systemic inflammation and the risk of

type 2 diabetes in obese children and adolescents. *Neuro Endocrinology Letters*, 27(4), 453–8.

Szmitko, P. E., Fedak, P. W. M., Weisel, R. D., Stewart, D. J., Kutryk, M. J. B., & Verma, S. (2003). Endothelial progenitor cells: New hope for a broken heart. *Circulation*.  
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000074242.66719.4A>

Tillett, W. S., & Francis, T. (1930). SEROLOGICAL REACTIONS IN PNEUMONIA WITH A NON-PROTEIN SOMATIC FRACTION OF PNEUMOCOCCUS. *The Journal of Experimental Medicine*, 52(4), 561–71. <https://doi.org/10.1084/jem.52.4.561>

Trayhurn, P., & Wood, I. S. (2004). Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *British Journal of Nutrition*, 92(3), 347. <https://doi.org/10.1079/BJN20041213>

Venugopal, S. K., Devaraj, S., & Jialal, I. (2003). C-reactive protein decreases prostacyclin release from human aortic endothelial cells. *Circulation*, 108(14), 1676–8.  
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000094736.10595.A1>

Venugopal, S. K., Devaraj, S., Yuhanna, I., Shaul, P., & Jialal, I. (2002). Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells. *Circulation*, 106(12), 1439–1441. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000033116.22237.F9>

Verma, S., Badiwala, M. V, Weisel, R. D., Li, S.-H., Wang, C.-H., Fedak, P. W. M., ... Mickle, D. a G. (2003). C-reactive protein activates the nuclear factor-kappaB signal transduction pathway in saphenous vein endothelial cells: implications for atherosclerosis and restenosis. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 126(6), 1886–91.  
<https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2003.07.026>

Verma, S., Kuliszewski, M. a, Li, S.-H., Szmitko, P. E., Zucco, L., Wang, C.-H., ... Kutryk, M. J. B. (2004). C-reactive protein attenuates endothelial progenitor cell survival, differentiation, and function: further evidence of a mechanistic link between C-reactive protein and cardiovascular disease. *Circulation*, 109(17), 2058–67.  
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000127577.63323.24>

- Verma, S., Wang, C.-H., Li, S.-H., Dumont, A. S., Fedak, P. W. M., Badiwala, M. V., ... Stewart, D. J. (2002). A Self-Fulfilling Prophecy: C-Reactive Protein Attenuates Nitric Oxide Production and Inhibits Angiogenesis. *Circulation*, 106(8), 913–919.  
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000029802.88087.5E>
- Visser, M., Bouter, L. M., McQuillan, G. M., Wener, M. H., & Harris, T. B. (1999). Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *JAMA : The Journal of the American Medical Association*, 282(22), 2131–5. <https://doi.org/10.1001/jama.282.22.2131>
- Volp, A. C. P., Alfenas, R. de C. G., Costa, N. M. B., Minim, V. P. R., Stringueta, P. C., & Bressan, J. (2008). [Inflammation biomarkers capacity in predicting the metabolic syndrome]. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia E Metabologia*, 52(3), 537–49.  
<https://doi.org/10.1590/S0004-27302008000300015>
- Wang, Y., Monteiro, C., & Popkin, B. M. (2002). Trends of obesity and underweight in older children and adolescents in the United States, Brazil, China, and Russia. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 75(6), 971–977.
- Weiss, R., Santoro, N., Giannini, C., Galderisi, A., Umamo, G. R., & Caprio, S. (2017). Prediabetes in youths: mechanisms and biomarkers. *The Lancet Child and Adolescent Health*.  
[https://doi.org/10.1016/S2352-4642\(17\)30044-5](https://doi.org/10.1016/S2352-4642(17)30044-5)
- Weiss, R., Taksali, S. E., Tamborlane, W. V., Burgert, T. S., Savoye, M., & Caprio, S. (2005). Predictors of changes in glucose tolerance status in obese youth. *Diabetes Care*, 28(4), 902–909.  
<https://doi.org/10.2337/diacare.28.4.902>
- WHO. (2017). WHO | Obesity and overweight. Who. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>
- World Health Organization. (1998). The world health report 1998: life in the 21st century A vision for all. World Health Organisation, 226. Retrieved from [http://www.who.int/whr/1998/media\\_centre/50facts/en/#%5Cnhttp://bases.bireme.br/cgi-](http://www.who.int/whr/1998/media_centre/50facts/en/#%5Cnhttp://bases.bireme.br/cgi-)

bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=PAHO&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=25006&indexSearch=ID

Wu, S. C., & Zhang, Y. (2010). Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11(9), 607–620.

Yudkin, J. S., Kumari, M., Humphries, S. E., & Mohamed-Ali, V. (2000). Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: Is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis*. [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(99\)00463-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(99)00463-3)

Zebrack, J. S., Muhlestein, J. B., Horne, B. D., & Anderson, J. L. (2002). C-reactive protein and angiographic coronary artery disease: Independent and additive predictors of risk in subjects with angina. *Journal of the American College of Cardiology*, 39(4), 632–637. [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(01\)01804-6](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(01)01804-6)

## APÊNDICE A: Instrumento de coleta

### AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE NEOPTERINAS, ATIVIDADE DA CADEIA RESPIRATÓRIA E EPIGENÉTICA DOS PACIENTES COM OBESIDADE E / OU *DIABETES MELLITUS*

Dados identificação:

<b>Nome:</b>		<b>Registro:</b>
<b>Nasc:</b> ____/____/____	<b>Data avaliação:</b> ____/____/____	
<b>Sexo:</b> <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> F	<b>Raça:</b> <input type="checkbox"/> Br <input type="checkbox"/> Negr <input type="checkbox"/> Pard <input type="checkbox"/> Asia <input type="checkbox"/> Verm	
<b>Telefone contato:</b>	<b>Estado civil:</b> <input type="checkbox"/> Solt <input type="checkbox"/> Casado <input type="checkbox"/> Divorciado <input type="checkbox"/> Amaziado <input type="checkbox"/> Viúvo	

Dados da doença de base:

<b>Diagnóstico Mellitus:</b>		<b>Diabetes</b>
<b>Já fez uso Insulina:</b> <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim	<b>Ano início do uso Insulina:</b> _____	
<b>Retinopatia Diabética:</b> <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> RDNP <input type="checkbox"/> RDP <input type="checkbox"/> Fotocoagulação	<b>Data último Fundo olho (mês e ano):</b> ____/____	
<b>Nefropatia Diabética:</b> <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim	<b>Data última MA (mês e ano):</b> ____/____	<b>MA (valor)</b> _____
<b>Neuropatia Diabética:</b> <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim		

Antecedentes:

<b>Doença Cardiovascular :</b> <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim	<b>Qual ?/ Quando ?</b> : _____
--	------------------------------------

<b>Comorbidades:</b> <input type="checkbox"/>	Pneumo: _____ <input type="checkbox"/>
Cardio: _____ <input type="checkbox"/>	Gastro: _____ <input type="checkbox"/>
Nefro: _____ <input type="checkbox"/>	Endocrino: _____ <input type="checkbox"/>
Reumato: _____ <input type="checkbox"/>	Psiquiatria: _____ <input type="checkbox"/>
Infecto: _____ <input type="checkbox"/>	
Outras _____	

<b>Medicações:</b>
_____
_____
_____
_____
_____
_____

Dados exame físico (exame físico realizado pelo **PESQUISADOR**)

<b>HGT:</b> _____ (tempo da última refeição : _____)
--

<b>Peso:</b> _____ kg	<b>Altura:</b> _____ _m	<b>IMC:</b> _____ =	<b>CA:</b> _____ =	<b>PAS:</b> _____ =	<b>PAD:</b> _____ =
--------------------------	----------------------------	---------------------------	--------------------------	---------------------------	---------------------------

Laboratório (**LEVADOS À CONSULTA**)

<b>HbA1c:</b>	<b>CT:</b>	<b>HDL-c:</b>	<b>LDL-c</b>	<b>TG:</b>
<b>ALT:</b>	<b>AST:</b>	<b>Cr:</b>	<b>MA:</b>	<b>Plaquetas:</b>

<b>Outros exames laboratoriais</b>

Laboratório (**DOSAGEM PELO ESTUDO**)

--

## **APÊNDICE B: TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Você está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa **“AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE NEOPTERINAS, ATIVIDADE DA CADEIA RESPIRATÓRIA E EPIGENÉTICA DOS PACIENTES COM OBESIDADE E / OU DIABETES MELLITUS”**.

Leia atentamente este termo, e se tiver alguma dúvida, peça explicações ao médico ou a alguém da equipe do estudo. Se concordar em participar do estudo e autorizar o uso e divulgação das informações obtidas durante o estudo, assine a última página deste termo de consentimento e faça uma rubrica na primeira página.

A obesidade e o Diabetes Mellitus são grandes problemas de saúde pública em vários lugares do mundo. Elas podem vir acompanhadas de diversas doenças, como pressão alta, problemas no colesterol e triglicérides e aumento do risco de problemas de coração.

### **Objetivo do estudo e justificativa**

O objetivo deste estudo é avaliar uma série de alterações do exame clínico e exames de laboratório que podem ocorrer em indivíduos obesos e diabéticos. Sua participação nos ajudará a entender melhor dessas doenças e das demais complicações associadas.

### **Procedimentos do estudo**

Os procedimentos serão os mesmos realizados nas suas consultas de rotina no ambulatório. Serão feitas algumas perguntas sobre a sua saúde, e será realizado um exame físico habitual do seguimento médico.

Será realizada uma coleta única de sangue, no momento da consulta, que servirá para a realização de todos os exames do estudo. Não será realizado nenhuma outra coleta adicional

Os dados de exame clínico e exames laboratoriais poderão ser obtidos diretamente durante a consulta ou dos registros no seu prontuário médico.

Pela sua participação, você não receberá qualquer valor em dinheiro, da mesma forma que não terá qualquer despesa com o que for necessário para o estudo.

### **Possíveis efeitos indesejáveis**

Pode haver desconforto causado pela coleta de amostras de sangue. Os riscos possíveis relacionados à coleta de sangue são inflamação da veia, dor, manchas roxas na pele ou sangramento no local. Você pode ficar constrangido em responder alguma questão.

### **Benefício esperado**

O benefício do estudo é o maior conhecimento sobre as doenças relacionadas à obesidade e ao diabetes mellitus.

### **Confidencialidade e privacidade dos seus dados e identificação**

A equipe do estudo obterá informações suas como nome, endereço, telefone de contato, data de nascimento, dados sobre sua saúde e história médica, além das informações verificadas durante o estudo. Ao apresentar os resultados da pesquisa em congressos ou publicações, a equipe nunca citará seu nome ou dados pessoais.

### **Posso me recusar a participar do estudo?**

Sim. A sua participação neste estudo é voluntária. A qualquer momento você tem o direito de se retirar da pesquisa. Se decidir por não mais participar, não haverá, sob hipótese alguma, nenhum prejuízo do seu atendimento e tratamento médico aos quais tem direito.

### **Como poderei tirar dúvidas a respeito do estudo?**

Em caso de dúvida entre em contato com os médicos que estão conduzindo o estudo, Dr. Alexandre Hohl, Dr. Marcelo Ronsoni, Dra. Marisa Helena César Coral, Dra Rose Marie Linhares e Dra. Simone van de Sande Lee, no ambulatório de endocrinologia do HU (área B), fone (48) 3721-9134. Se você tiver alguma dúvida sobre a ética da pesquisa, pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Biblioteca Universitária Central – Setor de Periódicos (térreo), fone: (48) 3721-9206, ou com a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), pelo e- mail [conep@saude.gov.br](mailto:conep@saude.gov.br) ou fone (61) 3315-5878.

Você receberá uma cópia assinada deste termo de consentimento livre e esclarecido.

Eu li e compreendi este termo de consentimento. Fui devidamente informado sobre os objetivos, as finalidades do estudo e os termos de minha participação. Sou voluntário para participar deste estudo.

Nome do voluntário (ou responsável legal): \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Nome do pesquisador responsável (ou delegado): \_\_\_\_\_

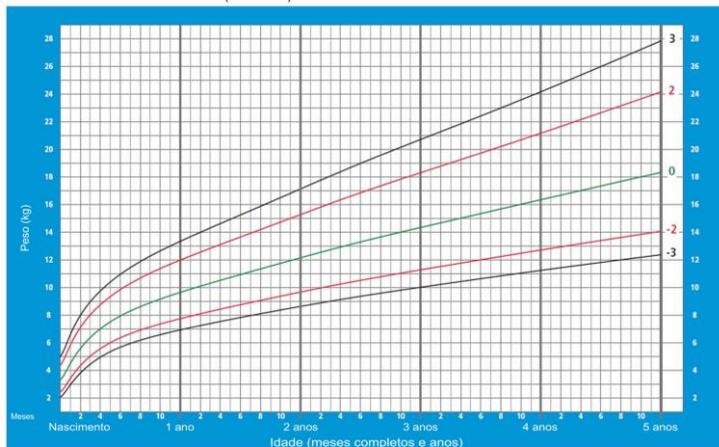
\_\_\_\_\_  
Assinatura: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

## ANEXO A: GRÁFICOS DE ESTATURA, PESO E IMC EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES - OMS

### Peso por Idade MENINOS

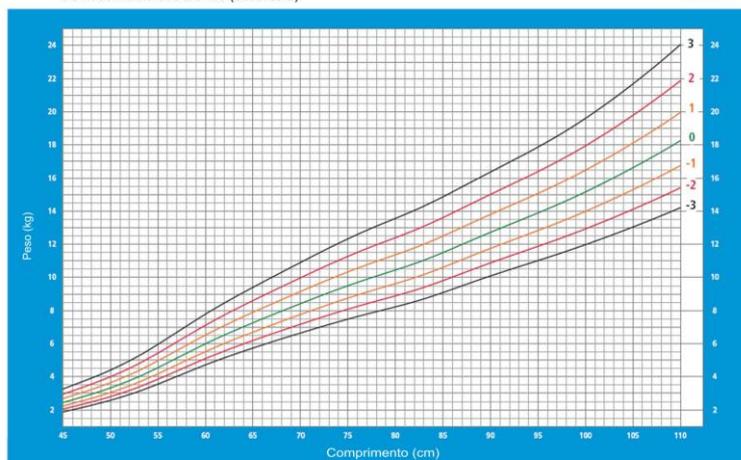
Do nascimento aos 5 anos (escores-z)



Fonte: WHO Child Growth Standards, 2006 (<http://www.who.int/childgrowth/en/>)

### Peso por comprimento MENINOS

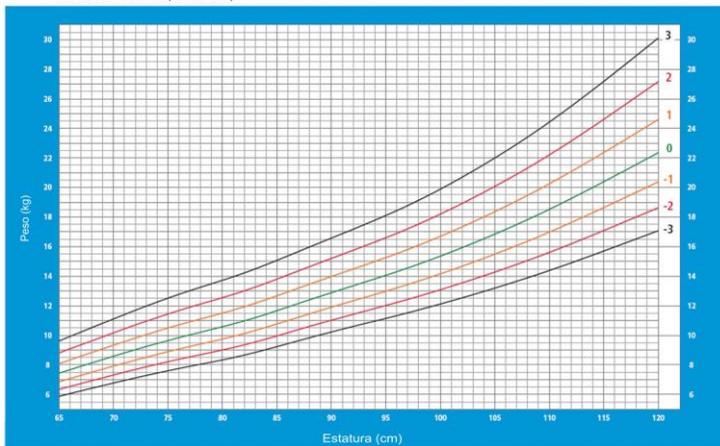
Do nascimento aos 2 anos (escores-z)



Fonte: WHO Child Growth Standards, 2006 (<http://www.who.int/childgrowth/en/>)

## Peso por estatura MENINOS

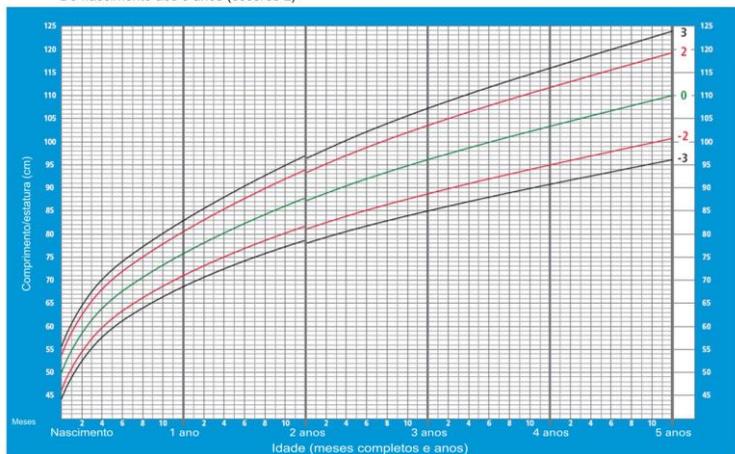
Dos 2 aos 5 anos (escores-z)



Fonte: WHO Child Growth Standards, 2006 (<http://www.who.int/childgrowth/en/>)

## Comprimento/estatura por idade MENINOS

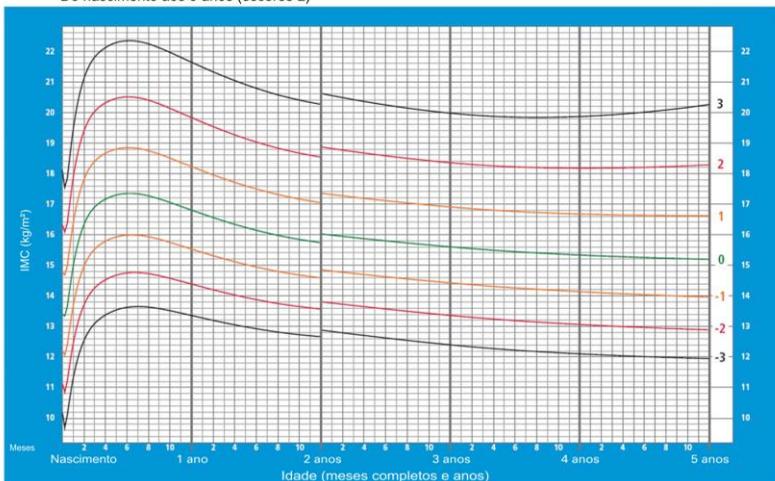
Do nascimento aos 5 anos (escores-z)



Fonte: WHO Child Growth Standards, 2006 (<http://www.who.int/childgrowth/en/>)

## IMC por Idade MENINOS

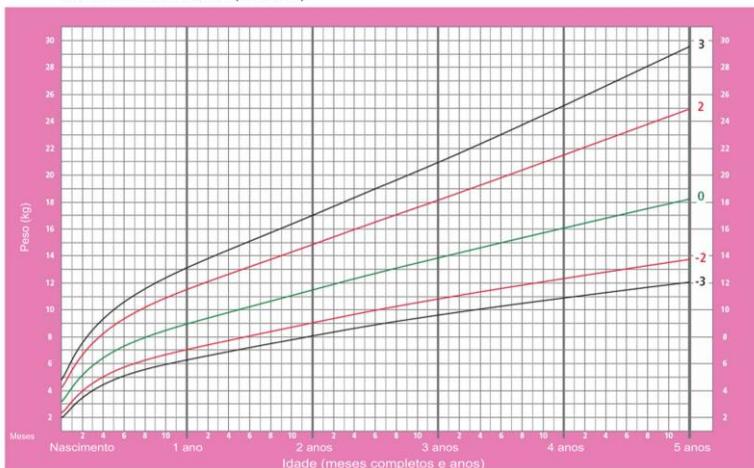
Do nascimento aos 5 anos (escores-z)



Fonte: WHO Child Growth Standards, 2006 (<http://www.who.int/childgrowth/en/>)

## Peso por Idade MENINAS

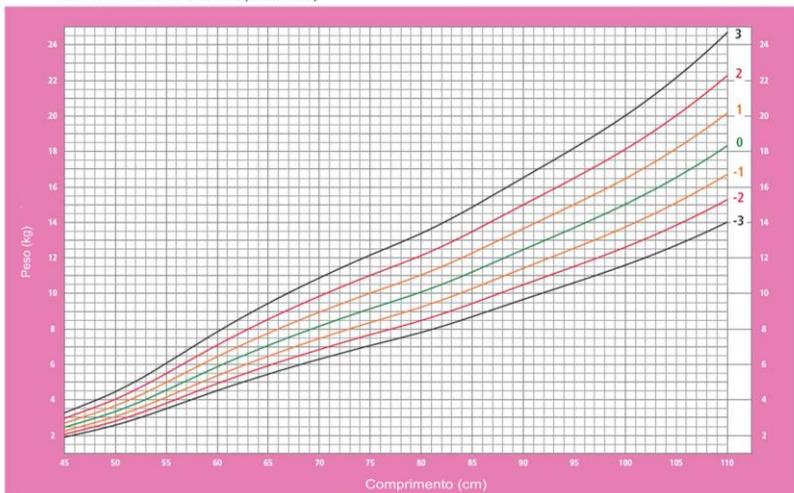
Do nascimento aos 5 anos (escores-z)



Fonte: WHO Child Growth Standards, 2006 (<http://www.who.int/childgrowth/en/>)

## Peso por comprimento MENINAS

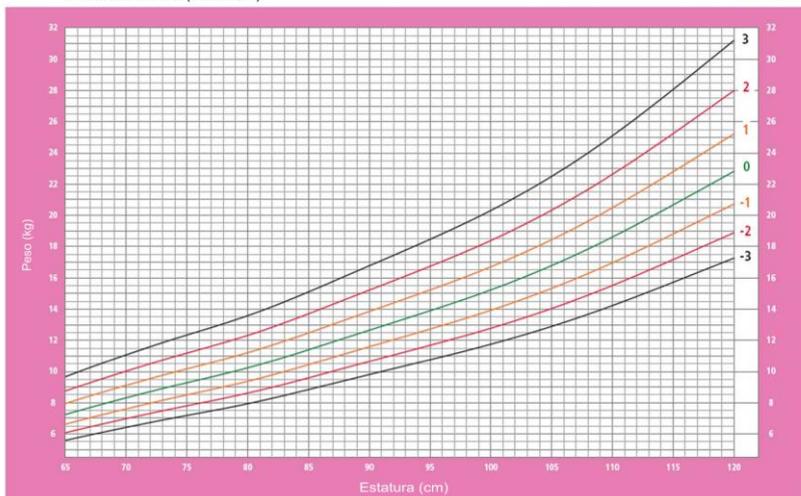
Do nascimento aos 2 anos (escores-z)



Fonte: WHO Child Growth Standards, 2006 (<http://www.who.int/childgrowth/en/>)

## Peso por estatura MENINAS

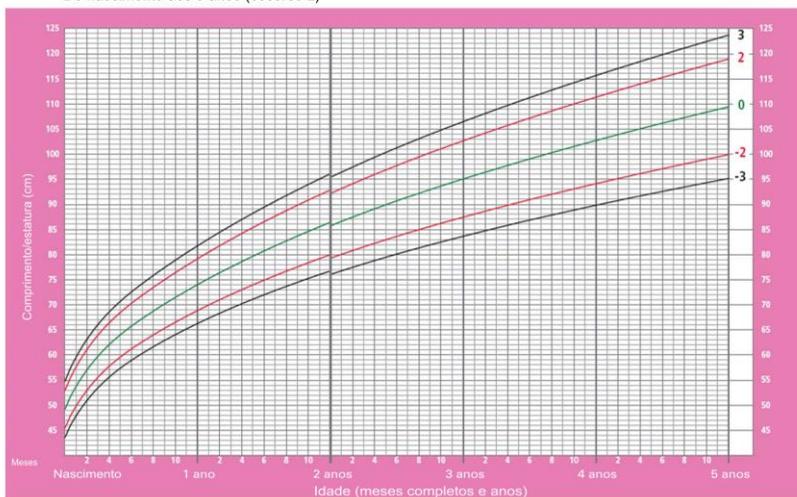
Dos 2 aos 5 anos (escores-z)



Fonte: WHO Child Growth Standards, 2006 (<http://www.who.int/childgrowth/en/>)

## Comprimento/estatura por idade MENINAS

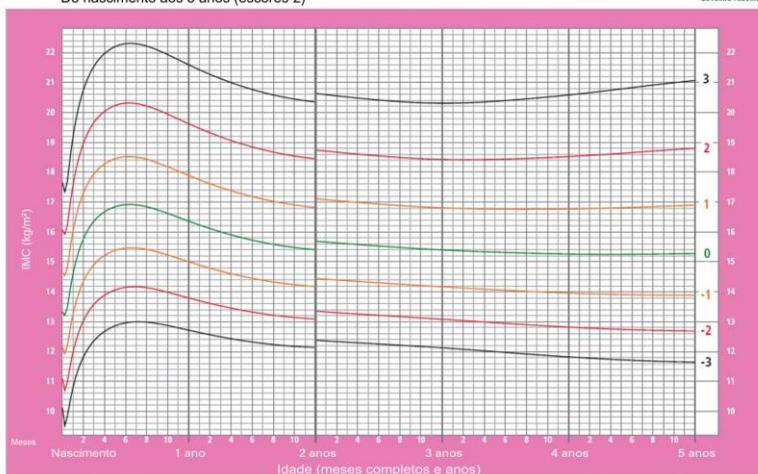
Do nascimento aos 5 anos (escores-z)



Fonte: WHO Child Growth Standards, 2006 (<http://www.who.int/childgrowth/en/>)

## IMC por Idade MENINAS

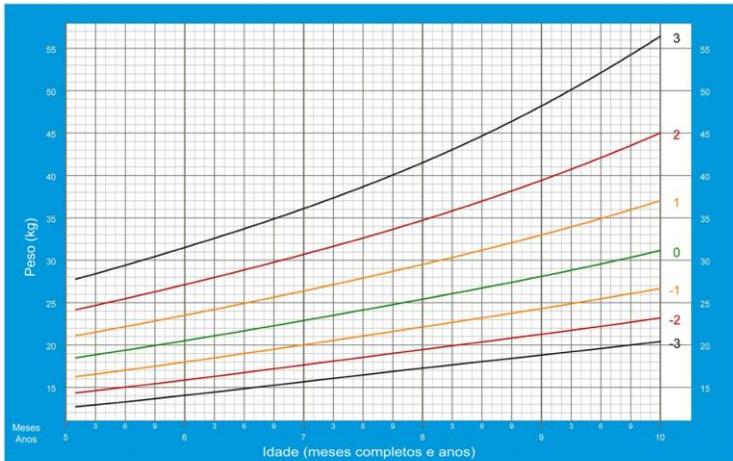
Do nascimento aos 5 anos (escores-z)



Fonte: WHO Child Growth Standards, 2006 (<http://www.who.int/childgrowth/en/>)

### Peso por idade MENINOS

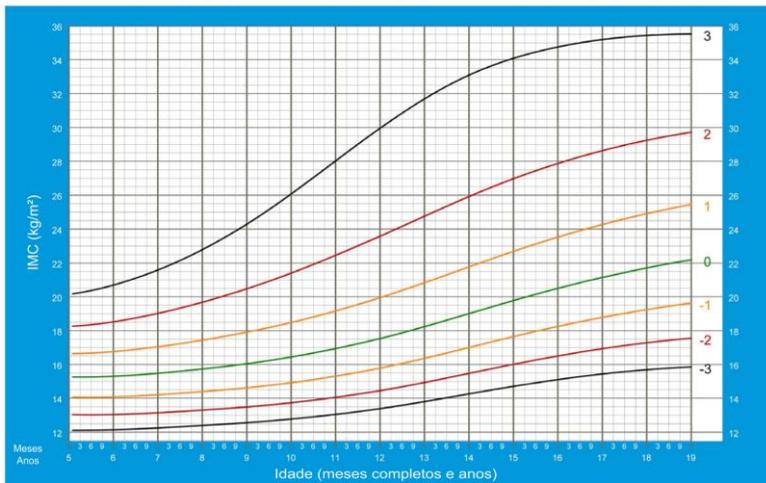
Dos 5 aos 10 anos (escores-z)



Fonte: WHO Growth reference data for 5-19 years, 2007 (<http://www.who.int/growthref/en/>)

### IMC por idade MENINOS

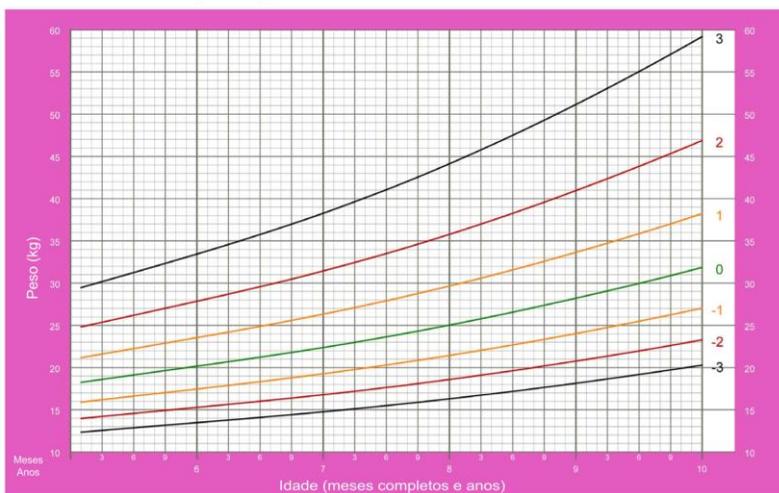
Dos 5 aos 19 anos (escores-z)



Fonte: WHO Growth reference data for 5-19 years, 2007 (<http://www.who.int/growthref/en/>)

## Peso por idade MENINAS

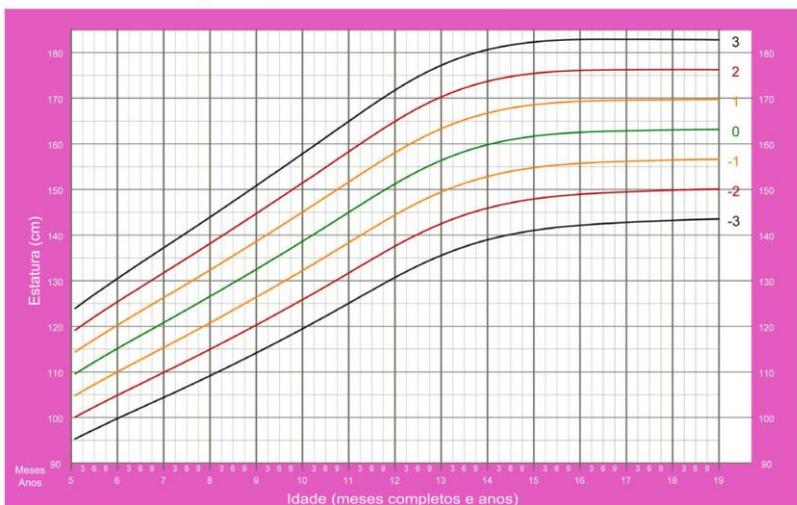
Dos 5 aos 10 anos (escores-z)



Fonte: WHO Growth reference data for 5-19 years, 2007 (<http://www.who.int/growthref/en/>)

## Estatura por idade MENINAS

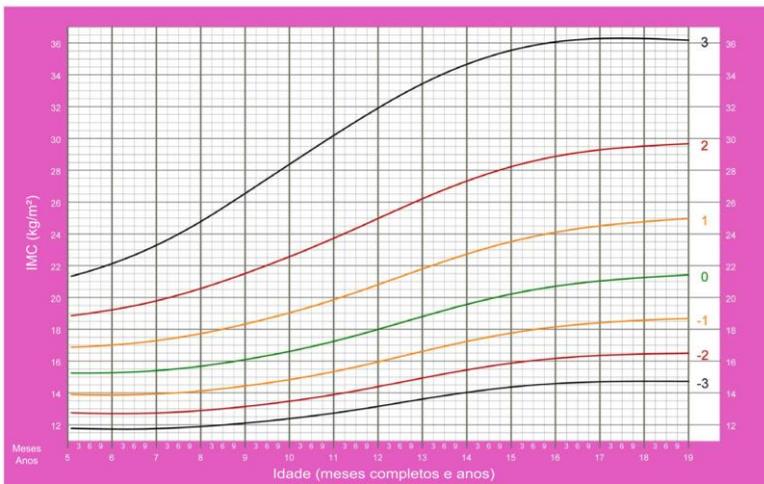
Dos 5 aos 19 anos (escores-z)



Fonte: WHO Growth reference data for 5-19 years, 2007 (<http://www.who.int/growthref/en/>)

### IMC por idade MENINAS

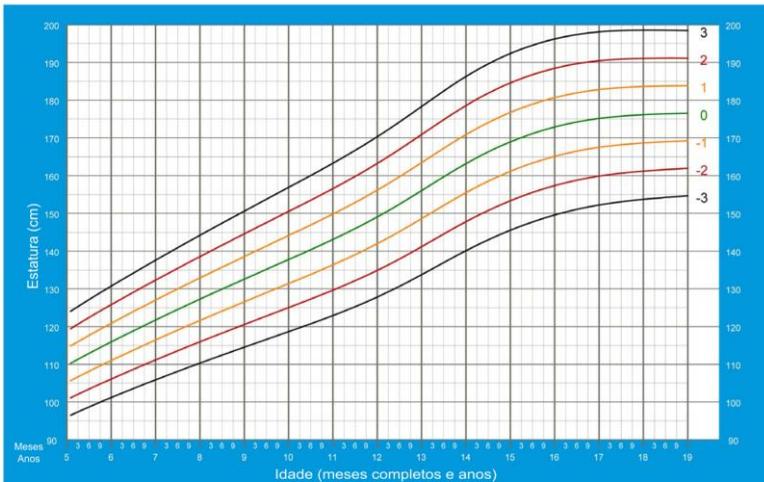
Dos 5 aos 19 anos (escores-z)



Fonte: WHO Growth reference data for 5-19 years, 2007 (<http://www.who.int/growthref/en/>)

### Estatura por idade MENINOS

Dos 5 aos 19 anos (escores-z)



Fonte: WHO Growth reference data for 5-19 years, 2007 (<http://www.who.int/growthref/en/>)

## ANEXO B

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE NEOPTERINAS, ATIVIDADE DA CADEIA RESPIRATÓRIA E EPIGENÉTICA DOS PACIENTES COM OBESIDADE E / OU DIABETES MELLITUS

**Pesquisador:** Alexandre Hohl

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 33173314.7.0000.0121

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Santa Catarina

**Patrocinador Principal:** FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA E INOVAÇÃO DO ESTADO DE SANTA CATARINA

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 764.497

**Data da Relatoria:** 25/08/2014

**Apresentação do Projeto:**

Estudo de Hohl que pretende avaliar 300 pacientes dos ambulatórios de endocrinologia do HU-UFSC.

**Objetivo da Pesquisa:**

Segundo os autores:

**Objetivo Primário:**

Avaliar os parâmetros clínicos, marcadores inflamatórios e perfil metabólico de pacientes atendidos nos Ambulatórios de Endocrinologia e Metabologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC).

**Objetivo Secundário:**

Avaliar os níveis plasmáticos de neopterina em pacientes diabéticos e com obesidade. Determinar a associação entre consumo de oxigênio e atividade da cadeia respiratória mitocondrial e o controle metabólico de pacientes diabéticos e obesos. Avaliar a hipermetilação e hipometilação de DNA em

**Endereço:** Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima  
**Bairro:** Trindade **CEP:** 88.040-900  
**UF:** SC **Município:** FLORIANÓPOLIS  
**Telefone:** (48)3721-9206 **Fax:** (48)3721-0696 **E-mail:** cep@reitoria.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 764.497

pacientes com obesidade e diabetes.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Adequada.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Podem contribuir para o conhecimento generalizável sobre o tema.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Adequados.

**Recomendações:**

Não há.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Aprovado.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

FLORIANOPOLIS, 25 de Agosto de 2014

---

Assinado por:  
Washington Portela de Souza  
(Coordenador)

Endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima  
Bairro: Trindade CEP: 88.040-900  
UF: SC Município: FLORIANOPOLIS  
Telefone: (48)3721-6206 Fax: (48)3721-6698 E-mail: cep@reitoria.ufsc.br

## **ANEXO C: SERUM LEVELS OF ULTRA-SENSITIVE C-REACTIVE PROTEIN, INTERLEUKIN-1 $\beta$ AND NEOPTERIN IN BRAZILIAN OBESE CHILDREN: A CASE CONTROL-STUDY**

Rose Marie Mueller Linhares,<sup>1,3</sup> Roberta de Paula Martins, Karina Ghisoni, Débora da Luz Scheffer, Gianni Mancini, Carolina Ignácio Geraldo, Marcelo Fernando Ronsoni,<sup>5</sup> Alexandre Hohl,<sup>5</sup> Alexandra Latini,<sup>4,6</sup> Roger Walz.<sup>1,5,6</sup>

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Hospital Universitário (HU), UFSC, Florianópolis, SC, Brazil;

Hospital Infantil Joana de Gusmão, Florianópolis, SC, Brazil.

Departamento de Pediatria, HU, UFSC, Florianópolis, SC, Brazil.

Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo – LABOX –, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brazil.

Departamento de Clínica Médica, HU, UFSC, Florianópolis, SC, Brazil.

Centro de Neurociências Aplicadas (CeNAp), Hospital Universitário (HU), Universidade<sup>1</sup> Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brazil;

Laboratório Experimental de Doenças Neurodegenerativas, Departamento de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, UFSC, Florianópolis/SC, Brazil.

**Corresponding Author:** Prof. Roger Walz, M.D., Ph.D.,

### **Highlights:**

Immune system and obesity shows a bidirectional interaction;

Ultra-Sensitive C reactive protein, low density lipoprotein cholesterol and Interleukin 1 $\beta$  serum levels were not independently associated with children obesity;

Serum neopterin was negatively associated with low density lipoprotein cholesterol and age;

Serum IL-1 $\beta$  was positively associated with diastolic blood pressure.

**Objective:** Identification of biomarkers associated with infantile obesity can be useful for diagnosis, follow-up, identification of therapeutic targets, and to predict outcomes. Because immune system and obesity shows a complex and bidirectional interaction, we investigated the serum levels of inflammatory molecules in obese children.

**Design and Methods:** We compared the serum levels of Ultra-sensitive C reactive protein (US-CRP), interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and neopterin between eutrophic (n = 17) and obese (n = 36) consecutive children followed in our pediatric outpatient clinic. Independent predictors for inflammatory biomarkers and obesity were identified by multiple logistic regressions.

**Results:** No significant difference in the US-CRP between eutrophic and obese children. Obese children showed a trend for higher levels of IL-1 $\beta$  ( $p = 0.15$ ) and lower levels of neopterin ( $p = 0.09$ ). After correction for imbalances in the other demographic, clinical and laboratorial variables, no independent associations ( $p \geq 0.21$ ) were observed between obesity and the serum levels of IL-1 $\beta$  and neopterin. There was a weak and negative association between neopterin and LDLc levels and age, and positive association between IL-1 $\beta$  and diastolic blood pressure in our children.

**Conclusions:** Serum levels of US-CRP levels, IL-1 $\beta$  and neopterin were not independently associated with obesity in Brazilian children. Neopterin levels was negatively associated with serum LDLc and age and IL-1 $\beta$  levels positively associated with diastolic blood pressure. Further multicentric research involving a large sample size of patients will help to clarify the association between children obesity and serum levels of neopterin, IL-1 $\beta$  and other inflammatory biomarkers.

**Key words:** Children obesity; inflammation; Ultra-sensitive C reactive protein; interleukin 1 $\beta$ ; neopterin.

### ***Introduction***

Childhood overweight and obesity became a worldwide public health problem in the less few years and despite the levels of undernutrition, also has been increased in low and middle-income countries including Brazil.(Lobstein et al., 2015a; Pereira da Cunha Sousa, Alves de Olinda, & Estatura Crescimento Sobrepeso Obesidade, 2016) The etiology of obesity is complex and includes both inherited and environmental factors which contribute to consumption of a high-calorie diet and reduced physical activity.(Cox et al., 2015; Lobstein et al., 2015a)

Saturated fats can activate neuroinflammation in the hypothalamus, affecting the capacity of such neurons to respond appropriately to satiety and adipostatic signals.(Araujo, Moraes, Cintra, & Velloso, 2016) Inflammatory markers have been consistently associated with both obesity and risk of adverse outcomes in obesity-associated diseases, including the metabolic syndrome (hypertension, dyslipidemia, insulin resistance), type 2 diabetes, cardiovascular disease, renal disease, and non-alcoholic fatty liver disease.(Choi et al., 2013; Cox et al., 2015; Lobstein et al., 2015a)

C-reactive protein (CRP) is a blood plasma protein of hepatic origin whose levels rise in response to inflammation following interleukin-6

secretion by macrophages and T cells.(Choi et al., 2013) A meta-analysis showed a positive Pearson correlation of 0.36 between body mass index (BMI) and blood CRP levels (95% confidence interval [CI], 0.30-0.42) in adults and 0.37 (CI, 0.31-0.43) in children.(Choi et al., 2013)

Interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ), a cytokine produced by activated macrophages mediates the inflammatory response and is involved in cell proliferation, differentiation, and apoptosis. IL-1 $\beta$  is implicated in the pathogenesis of type 2 diabetes(Donath et al., 2013) but little is known about IL-1 $\beta$  levels in childhood obesity. Recently, elevated levels of IL-1 $\beta$  and interleukine 6 (IL-6) on the first postnatal day were associated with increased BMI at 2 years of age. However, after multiple linear regression analysis only the IL-6 levels remain significant associated with the increased BMI at 2 years.(Perrin et al., 2017a)

Neopterin is peripherally produced by monocytic cells by interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) or IL-1 $\beta$  found in biological fluids of patients with inflammatory disorders.(Ghisoni et al., 2015; Grammer et al., 2009) It is a sensitive marker of cell-mediated immune activation in infections, neurodegenerative, neurologic and cardiovascular diseases.(Ghisoni et al., 2015; Grammer et al., 2009) The serum neopterin were elevated in obese children and adolescents from India(Rao G, Gurumurthy, E, & Cherian, 2013), but not obese adolescents from Austria(Mangge et al., 2011b) and Turkey.(Kabaroğlu et al., 2012)

Because persistent, low-grade, inflammatory response has been associated with obesity we investigated the serum levels of ultra-sensitivity CRP, IL-1 $\beta$  and neopterin in obese children and compared with a non-obese age and gender matched control group(Cox et al., 2015) controlling for distribution of other clinically relevant variables.

### ***Material and methods***

Blood sample were obtained through venous puncture in 43 consecutive pediatric white patients followed at the pediatric outpatient clinic of Hospital Universitário, UFSC (Florianópolis city, southern Brazil) between may 2015 to may 2016. They were followed because of obesity only (n = 31), obesity and other clinical diagnosis (n = 05), clinical diagnosis other than obesity (n = 11) and six were healthy. The blood sample was collected during for routine laboratorial evaluation and the exceeding volume were storage for the immunologic biomarkers analysis proposed in this research. All participants were clinically stable, had no infectious diseases or used anti-inflammatory drugs in the

previous 60 days of the blood sampling. None had previous rheumatologic or neoplastic disease. The project was approved by the Ethic Committee for Human Research of our University (CAAE 33173314.7.0000.0121). Informed consent was signed by the children parents or their legal sponsors.

Patients were classified as obese if they had a body mass index (BMI) greater than or equal to the 95th percentile expected for their gender and age. There were no overweight children (BMI > 98% and < 95%) in our sample.

### ***Quantification of neopterin, IL-1 $\beta$ and ultra-sensitive C reactive protein***

Serum ultra-sensitivity C reactive protein (US-CRP) was determined by photocolormetry (Dimension RXL, Siemens). Results were expressed in expressed in mg/L.

Serum IL-1 $\beta$  levels were determined by the human cytokine ELISA kits from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). The levels of cytokines were estimated by interpolation from a standard curve by colorimetric measurements at 450 nm (correction wavelength 540 nm) on an ELISA plate reader (Infinite 200 PRO TECAN Switzerland). Assays were sensitive to 1.5 pg/mL of IL-1 $\beta$  inter- and intra-assay coefficients of variation <10 % and the results expressed in pg/mL.

Serum neopterin levels were assessed by ELISA using a commercial kit (IBL international GmbH, Hamburg, Germany). The neopterin levels were estimated by interpolation from a standard curve by colorimetric measurements at 450 nm on an ELISA plate reader (Infinite® 200 PRO TECAN, Männedorf, Switzerland) and expressed in nmol/L.

### ***2.2. Statistical Analysis***

Categorical variables were analyzed by Fisher's exact test and the continuous variables were analyzed by Student "t" test. Uni and multiple linear regressions were used to identify independent predictors of serum levels of the biomarkers of interest (dependent variables). Uni and multiple binary logistic regression was done to identify independent predictors of obesity (dependent variable). Predictors showing an association with obesity with a  $p < 0.15$  in the univariate analysis were included in the multiple regressions. Because we have a previous established hypothesis and the relatively small sample size, no corrections for multiple comparisons and a  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## Results

The table 1 shows the characteristics of eutrophic and obese children. The mean (SE) BMI was 16.6 (0.6) in the eutrophic group and 28.2 (1.0) in the obese group ( $p < 0.0001$ ). Obese children were older ( $p = 0.05$ ), had higher levels of systolic and diastolic blood pressure ( $p = 0.001$ ) and lower HDLc levels ( $p < 0.0001$ ). Obese children also showed a non-significant trend for higher LDLc ( $p = 0.08$ ), triglycerides ( $p = 0.06$ ), hematocrit ( $p = 0.08$ ) and insulin levels ( $p = 0.07$ ). The serum US-CRP did not differ between the investigated groups. There were a non-significant trend for lower levels of IL-1 $\beta$  ( $p = 0.15$ ) and neopterin ( $p = 0.09$ ) in obese children.

The multiple binary logistic regression analysis (see table 2) showed that only serum levels of LDLc and diastolic blood pressure levels, but not IL-1 $\beta$  and neopterin levels, remain independently associated with children obesity. Taken together, the serum levels of LDLc and the diastolic blood pressure levels showed an overall accuracy of 89.5% to predict the obesity in our sample (Sensitivity 81.2% and specificity 92.6%); Finally, because neopterin can be peripherally produced by monocytic cells by IL-1 $\beta$  stimulation (Ghisoni et al., 2015) we analyzed the association between the serum levels of IL-1 $\beta$  and neopterin. There was no association between IL-1 $\beta$  and neopterin levels in our patients ( $r = 0.09$ ,  $p = 0.52$ ) excluding the possibility of collinearity between neopterin and IL-1 $\beta$ .

To better understand the trend of association between obesity and IL-1 $\beta$  and neopterin, we identify other variables associated with these two inflammatory biomarkers with a  $p < 0.15$  level of significance by linear regression (see supplementary table 1). The final multiple linear regression model shows that age and LDLc levels were independent and negative predictors of neopterin levels and explain 18% ( $r^2 = 0.18$ ) of its variation in our sample. There was a non-significant trend ( $r^2 = 0.07$ ,  $p = 0.10$ ) for a positive association between the diastolic blood pressure and the serum IL-1 $\beta$  levels in our patients (supplementary table 1).

The results suggests the observed trend for association between obesity and serum IL-1 $\beta$  and neopterin can be related to imbalances in the serum levels of LDLc and diastolic blood pressure distribution in our sample.

## Discussion

There is a trend for lower levels of neopterin and increased levels of IL-1 $\beta$  in obese children. These findings can be related to LDLc and

diastolic blood pressure in this pediatric patients. The lack of association between US-CRP levels and obesity was an unexpected result. We believe it can be related to genetic particularities and time-course of obesity duration of our patients. We were unable to estimate the duration of the obesity in our sample and this can be an important point to be investigated in a prospective study.

The positive association between IL-1 $\beta$  and diastolic blood pressure (Supplem. Table 1) was previously showed in polish obese children,(Anhelli Syrenicz, Garanty-Bogacka, Syrenicz, Gebala, Dawid, et al., 2006b; Anhelli Syrenicz, Garanty-Bogacka, Syrenicz, Gebala, & Walczak, 2006) but became nonsignificant after the multiple regression analysis. When injected in patients with bone marrow failure, the IL-1 $\beta$  can induces hypertension (85%) or hypotension (57%)(Nemunaitis et al., 1994). The mechanistic implications for this hemodynamic effects of IL-1 $\beta$  for blood pressure homeostasis in obese children is unknown.

The lack of independent association between neopterin and obesity in our children are in agreement with previous findings in obese adolescents from Austria(Mangege et al., 2011b) and Turkey.(Kabaroglu et al., 2012) Like our obese children, the neopterin levels were not associated with obesity in adults with Germanic descent (n=2312), but was negatively and independently associated with LDLc and other cardiovascular risk factors.(Grammer et al., 2009) In the same sample neopterin levels were also positively and independently associated with age. Although genetic background may be involved, the observed association between neopterin and obesity in Indian children/adolescent(Rao G et al., 2013) could be at least in part due to imbalances in the LDLc levels or other non-controlled variables.

### ***Conclusions***

Serum levels of US-CRP levels, interleukin 1 $\beta$  and neopterin are not significantly and independently associated with obesity in Brazilian children. Spurious associations between neopterin and IL-1 $\beta$  and obesity may result from imbalances in the distribution of other variables including serum LDLc (for neopterin) and diastolic blood pressure (for IL-1 $\beta$ ). If neopterin and interleukin-1 $\beta$  are directly involved with the modulation or only epiphenomenal with serum LDLc or blood pressure is an important point to be investigated. Further multicentric research involving a large sample size of patients will help to clarify the association between children obesity and serum levels of neopterin, IL-1 $\beta$  and other inflammatory biomarkers.

**Acknowledgment:** This work was supported by PRONEX Program (Programa de Núcleos de Excelência - NENASC Project) of FAPESC-CNPq-MS, Santa Catarina Brazil (process 56802/2010). Professors RW, RDP and AL are supported by CNPq research fellowships.

## REFERENCES

- Akash, M. S. H., Rehman, K., & Chen, S. (2013). Role of inflammatory mechanisms in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Journal of Cellular Biochemistry*, 114(3), 525–531.
- Araujo, E. P., Moraes, J. C., Cintra, D. E., & Velloso, L. A. (2016). Mechanisms in endocrinology: Hypothalamic inflammation and nutrition. *European Journal of Endocrinology*.  
<https://doi.org/10.1530/EJE-15-1207>
- Atkinson, A. B. (1998). Social Exclusion, Poverty and Unemployment. *Exclusion, Employment and Opportunity, CASE Paper No 4*, (January), 9–24.  
<https://doi.org/papers2://publication/uuid/23323176-487F-4C15-96E4-FE8AF1D92A06>
- Barness, L. A. (2007). Obesity in children. *Fetal and Pediatric Pathology*, 26(2), 75–85.  
<https://doi.org/10.1080/15513810701448755>
- Bataille, Rég., & Klein, B. (1992). C-reactive protein levels as a direct indicator of interleukin-6 levels in humans in vivo. *Arthritis & Rheumatism*. <https://doi.org/10.1002/art.1780350824>
- Bell, C. G., Walley, A. J., & Froguel, P. (2005). The genetics of human obesity. *Nature Reviews Genetics*. <https://doi.org/10.1038/nrg1556>
- Bellizzi, M. C., & Dietz, W. H. (1999). Workshop on childhood obesity: Summary of the discussion. In *American Journal of Clinical Nutrition* (Vol. 70). <https://doi.org/10.1016/j.bone.2007.05.003>
- Bernstein, B. E., Meissner, A., & Lander, E. S. (2007). The Mammalian Epigenome. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.033>
- Blüher, S., Käßlinger, J., Herget, S., Reichardt, S., Böttcher, Y., Grimm, A., ... Petroff, D. (2017). Cardiometabolic risk markers, adipocyte fatty acid binding protein (aFABP) and the impact of high-intensity interval training (HIIT) in obese adolescents. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 68, 77–87.
- Bodi, V., Sanchis, J., Llacer, A., Facila, L., Nunez, J., Pellicer, M., ... Chorro, F. J. (2004). [Independent role of C reactive protein to predict major events at one-month and at one-year in acute coronary syndrome without ST elevation]. *Medicina Clínica*, 122(7), 248–252. <https://doi.org/13058372> [pii]
- Bouchard, C. (1992). Etiology of obesity: genetic factors. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 42(3 Suppl).
- Boyd, A. E., Lebovitz, H. E., & Feldman, J. M. (1971). Endocrine function and glucose metabolism in patients with Parkinson's

- disease and their alternation by L-Dopa. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 33(5), 829–837.
- Boyle, J. P., Thompson, T. J., Gregg, E. W., Barker, L. E., & Williamson, D. F. (2010). Projection of the year 2050 burden of diabetes in the US adult population: dynamic modeling of incidence, mortality, and prediabetes prevalence. *Population Health Metrics*, 8, 29.
- Brasil. (2015). *Pesquisa Nacional de Saúde 2013*. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).  
<https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e3181949333>
- Brauer, R., Bhaskaran, K., Chaturvedi, N., Dexter, D. T., Smeeth, L., & Douglas, I. (2015). Glitazone Treatment and Incidence of Parkinson's Disease among People with Diabetes: A Retrospective Cohort Study. *PLoS Medicine*, 12(7), e1001854.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001854>
- Bray, G. A. (2014). *Handbook of Obesity -- Volume 1*. CRC Press.
- Bulló, M., García-Lorda, P., Megias, I., & Salas-Salvadó, J. (2003). Systemic inflammation, adipose tissue tumor necrosis factor, and leptin expression. *Obesity Research*, 11(4), 525–531.  
<https://doi.org/10.1038/oby.2003.74>
- Burke, V. (2006). Obesity in childhood and cardiovascular risk. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 33(9), 831–7.  
<https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2006.04449.x>
- Calle, E. E., Teras, L. R., & Thun, M. J. (2005). Obesity and mortality. *The New England Journal of Medicine*, 353, 2197–2199.  
<https://doi.org/10.1056/NEJM200511173532020>
- Calle, E. E., Thun, M. J., Petrelli, J. M., Rodriguez, C., & Heath, C. W. (1999). Body-mass index and mortality in a prospective cohort of U.S. adults. *New Engl J Med*, 341(15), 1097–105.  
<https://doi.org/10.1056/NEJM199910073411501>
- Choi, J., Joseph, L., & Pilote, L. (2013). Obesity and C-reactive protein in various populations: A systematic review and meta-analysis. *Obesity Reviews*. <https://doi.org/10.1111/obr.12003>
- Cook, D. G., Mendall, M. a, Whincup, P. H., Carey, I. M., Ballam, L., Morris, J. E., ... Strachan, D. P. (2000). C-reactive protein concentration in children: relationship to adiposity and other cardiovascular risk factors. *Atherosclerosis*, 149(1), 139–150.  
[https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(99\)00312-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(99)00312-3)
- Cox, A. J., West, N. P., & Cripps, A. W. (2015). Obesity, inflammation, and the gut microbiota. *The Lancet Diabetes and Endocrinology*.  
[https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(14\)70134-2](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(14)70134-2)

- Craft, S. (2012). Alzheimer disease: insulin resistance and AD--- extending the translational path. *Nature Reviews Neurology*, 8(7), 360–362.
- Crane, P. K., Walker, R., & Larson, E. B. (2013). Glucose levels and risk of dementia. *New England Journal of Medicine*, 369(19), 1863–1864.
- D'Amelio, M., Ragonese, P., Callari, G., Di Benedetto, N., Palmeri, B., Terruso, V., ... Savettieri, G. (2009). Diabetes preceding Parkinson's disease onset. A case-control study. *Parkinsonism & Related Disorders*, 15(9), 660–664.
- Dallagnol, K. M. C., Remor, A. P., da Silva, R. A., Prediger, R. D., Latini, A., & Aguiar, A. S. (2017). Running for REST: Physical activity attenuates neuroinflammation in the hippocampus of aged mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 61, 31–35.
- Das, U. N. (2001). Is obesity an inflammatory condition? *Nutrition*. [https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(01\)00672-4](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(01)00672-4)
- Day, S. E., Coletta, R. L., Kim, J. Y., Garcia, L. A., Campbell, L. E., Benjamin, T. R., ... Coletta, D. K. (2017). Potential epigenetic biomarkers of obesity-related insulin resistance in human whole-blood. *Epigenetics*, 12(4), 254–263.
- Donath, M. Y., Dalmas, É., Sauter, N. S., & Böni-Schnetzler, M. (2013). Inflammation in obesity and diabetes: Islet dysfunction and therapeutic opportunity. *Cell Metabolism*. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.05.001>
- Duncan, G. E. (2006). Prevalence of diabetes and impaired fasting glucose levels among US adolescents: National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2002. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*, 160(5), 523–528. <https://doi.org/10.1001/archpedi.160.5.523>
- Dunn, L., Allen, G. F., Mamais, A., Ling, H., Li, A., Duberley, K. E., ... Bandopadhyay, R. (2014). Dysregulation of glucose metabolism is an early event in sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, 35(5), 1111–1115.
- Ebersole, J. L., Machen, R. L., Steffen, M. J., & Willmann, D. E. (1997). Systemic acute-phase reactants, C-reactive protein and haptoglobin, in adult periodontitis. *Clinical and Experimental Immunology*, 107(2), 347–352. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1997.270-ce1162.x>
- Eknoyan, G. (2008). Adolphe Quetelet (1796-1874) - The average man and indices of obesity. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 23(1), 47–51. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfm517>

- Fantuzzi, G., Zheng, H., Faggioni, R., Benigni, F., Ghezzi, P., Sipe, J. D., ... Dinarello, C. A. (1996). Effect of endotoxin in IL-1 beta-deficient mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *157*(1), 291–6. <https://doi.org/10.1179/096805106X153952>
- Figlewicz, D. P., Schwartz, M. W., Seeley, R. J., Chavez, M., Baskin, D. G., Woods, S. C., & Porte, D. (1996). Endocrine regulation of food intake and body weight. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. [https://doi.org/10.1016/S0022-2143\(96\)90179-1](https://doi.org/10.1016/S0022-2143(96)90179-1)
- Frayling, T. M., Timpson, N. J., Weedon, M. N., Freathy, R. M., Lindgren, C. M., Perry, J. R. B., ... McCarthy, M. I. (2007). A Common Variant in the FTO Gene Is Associated with Body Mass Index and Predisposes to Childhood and Adult Obesity. *Science*, *316*(5826), 889–894. <https://doi.org/10.1126/science.1141634>
- Geloneze, B., Mancini, M. C., & Coutinho, W. (2009). Obesity: knowledge, care, and commitment, but not yet cure. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia E Metabologia*, *53*(2), 117–119.
- Ghisoni, K., Aguiar, A. S., de Oliveira, P. A., Matheus, F. C., Gabach, L., Perez, M., ... Latini, A. (2015). Neopterin acts as an endogenous cognitive enhancer. *Brain, Behavior, and Immunity*, *56*, 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.02.019>
- Ghisoni, K., Aguiar, A. S., de Oliveira, P. A., Matheus, F. C., Gabach, L., Perez, M., ... Latini, A. (2016). Neopterin acts as an endogenous cognitive enhancer. *Brain, Behavior, and Immunity*, *56*, 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.02.019>
- Gigante, D. P., Moura, E. C. de, & Sardinha, L. M. V. (2009). Prevalence of overweight and obesity and associated factors, Brazil, 2006. *Revista de Saude Publica*, *43 Suppl 2*, 83–89.
- González-Muniesa, P., Martínez-González, M.-A., Hu, F. B., Després, J.-P., Matsuzawa, Y., Loos, R. J. F., ... Martínez, J. A. (2017). Obesity. *Nature Reviews Disease Primers*, *3*, 17034. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.34>
- Grammer, T. B., Fuchs, D., Boehm, B. O., Winkelmann, B. R., & Maerz, W. (2009). Neopterin as a predictor of total and cardiovascular mortality in individuals undergoing angiography in the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health study. *Clinical Chemistry*, *55*(6), 1135–1146. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.118844>

- Grundy, S. M., Pasternak, R., Greenland, P., Smith, S., & Fuster, V. (1999). Assessment of Cardiovascular Risk by Use of Multiple-Risk-Factor Assessment Equations : A Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association and the American College of Cardiology. *Circulation*, *100*(13), 1481–1492. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.100.13.1481>
- Halpern, A., Mancini, M. C., Magalhães, M. E. C., Fisberg, M., Radominski, R., Bertolami, M. C., ... Nery, M. (2010). Metabolic syndrome, dyslipidemia, hypertension and type 2 diabetes in youth: from diagnosis to treatment. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, *2*, 55.
- Han, J. C., Lawlor, D. a., & Kimm, S. Y. S. (2010). Childhood Obesity – 2010 : Progress and Challenges. *Lancet*, *375*(9727), 1737–1748. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60171-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60171-7). Childhood
- Hansen, P. J. (1951). Lowry Protein Assay. *Laboratory Procedures - University of Florida*, *13*(5), 1–2. <https://doi.org/10.1021/jf1005935>.
- IBGE. (2013). *Pesquisa Nacional de Saúde 2013. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)*. <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e3181949333>
- Kabaroğlu, C., Onur, E., Barutçuoğlu, B., Özhan, B., Erdinç, S., Var, A., ... Ersoy, B. (2012). Inflammatory marker levels in obese adolescents with glucose intolerance: Increased chitotriosidase activity. *Clinical Biochemistry*, *45*(4–5), 281–284. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2011.12.007>
- Kabaroğlu, C., Onur, E., Barutçuoğlu, B., Özhan, B., Erdinç, S., Var, A., ... Ersoy, B. (2012). Inflammatory marker levels in obese adolescents with glucose intolerance: Increased chitotriosidase activity. *Clinical Biochemistry*, *45*(4–5), 281–284. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2011.12.007>
- Koenig, W., & Khuseyinova, N. (2007). Biomarkers of atherosclerotic plaque instability and rupture. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000251503.35795.4f>
- Kousta, E., Hadjiathanasiou, C. G., Tolis, G., & Papanthasiou, A. (2009). Pleiotropic Genetic Syndromes with Developmental Abnormalities Associated with Obesity. *Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism*, *22*(7), 581–592.

- Landgrave-GÃ³mez, J., Mercado-GÃ³mez, O., & Guevara-GuzmÃ¡n, R. (2015). Epigenetic mechanisms in neurological and neurodegenerative diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00058>
- Lin, X., Lim, I. Y., Wu, Y., Teh, A. L., Chen, L., Aris, I. M., ... GUSTO study group. (2017). Developmental pathways to adiposity begin before birth and are influenced by genotype, prenatal environment and epigenome. *BMC Medicine*, *15*(1), 50.
- Lobstein, T., Jackson-Leach, R., Moodie, M. L., Hall, K. D., Gortmaker, S. L., Swinburn, B. A., ... McPherson, K. (2015a). Child and adolescent obesity: part of a bigger picture. *The Lancet*, *385*(9986), 2510–2520. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61746-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61746-3)
- Lobstein, T., Jackson-Leach, R., Moodie, M. L., Hall, K. D., Gortmaker, S. L., Swinburn, B. A., ... McPherson, K. (2015b). Child and adolescent obesity: Part of a bigger picture. *The Lancet*, *385*(9986), 2510–2520. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61746-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61746-3)
- Loos, R. J. F., & Bouchard, C. (2003). Obesity--is it a genetic disorder? *Journal of Internal Medicine*, *254*(5), 401–25. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2796.2003.01242.x> [pii]
- Lu, T., Aron, L., Zullo, J., Pan, Y., Kim, H., Chen, Y., ... Yankner, B. A. (2014). REST and stress resistance in ageing and Alzheimer's disease. *Nature*, *507*(7493), 448–454.
- Malta, D. C., Andrade, S. C., Claro, R. M., Bernal, R. T. I., & Monteiro, C. A. (2014). Trends in prevalence of overweight and obesity in adults in 26 Brazilian state capitals and the Federal District from 2006 to 2012. *Revista Brasileira de Epidemiologia = Brazilian Journal of Epidemiology*, *17 Suppl 1*, 267–276.
- Malta, D. C., Stopa, S. R., Iser, B. P. M., Bernal, R. T. I., Claro, R. M., Nardi, A. C. F., ... Monteiro, C. A. (2015). Risk and protective factors for chronic diseases by telephone survey in capitals of Brazil, Vigitel 2014. *Revista Brasileira de Epidemiologia = Brazilian Journal of Epidemiology*, *18 Suppl 2*, 238–255.
- Mancini, M. (2015). Tratado de obesidade (2a. ed.).
- Mancini, M. C. (2009). Metabolic syndrome in children and adolescents - criteria for diagnosis. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, *1*(1), 20.

- Mangge, H., Freytag, F., Almer, G., Weghuber, D., Bauer-Denk, C., & Fuchs, D. (2011a). Serum neopterin is not increased in obese juveniles. *Journal of Obesity*, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/946795>
- Mangge, H., Freytag, F., Almer, G., Weghuber, D., Bauer-Denk, C., & Fuchs, D. (2011b). Serum Neopterin Is Not Increased in Obese Juveniles. *Journal of Obesity*, 2011, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2011/946795>
- Masliah, E., Dumaop, W., Galasko, D., & Desplats, P. (2013). Distinctive patterns of DNA methylation associated with Parkinson disease: identification of concordant epigenetic changes in brain and peripheral blood leukocytes. *Epigenetics*, 8(10), 1030–1038.
- Medford, H. M., Cox, E. J., Miller, L. E., & Marsh, S. A. (2014). Consuming a Western diet for two weeks suppresses fetal genes in mouse hearts. *AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 306(8), R519--R526.
- Molina, P. E. (2007). FISILOGIA ENDOCRINA.
- Moura, E. C., & Claro, R. M. (2012). Estimates of obesity trends in Brazil, 2006-2009. *International Journal of Public Health*, 57(1), 127–133.
- Murr, C., Widner, B., Wirleitner, B., & Fuchs, D. (2002). Neopterin as a marker for immune system activation. *Current Drug Metabolism*, 3(2), 175–187. <https://doi.org/10.2174/1389200024605082>
- Mutch, D. M., & Clément, K. (2006). Genetics of human obesity. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 20(4), 647–664. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2006.09.006>
- Nageswara Rao G, S., Gurumurthy, P., E, S., & Cherian, K. M. (2013). The clinical and biochemical parameters in relation to the serum neopterin levels in Indian children and adolescents. *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR*, 7(4), 618–621. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2013/5128.2866>
- Nemunaitis, J., Appelbaum, F. R., Singer, J. W., Lilleby, K., Wolff, S., Greer, J. P., ... al., et. (1993). Phase I trial with recombinant human interleukin-3 in patients with lymphoma undergoing autologous bone marrow transplantation. *Blood*, 82(11), 3273–3278.

- Nemunaitis, J., Ross, M., Meisenberg, B., O'Reilly, R., Lilleby, K., Buckner, C. D., ... Peters, W. P. (1994). Phase I study of recombinant human interleukin-1 beta (rhIL-1 beta) in patients with bone marrow failure. *Bone Marrow Transplantation*, *14*(4), 583–8.
- Noh, K. M., Hwang, J. Y., Follenzi, A., Athanasiadou, R., Miyawaki, T., Grealley, J. M., ... Zukin, R. S. (2012). Repressor element-1 silencing transcription factor (REST)-dependent epigenetic remodeling is critical to ischemia-induced neuronal death. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(16), E962--E971.
- Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A., & Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, *99*(3), 247–257.
- Ota, T. (2015). *Obesity-induced inflammation and insulin resistance*. Frontiers Media SA.
- Peeters, A., Barendregt, J. J., Willekens, F., Mackenbach, J. P., Al Mamun, A., Bonneux, L., ... Nusselder, W. (2003). Obesity in adulthood and its consequences for life expectancy: A life-table analysis. *Annals of Internal Medicine*, *138*(1), 24–32.  
<https://doi.org/10.7326/0003-4819-138-1-200301070-00008>
- Pereira da Cunha Sousa, C. I., Alves de Olinda, R., & Estatura Crescimento Sobrepeso Obesidade, C. (2016). Prevalence of stunting and overweight/obesity among Brazilian children according to different epidemiological scenarios: systematic review and meta-analysis. *Sao Paulo Med J. Sao Paulo Med J*, *134*(1343), 251–62. <https://doi.org/10.1590/1516-3180.2015.02271211>
- Perrin, E. M., O'Shea, T. M., Skinner, A. C., Bose, C., Allred, E. N., Fichorova, R. N., ... Leviton, A. (2017a). Elevations of inflammatory proteins in neonatal blood are associated with obesity and overweight among 2-year-old children born extremely premature. *Pediatric Research*.  
<https://doi.org/10.1038/pr.2017.313>
- Perrin, E. M., O'Shea, T. M., Skinner, A. C., Bose, C., Allred, E. N., Fichorova, R. N., ... Leviton, A. (2017b). Elevations of inflammatory proteins in neonatal blood are associated with obesity and overweight among 2-year-old children born extremely premature. *Pediatric Research*.

- Polat, T. B., Urganci, N., Caliskan, K. C., & Akyildiz, B. (2008). Correlation of abdominal fat accumulation and stiffness of the abdominal aorta in obese children. *Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism : JPEM*, *21*(11), 1031–1040. <https://doi.org/10.1515/JPEM.2008.21.11.1031>
- Rankinen, T., Zuberi, A., Chagnon, Y. C., Weisnagel, S. J., Argyropoulos, G., Walts, B., ... Bouchard, C. (2006). The human obesity gene map: The 2005 update. *Obesity*, *14*(4), 529–644. <https://doi.org/10.1038/oby.2006.71>
- Rao G, S. N., Gurumurthy, P., E, S., & Cherian, K. M. (2013). The Clinical and Biochemical Parameters in Relation to the Serum Neopterin Levels in Indian Children and Adolescents. *JOURNAL of CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH*, *7*(4), 618–21. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2013/5128.2866>
- Rehman, K., & Akash, M. S. H. (2016). Mechanisms of inflammatory responses and development of insulin resistance: how are they interlinked? *Journal of Biomedical Science*, *23*(1), 87.
- Rehman, K., & Akash, M. S. H. (2017). Mechanism of generation of oxidative stress and pathophysiology of type 2 diabetes mellitus: how are they interlinked? *Journal of Cellular Biochemistry*.
- Rönn, T., & Ling, C. (2015). DNA methylation as a diagnostic and therapeutic target in the battle against Type 2 diabetes. *Epigenomics*, *7*(3), 451–460.
- Rönn, T., Volkov, P., Davegårdh, C., Dayeh, T., Hall, E., Olsson, A. H., ... Ling, C. (2013). A six months exercise intervention influences the genome-wide DNA methylation pattern in human adipose tissue. *PLoS Genetics*, *9*(6), e1003572.
- Rönn, T., Volkov, P., Gillberg, L., Kokosar, M., Perfilyev, A., Jacobsen, A. L., ... Ling, C. (2015). Impact of age, BMI and HbA1c levels on the genome-wide DNA methylation and mRNA expression patterns in human adipose tissue and identification of epigenetic biomarkers in blood. *Human Molecular Genetics*, *24*(13), 3792–3813.
- Samuel, V. T., & Shulman, G. I. (2012). Mechanisms for Insulin Resistance: Common Threads and Missing Links. *Cell*, *148*(5), 852–871.
- Schlenzog, M., Magnus, L., Heide, T., Eschenbruch, J., Steib, F., Tator, M., ... Dahl, E. (2016). Epigenetic loss of putative tumor suppressor SFRP3 correlates with poor prognosis of lung adenocarcinoma patients. *Epigenetics*, *0*.

- Smith, A. R., Smith, R. G., Condliffe, D., Hannon, E., Schalkwyk, L., Mill, J., & Lunnon, K. (2016). Increased DNA methylation near TREM2 is consistently seen in the superior temporal gyrus in Alzheimer's disease brain. *Neurobiology of Aging*, *47*, 35–40.
- Sousa, C. P. da C., Olinda, R. A. de, & Pedraza, D. F. (2016). Prevalence of stunting and overweight/obesity among Brazilian children according to different epidemiological scenarios: systematic review and meta-analysis. *Sao Paulo Medical Journal*, *134*(3), 251–262. <https://doi.org/10.1590/1516-3180.2015.0227121>
- Syrenicz, A., Garanty-Bogacka, B., Syrenicz, M., Gebala, A., Dawid, G., & Walczak, M. (2006a). Relation of low-grade inflammation and endothelial activation to blood pressure in obese children and adolescents. *Neuro Endocrinology Letters*, *27*(4), 459–464.
- Syrenicz, A., Garanty-Bogacka, B., Syrenicz, M., Gebala, A., Dawid, G., & Walczak, M. (2006b). Relation of low-grade inflammation and endothelial activation to blood pressure in obese children and adolescents. *Neuro Endocrinology Letters*, *27*(4), 459–64.
- Syrenicz, A., Garanty-Bogacka, B., Syrenicz, M., Gebala, A., & Walczak, M. (2006). Low-grade systemic inflammation and the risk of type 2 diabetes in obese children and adolescents. *Neuro Endocrinol Lett*, *27*(4), 453–458. <https://doi.org/NEL270406A18> [pii]
- Syrenicz, A., Garanty-Bogacka, B., Syrenicz, M., Gebala, A., & Walczak, M. (2006). Low-grade systemic inflammation and the risk of type 2 diabetes in obese children and adolescents. *Neuro Endocrinology Letters*, *27*(4), 453–8.
- Szmitko, P. E., Fedak, P. W. M., Weisel, R. D., Stewart, D. J., Kutryk, M. J. B., & Verma, S. (2003). Endothelial progenitor cells: New hope for a broken heart. *Circulation*. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000074242.66719.4A>
- Tillett, W. S., & Francis, T. (1930). SEROLOGICAL REACTIONS IN PNEUMONIA WITH A NON-PROTEIN SOMATIC FRACTION OF PNEUMOCOCCUS. *The Journal of Experimental Medicine*, *52*(4), 561–71. <https://doi.org/10.1084/jem.52.4.561>
- Trayhurn, P., & Wood, I. S. (2004). Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *British Journal of Nutrition*, *92*(3), 347. <https://doi.org/10.1079/BJN20041213>

- Venugopal, S. K., Devaraj, S., & Jialal, I. (2003). C-reactive protein decreases prostacyclin release from human aortic endothelial cells. *Circulation*, *108*(14), 1676–8.  
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000094736.10595.A1>
- Venugopal, S. K., Devaraj, S., Yuhanna, I., Shaul, P., & Jialal, I. (2002). Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells. *Circulation*, *106*(12), 1439–1441.  
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000033116.22237.F9>
- Verma, S., Badiwala, M. V., Weisel, R. D., Li, S.-H., Wang, C.-H., Fedak, P. W. M., ... Mickle, D. a G. (2003). C-reactive protein activates the nuclear factor-kappaB signal transduction pathway in saphenous vein endothelial cells: implications for atherosclerosis and restenosis. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, *126*(6), 1886–91.  
<https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2003.07.026>
- Verma, S., Kuliszewski, M. a, Li, S.-H., Szmítko, P. E., Zucco, L., Wang, C.-H., ... Kutryk, M. J. B. (2004). C-reactive protein attenuates endothelial progenitor cell survival, differentiation, and function: further evidence of a mechanistic link between C-reactive protein and cardiovascular disease. *Circulation*, *109*(17), 2058–67. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000127577.63323.24>
- Verma, S., Wang, C.-H., Li, S.-H., Dumont, A. S., Fedak, P. W. M., Badiwala, M. V., ... Stewart, D. J. (2002). A Self-Fulfilling Prophecy: C-Reactive Protein Attenuates Nitric Oxide Production and Inhibits Angiogenesis. *Circulation*, *106*(8), 913–919.  
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000029802.88087.5E>
- Visser, M., Bouter, L. M., McQuillan, G. M., Wener, M. H., & Harris, T. B. (1999). Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *JAMA : The Journal of the American Medical Association*, *282*(22), 2131–5.  
<https://doi.org/10.1001/jama.282.22.2131>
- Volp, A. C. P., Alfenas, R. de C. G., Costa, N. M. B., Minim, V. P. R., Stringueta, P. C., & Bressan, J. (2008). [Inflammation biomarkers capacity in predicting the metabolic syndrome]. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia E Metabologia*, *52*(3), 537–49.  
<https://doi.org/10.1590/S0004-27302008000300015>
- Wang, Y., Monteiro, C., & Popkin, B. M. (2002). Trends of obesity and underweight in older children and adolescents in the United States, Brazil, China, and Russia. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *75*(6), 971–977.

- Weiss, R., Santoro, N., Giannini, C., Galderisi, A., Umamo, G. R., & Caprio, S. (2017). Prediabetes in youths: mechanisms and biomarkers. *The Lancet Child and Adolescent Health*. [https://doi.org/10.1016/S2352-4642\(17\)30044-5](https://doi.org/10.1016/S2352-4642(17)30044-5)
- Weiss, R., Taksali, S. E., Tamborlane, W. V., Burgert, T. S., Savoye, M., & Caprio, S. (2005). Predictors of changes in glucose tolerance status in obese youth. *Diabetes Care*, 28(4), 902–909. <https://doi.org/10.2337/diacare.28.4.902>
- WHO. (2017). WHO | Obesity and overweight. *Who*. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>
- World Health Organization. (1998). The world health report 1998: life in the 21st century A vision for all. *World Health Organisation*, 226. Retrieved from [http://www.who.int/whr/1998/media\\_centre/50facts/en/#%5Cnhttp://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=PAHO&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=25006&indexSearch=ID](http://www.who.int/whr/1998/media_centre/50facts/en/#%5Cnhttp://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=PAHO&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=25006&indexSearch=ID)
- Wu, S. C., & Zhang, Y. (2010). Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11(9), 607–620.
- Yudkin, J. S., Kumari, M., Humphries, S. E., & Mohamed-Ali, V. (2000). Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: Is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis*. [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(99\)00463-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(99)00463-3)
- Zebrack, J. S., Muhlestein, J. B., Horne, B. D., & Anderson, J. L. (2002). C-reactive protein and angiographic coronary artery disease: Independent and additive predictors of risk in subjects with angina. *Journal of the American College of Cardiology*, 39(4), 632–637. [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(01\)01804-6](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(01)01804-6)

**Table 1:** Clinical, demographic and laboratorial characteristics of eutrophic and obese children.

<b>Variables</b>	<b>All cases n = 54 (%)</b>	<b>Eutrophic n = 17 (%)</b>	<b>Obese n = 36 (%)</b>	<b>“p” level</b>
Gender				
Male	29 (54.7)	09 (52.9)	20 (55.6)	
Diagnosis other than obesity				
Adrenal hyperplasia	02 (3.8)	01 (5.9)	01 (2.8)	
Autism	01 (1.9)	01 (5.9)	0	
Congenital cardiomyopathy	01 (1.9)	0	01 (2.8)	
Familial dyslipidemia	01 (1.9)	0	01 (2.8)	
GH deficiency	05 (9.4)	05 (29.4)	0	
Hypothyroidism	04 (7.5)	03 (17.6)	01 (2.8)	
Precocious puberty	03 (5.7)	02 (11.8)	01 (2.8)	
None	36 (67.9)	05 (29.4)	31 (88.8)	N.A.
		<b>mean (SE)</b>	<b>mean (SE)</b>	
Age (years)	10 (0.4)	8.7 (0.8)	10.6 (0.5)	0.05
Weight (Kg)	54.5 (3.9)	31.0 (3.0)	65.6 (4.3)	< 0.0001
Height (cm)	143 (2.7)	132.8 (4.7)	149.2 (3.0)	0.004
Body mass index	24.5 (1.0)	16.6 (0.6)	28.2 (1.0)	< 0.0001
Systolic blood pressure (mmHg)	109.0 (2.3)	93.8 (3.0)	113.8 (2.9)	0.001

Diastolic blood pressure (mmHg)	66.8 (2.0)	53.2 (4.3)	71.1 (2.0)	< 0.0001
Fasting blood glucose (mg/dl)	88.2 (1.5)	86.6 (2.3)	88.9 (1.9)	0.45
Glycated hemoglobin (%)	5.1 (0.1)	5.0 (0.1)	5.1 (0.1)	0.97
LDLc <sup>c</sup> (mg/dl)	91.1 (5.1)	80.1 (7.1)	98.8 (6.6)	0.08
HDLc <sup>d</sup> (mg/dl)	44.9 (1.7)	54.2 (2.7)	39.4 (1.6)	< 0.0001
Triglycerides (mg/dl)	81.3 (6.7)	65.7 (8.6)	91.6 (9.0)	0.06
Hematocrit (%)	39.2 (0.4)	38.3 (0.7)	39.8 (0.5)	0.08
Insulin (uU/mL)	16.9 (3.2)	9.8 (2.8)	20.7 (4.6)	0.07
Immunologic biomarkers levels				
US-CRP <sup>e</sup> (mg/L)	3.8 (1.1)	4.8 (2.3)	3.5 (1.2)	0.57
Interleukin 1 $\beta$ (pg / mL)	57.9 (25.5)	18.7 (12.3)	95.7 (36.0)	0.15
Neopterin <sup>f</sup> (nmol/L)	6.5 (0.6)	8.3 (1.6)	6.0 (0.5)	0.09

---

Obese children show body mass index (BMI) over the 95<sup>th</sup> percentile expected for age and gender. Eutrophic children show the BMI between 5<sup>th</sup> and 95<sup>th</sup> percentile expected for age and gender.

<sup>a</sup> GOT = Glutamic-oxalacetic transaminase; <sup>b</sup> GTP = Glutamic pyruvic transaminase; <sup>c</sup> LDLc = Low density lipoprotein cholesterol; <sup>d</sup> HDLc = High density lipoprotein cholesterol; <sup>e</sup> US-CRP = Ultra-sensitive C reactive protein; <sup>f</sup> IL-1 $\beta$  = Interleukin 1 $\beta$ . N.A. – Non-applied.

**Table 2:** Final model of binary logistic regression showing the variables independently associated with child obesity.

Predictive Variables	Adjusted OR (CI 95%)	"p" level
Age	0.78 (0.45 – 1.36)	0.39
Diastolic blood pressure	1.67 (1.03 – 2.70)	0.04
LDLc <sup>a</sup>	1.13 (0.99 – 1.28)	0.06
IL-1 $\beta$ <sup>b</sup>	1.00 (0.98 – 1.03)	0.71
Neopterin	0.75 (0.47 – 1.18)	0.21

<sup>a</sup> LDL = Low density lipoprotein cholesterol;

<sup>b</sup> IL-1 $\beta$  = Interleukin 1 $\beta$ ;

Obese diagnosis was done if the children body mass index (BMI) was greater than or equal to the 95<sup>th</sup> percentile expected for their gender and age. There were no overweight children (BMI > 98% and < 95%) in our sample;

The multiple binary regression analysis showed that both IL-1 $\beta$  and neopterin levels were not independently associated with child obesity;

Taken together the serum levels of LDLc and diastolic blood pressure together shows an overall accuracy of 89.5% to predict obesity (Sensitivity 81.2% and specificity 92.6%).

**Suppl. Table 1:** Variables independently associated with serum level of neopterin and IL-1 $\beta$ .

Predictive variables	Regression coefficients <sup>a</sup>			"p" level
	B	r	r <sup>2</sup>	
<b>Neopterine predictors</b>				
<b>Initial Model</b>				
Age	- 0.53	0.34	0.12	0.01
Body mass index	-	0.16	0.03	0.25
	0.10			
Systolic blood pressure	-	0.23	0.05	0.15
	0.06			
Diastolic blood pressure	- 0.04	0.11	0.01	0.51
LDLc <sup>a</sup>	- 0.04	0.29	0.08	0.04
HDLc <sup>b</sup>	- 0.01	0.03	0.001	0.86
Triglycerides	- 0.02	0.19	0.03	0.20
Hematocrit	0.19	0.12	0.01	0.42
Insulin	- 0.03	0.13	0.02	0.38
IL-1 $\beta$	-	0.10	0.01	0.46
	0.003			
<b>Final model 1</b>				
Constant	14.7	0.42	0.18	0.01
				<
				0.0001
Age	- 0.50			<b>0.05</b>
LDLc <sup>a</sup>	- 0.05			<b>0.04</b>
<b>Preditores de IL-1<math>\beta</math></b>				
<b>Modelo Inicial</b>				
Idade	- 3.4	0.06	0.003	0.25
Índice de Massa Corpórea	0.80	0.03	0.001	0.81
Pressão sanguínea sistólica	0.40	0.03	0.001	0.83
Pressão sanguínea diastólica	3.87	0.26	0.07	0.10
LDLc <sup>a</sup>	- 0.64	0.21	0.04	0.16
HDLc <sup>b</sup>	- 0.40	0.04	0.002	0.77
Triglicéridos	- 0.07	0.03	0.01	0.84
Hematócrito	0.17	0.005	0	0.97
Insulina	- 0.59	0.13	0.02	0.40

<b>Modelo Final 2</b>		0.26	0.07	0.10
Constante	-			
	184.8			
Pressão sanguínea diastólica	3.9			0.10

## ANEXO D

## Cell Metabolism

Chronic metabolic derangements-induced cognitive deficits and neurotoxicity is mediated by REST inactivation  
–Manuscript Draft–

Manuscript Number:	
Full Title:	Chronic metabolic derangements-induced cognitive deficits and neurotoxicity is mediated by REST inactivation
Article Type:	Research Article
Keywords:	chronic metabolic impairment; neurotoxicity; impaired cognition; REST; obese children; $\alpha$ -synuclein
Corresponding Author:	Alexandra Latini Universidade Federal de Santa Catarina Florianópolis, SC BRAZIL
First Author:	Aline Pertile Remos
Order of Authors:	Aline Pertile Remos Rodrigo Augusto da Silva Filipe José de Matos Vivianeq Glaser Roberta de Paula Martins Karina Ghisoni Débora da Luz Scheffer Denise Carleto Andia Daniele Portinho Ana Paula de Souza Paulo Alexandre de Oliveira Rui Daniel Prediger Alicia I Torres Rose Marie Mueller Linhares Roger Waltz Marcelo Fernando Ronsoni Alexandre Hohl Alex Rafacho Aderbal Silva Aguiar Jr Ana Lucia De Paul Alexandra Latini
Abstract:	Chronic peripheral alterations may represent a risk factor for the development of cognitive impairment, dementia or neurodegenerative diseases. Hyperglycemia and obesity are known to imprint epigenetic marks that compromise the proper expression of cell survival genes. Here we showed that chronic metabolic derangements compromised cognition by reducing hippocampal ERK signaling and by inducing neurotoxicity in rats. The mechanisms appear to be linked to reduced active DNA demethylation with diminished expression of the neuroprotective transcription factor REST. The impact of the relationship between adiposity and DNA hypermethylation on REST expression was also demonstrated in peripheral blood mononuclear cells of obese children with reduced levels of blood ascorbate. Thus, the reversible nature of

	epigenetic modifications, and the cognitive impairment reported in obese children, adolescents and adults, suggests that the correction of the anthropometry and the peripheral metabolic alterations would protect brain homeostasis and reduce the risk of the development of neurodegenerative diseases.
Suggested Reviewers:	<p>Rafael Radi, PhD  Universidad de La Republica  rradi@fmed.edu.uy  Expert in the field of toxicity mechanisms linked to oxidative stress</p> <p>Abel Santamaria, PhD  Universidad Autonoma de Mexico  absada@yahoo.com  Expert in the physiopathology of neurodegenerative diseases</p> <p>Gaofeng Wang, PhD  University of Miami  gwang@med.miami.edu  Expert in epigenetics</p> <p>Clifford Woolf, MD, PhD  Harvard University  Clifford.Woolf@childrens.harvard.edu  Expert in the field</p> <p>Arne Schousboe, PhD  University of Copenhagen  arne.schousboe@sund.ku.dk  Expert in neuron-astrocyte interactions</p>
Opposed Reviewers:	