

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia

**Investigação da atuação de mecanismos genéticos, epigenéticos e via das  
adipocitocinas na obesidade.**

Tese de doutorado

Guilherme Coutinho Kullmann Duarte

Porto Alegre, Abril de 2022

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia

**Investigação da atuação de mecanismos genéticos, epigenéticos e via das  
adipocitocinas na obesidade.**

Guilherme Coutinho Kullmann Duarte

Orientadora: Profa. Dra. Daisy Crispim Moreira

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia, da  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)  
como requisito parcial para obtenção do título de Doutor  
em Endocrinologia.

Porto Alegre, Abril de 2022.

### CIP - Catalogação na Publicação

Coutinho Kullmann Duarte, Guilherme  
Investigação da atuação de mecanismos genéticos,  
epigenéticos e via das adipocitocinas na obesidade /  
Guilherme Coutinho Kullmann Duarte. -- 2022.  
104 f.  
Orientadora: Daisy Crispim Moreira.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia,  
Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Obesidade. 2. Dieta de cafeteria. 3. Genes  
diferencialmente expressos regulados por metilação  
(MeGDEs). 4. Genes hub-bottleneck. 5. Modelos animais  
de obesidade induzidos por dieta (DIO). I. Crispim  
Moreira, Daisy, orient. II. Título.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora Dra. Daisy Crispim, pela atenção, pela parceria, profissionalismo, companhia nos congressos científicos, pelo conhecimento, pela dedicação, pelos ensinamentos durante toda a minha trajetória. Obrigado com muito carinho!

Aos colegas do Serviço de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela troca de conhecimento, pelas conversas, brincadeiras, parceria nos congressos, parceria nos almoços e de bons momentos vividos durante o trabalho e durante encontros do grupo.

Aos meus colaboradores e amigos, especialmente, Dra. Joana Lemos, pelo profissionalismo, conversas incentivadoras, ajuda nos momentos indecisos, pela troca de conhecimento; ao Felipe Pellenz, pela parceria dos últimos anos para se aventurar no mundo da bioinformática. Aos alunos de iniciação científica que me ajudaram ao longo do meu projeto de modelo animal, especialmente, Melissa Alves por se dedicar fielmente ao trabalho, por se dedicar aos meus ensinamentos, pelas conversas de jogos, pela parceria em se dedicar a manipulação com os animais, pelas apresentações em feiras de iniciação científica que renderam premiações de destaque. Obrigado com muito carinho e por não desistirem do projeto junto comigo. Significou muito!

A Dra. Tais Assmann colaboradora, cientista e amiga que foi meu braço direito durante a minha trajetória, entre inúmeras conversas, caminhadas, almoços, jantás, festas, parceria em diversos congressos. Obrigado pela amizade, por ter contribuído bastante com essa tese durante os artigos e fora do ambiente de trabalho. Estendo meu agradecimento a Dra. Leticia Brondani, pelos conhecimentos durante o período que fui seu aluno de iniciação científica e pela amizade gerada no laboratório.

Aos professores de uma forma geral do PPG Endocrinologia, assim como secretário Pedro que ajudou em diversos momentos.

Aos meus pais Carlos e Cecília (*in memoriam*) por terem no seu princípio de educação o estudo, pelo amor incondicional, pelas conversas de incentivo, pelos valores passados que me levaram ao crescimento pessoal e de muita força nos momentos difíceis. Obrigado por tudo que fizeram por mim. Ao meu irmão Dr. Felipe Coutinho, que é um exemplo para mim de pessoa, amigo fiel e um grande pai! Aos meus sobrinhos Pietra e Theodore! Dedico a vocês a minha conquista!

A minha namorada/companheira Camila, por estar ao meu lado em todos os momentos, com tanto amor, carinho, companheirismo, pelas palavras de incentivo e força!

Aos meus amigos de uma forma geral.

A CAPES, CNPq, FAPERGS, FIPE-HCPA pelo suporte financeiro e pela força de não desistirem da ciência.

Esta tese de doutorado segue o formato proposto pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia, Metabolismo e Nutrição da Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo apresentada na forma de uma breve introdução sobre o assunto, seguida dos manuscritos originais sobre o tema da tese.

**- Artigo original 1: “Integrated bioinformatics approach reveals methylation-regulated differentially expressed genes in obesity” (submetido na revista Archives of Endocrinology and Metabolism)**

**- Artigo original 2: “Western style-based cafeteria diet induces alterations in metabolic profile and adipocytokines signaling pathways gene expression in C57BL/6 mice”**

## SUMÁRIO

ÍNDICE DE ABREVIATURAS .....	7
1. Introdução.....	7
2. Artigos .....	8
RESUMO .....	10
ABSTRACT .....	12
1. INTRODUÇÃO .....	14
1.1. Obesidade e doenças correlacionadas.....	14
1.2. Aspectos genéticos da obesidade.....	18
1.3. Aspectos epigenéticos da obesidade.....	20
1.4. Modelos animais de obesidade .....	21
2. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS.....	23
2.1 Justificativa .....	23
2.2 Objetivos.....	24
2.2.1 Objetivos gerais.....	24
2.2.2 Objetivos específicos: .....	24
3. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO.....	26
4. CAPÍTULO 1 .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5. CAPÍTULO 2 .....	62
6. CONCLUSÕES.....	103
7. COLABORAÇÃO EM OUTROS TRABALHOS DURANTE O ANDAMENTO DO DOUTORADO.....	104

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

### 1. Introdução

CAF	Dieta de cafeteria
DIO	Obesidade induzidos por dieta
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
FTO	Fat mass and obesity associated
GDEs	Genes diferencialmente expressos
GDMs	Genes diferencialmente metilados
GWAS	Estudos de associação de varredura do genoma
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
IMC	Índice de massa corporal
LEP	Leptina
LEPR	Receptor da leptina
MC4R	Receptor de melanocortina tipo 4
MetS	Síndrome metabólica
OMS	Organização Mundial da Saúde
POMC	Pró-ópio-melanocortina
PC 1/3	Pró-hormônio convertase 1/3
RI	Resistência à insulina
SNP	Polimorfismos de troca única de nucleotídeo
TA	Tecido adiposo
TAM	Tecido adiposo marrom
TAB	Tecido adiposo branco



TNF	Fator de necrose tumoral alpha
Vigitel	Pesquisa de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico

## 2. Artigos

AT	Adipose tissue
Adipo	Adiponectin
<i>Adipoqr1</i>	Adiponectin receptor 1
AUC	Area under the curve
BMI	Body mass index
MeDEGs	Methylation-regulated DEGs
BP	Biological processes
CAFD	Cafeteria diet
CC	Cell components
CEUA	Institutional Ethical Committee on Animal Use
<i>Cpt1a</i>	Carnitine palmitoyltransferase 1a
DIO	Diet-induced obesity
DEGs	Differentially Expressed Genes
DMGs	Differentially Methylated Genes
<i>FBXL20</i>	F-box and leucine rich repeat protein 20
FGF	Fibroblast growth factor
FDR	False Discovery Rate
GEE	Generalized Estimating Equation
GEO	Gene Expression Omnibus
GO	Gene Ontology
GWAS	Genome-wide association studies
HFD	High fat diet
HF	High fat
HS	High sugar
HGNC	HUGO Gene Nomenclature Committee
hASCs	Adipose-derived stem cells

HOMA-IR	Homeostatic model assessment for insulin resistance
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
IR	Insulin resistance
<i>Ins1</i>	Insulin 1
<i>Ins2</i>	Insulin 2
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
Lep	Leptin
<i>Lepr</i>	Leptin receptor
MCODE	Molecular Complex Detection
MF	Molecular function
MetS	Metabolic syndrome
MIF	Migration inhibitory factor
NF-κB	NF-kappa B
<i>OGTT</i>	Oral glucose tolerance test
PPI	Protein-Protein Interaction
<i>PTGS2</i>	Prostaglandin endoperoxide synthases
<i>Ppargc1a</i>	Peroxisome proliferative activated receptor gamma coactivator 1 alpha
<i>Ppara</i>	Peroxisome proliferator activated receptor alpha
<i>Pparγ</i>	Peroxisome proliferator activated receptor gamma
qPCR	Quantitative real-time PCR
STRING	Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes
SAT	Subcutaneous adipose tissue
SD	Standard diet
T2DM	Type 2 diabetes mellitus
<i>TNFAIP3</i>	Tumor necrosis factor a-induced protein 3
<i>Tnf</i>	Tumor necrosis factor
UEA	Animal Experimentation Unit
VAT	Visceral adipose tissue
VLOOKUP	Lookup function
WAT	White adipose tissue

## RESUMO

A obesidade é decorrente do desequilíbrio crônico entre a ingestão de calorias e o gasto energético. Sabe-se que é causada pela combinação de fatores genéticos, ambientais e epigenéticos. A metilação do DNA, uma das principais alterações epigenéticas, regula negativamente a expressão gênica em resposta a fatores ambientais. Por mais que alguns estudos sugiram que genes diferencialmente metilados (GDMs) estão associados ao desenvolvimento da obesidade, os resultados ainda são inconclusivos. Embora a suscetibilidade genética desempenhe um papel fundamental no estabelecimento da obesidade, fatores ambientais, como sedentarismo e padrões de dieta, são atualmente considerados fatores importantes por trás do aumento exponencial de doenças metabólicas relacionadas à obesidade. A exposição à dieta de cafeteria (CAF) em camundongos mimetiza os padrões de consumo alimentar humano e serve como modelo para estudo da obesidade; entretanto, as alterações metabólicas e genéticas nesse modelo são ainda pouco conhecidas.

Sendo assim, realizou-se uma análise integrativa de dados de transcriptômica e metilação do DNA e um estudo experimental com um modelo animal de obesidade induzido com dieta de cafeteria. Os objetivos foram identificar perfis de metilação de DNA e expressão gênica associados à obesidade em pacientes com obesidade e o efeito da dieta CAF em parâmetros antropométricos, alterações metabólicas e de expressão gênica em camundongos C57BL/6.

Na nossa análise *in silico* de dados de expressão gênica e metilação obtidos do banco público GEO, identificamos 54 genes diferencialmente expressos regulados por metilação (MeGDEs) após a sobreposição dos 274 genes diferencialmente expressos (GDEs) e 11,556 GDMs encontrados. Entre eles, 25 genes apresentaram padrão hipermetilado-expressão reduzida e 29 apresentaram padrão hipometilado-expressão aumentada no tecido adiposo subcutâneo de indivíduos com obesidade. A rede de interação entre esses MeGDEs apresentou 3 genes *hub-bottleneck* (*PTGS2*, *TNFAIP3* e *FBXL20*) e um módulo funcional. Além disso, os MeGDEs estão envolvidos na regulação da produção do fator de crescimento de fibroblastos, na função molecular do ácido araquidônico e na atividade da ubiquitina-proteína transferase. Dos 54 MeDGEs, 11 genes foram confirmados como envolvidos na obesidade com os dados coletados do DisGeNET. Os resultados desse estudo sugerem MeGDEs envolvidos na obesidade, bem como identifica as vias em que eles atuam, fornecendo uma compreensão mais profunda dos mecanismos reguladores da obesidade mediados pela metilação.

No estudo experimental, após as 16 semanas de exposição a dieta CAF, o grupo CAF ganhou mais peso e apresentou uma glicemia média maior comparado aos controles. No teste oral de tolerância a glicose (TOTG), o grupo CAF exibiu níveis glicêmicos aumentados comparado ao controle. Níveis de insulina e índice *homeostatic model assessment for insulin resistance* (HOMA-IR) foram mais elevados no grupo CAF vs. controles. As expressões no tecido adiposo branco visceral dos genes *Lep*, *Adipor*, *Cpt-1* e *Tnf* foram maiores no grupo CAF do que nos controles. Interessantemente, as expressões dos genes *Adipo*, *Ins1* e *Pgc-1 $\alpha$*  foram maiores no grupo controle do que no CAF. As expressões de *Ppara*, *Lepr* e *Ins2* não diferiram entre os grupos. Além disso, os níveis séricos de Leptina e Adiponectina foram aumentados no grupo CAF. Portanto, a dieta de cafeteria induz um maior ganho de peso nos camundongos C57BL/6, causando obesidade, bem como alterações na homeostase glicêmica, resistência à insulina e na expressão de genes relacionados à rota das adipocitocinas.

## ABSTRACT

Obesity is caused by a chronic imbalance between calorie intake and energy expenditure. A combination of genetic, environmental and epigenetic factors is known to cause obesity. DNA methylation, one of the main epigenetic alterations, negatively regulates gene expression in response to environmental factors. Even though some studies suggest that differentially methylated genes (DMGs) are associated with the development of obesity, the results are still inconclusive. Although genetic susceptibility plays a key role in the establishment of obesity, environmental factors, such as a sedentary lifestyle and diet patterns are currently considered to be important factors behind the exponential increase in obesity-related metabolic diseases. Exposure to cafeteria diet (CAFD) in mice mimics human food consumption patterns and serves as a model for the study of obesity; however, the metabolic and genetic alterations of this model are still poorly understood.

Therefore, an integrative transcriptomics and DNA methylation data analysis and an experimental study with an animal model of CAFD induced-obesity were performed. The aims were to identify DNA methylation and gene expression profiles associated with obesity in patients with obesity and the effect of CAFD on anthropometric parameters, metabolism and gene expression alterations in C57BL/6 mice.

In our in-silico analysis of gene expression and methylation from data obtained from the GEO public database, we identified 54 Methylation-regulated Differentially Expressed Genes (MeDEGs) after the overlap of 274 Differentially Expressed Genes (DEGs) and 11,556 DMGs found. Among them, 25 genes showed a hypermethylated-reduced expression pattern and 29 showed a hypomethylated-increased expression pattern in the subcutaneous adipose tissue of individuals with obesity. The interaction network between these MeGDEs presented 3 hub-bottleneck genes (*PTGS2*, *TNFAIP3* and *FBXL20*) and a functional module. In addition, the MeGDEs are involved in the regulation of fibroblast growth factor production, the molecular function of arachidonic acid, and ubiquitin-protein transferase activity. Out of 54 MeDEGs, 11 genes were confirmed to be involved in obesity with data collected from DisGeNET. The results of this study suggest MeGDEs involved in obesity, as well as identify in which pathways they act, providing a deeper understanding of obesity regulatory mechanisms mediated by methylation.

In the experimental study, after 16 weeks of exposure to CAFD, the CAFD group gained more weight and had higher mean glycemia compared to controls. In the oral glucose tolerance

test (OGTT), the CAFD group exhibited increased glycemic levels compared to the controls. Insulin levels and HOMA-IR index were higher in the CAFD group vs. controls. Expressions in visceral white adipose tissue of the genes *Lep*, *Adipor*, *Cpt-1* and *Tnf* were higher in the CAF group than in controls. Interestingly, the expressions of *Adipo*, *Ins1* and *Pgc-1 $\alpha$*  genes were higher in the control group than in the CAF. The expressions of *Ppara*, *Lepr* and *Ins2* did not differ between groups. In addition, serum levels of Leptin and Adiponectin were increased in the CAFD group.

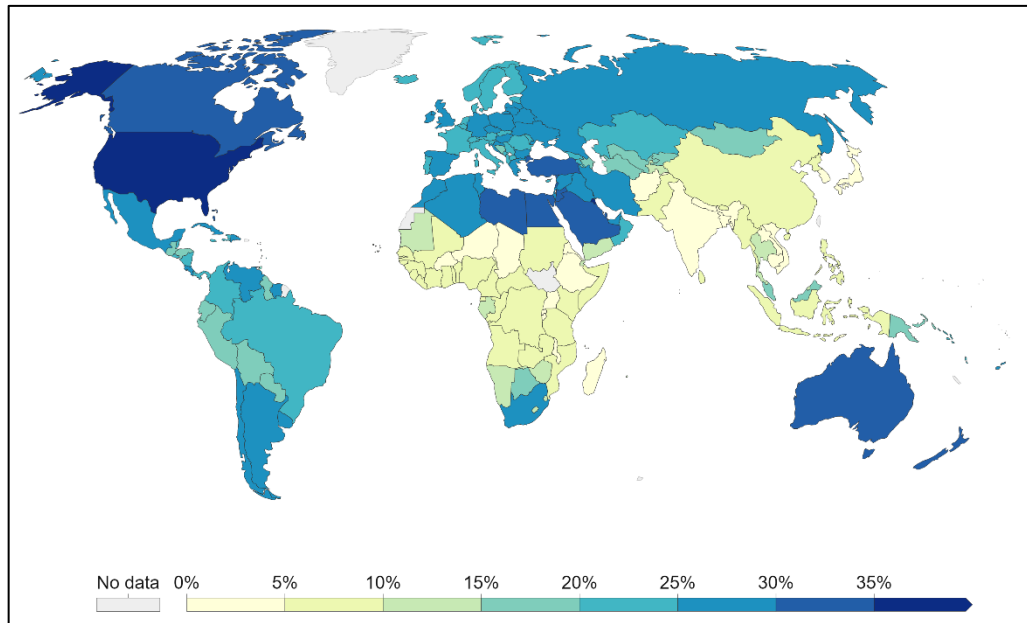
Therefore, the cafeteria diet induces greater weight gain in C57BL/6 mice, causing obesity, as well as alterations in glycemic homeostasis, insulin tolerance/resistance and in the expression of genes related to adipocytokines pathways.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Obesidade e doenças correlacionadas

A obesidade é uma doença crônica multifatorial decorrente do desequilíbrio crônico entre a ingestão de calorias e o gasto energético. A prevalência da obesidade está aumentando nas últimas décadas, tornando-se uma epidemia mundial e um fator risco para outras morbidades relacionadas. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 650 milhões de adultos no mundo têm obesidade (13% da população acima de 18 anos) (WHO, 2020) (**Figura 1**). A OMS define obesidade como um acúmulo excessivo de gordura que pode afetar a saúde. A obesidade é diagnosticada a partir do índice de massa corporal (IMC), obtido pela divisão do peso pela altura ao quadrado:  $\text{kg/m}^2$ . O sobrepeso é diagnosticado quando o índice de massa corporal (IMC) alcança valor igual ou superior a  $25 \text{ kg/m}^2$ , enquanto a obesidade é diagnosticada com valor de IMC igual ou superior a  $30 \text{ kg/m}^2$ . No Brasil, de acordo com os dados do Vigitel 2020 (Pesquisa de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico), a frequência de adultos com excesso de peso (IMC  $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ ) nas 27 capitais foi de 57,5%, sendo maior nos homens (58,9%) do que nas mulheres (56,2%). A frequência de adultos com obesidade (IMC  $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ ) nas 27 capitais foi de 21,5%, sendo semelhante entre mulheres e homens (2).

Além disso, a maior parte da população mundial vive em países onde o sobrepeso e a obesidade estão associados a índices mais altos de mortalidade do que a desnutrição (3). O aumento da prevalência de obesidade está associado com aumento da morbimortalidade e risco aumentado para outras doenças crônicas, como síndrome metabólica (MetS), diabetes mellitus tipo 2 (DM2), doenças cardiovasculares, dislipidemias, hipertensão arterial e alguns tipos de cânceres (1,3–5). Isso torna urgente a realização de estudos que visem compreender melhor a patogênese da obesidade, a fim de que medidas mais eficazes no seu combate sejam desenvolvidas (6).



**Figura 1. Prevalência de indivíduos com obesidade no mundo. Porcentagem de adultos com obesidade no ano de 2016. Dados da Organização Mundial de Saúde, Global health observatory.**

A obesidade é causada pelo acúmulo excessivo de gordura no tecido adiposo (TA). Este tecido responde tanto às mudanças no suprimento de nutrientes quanto à temperatura do ambiente, podendo ser dividido em dois tipos: tecido adiposo branco (TAB) e tecido adiposo marrom (TAM). O TAB é o principal órgão de armazenamento de energia, acumulando gordura em forma de triglicerídeos em células especializadas chamadas de adipócitos (7). O TAM é especializado na oxidação de lipídeos para dissipar energia em forma de calor, um processo chamado de termogênese (3,8,9).

Em humanos, o TAB é localizado em diferentes regiões, o que determina diferenças funcionais importantes, particularmente em relação à função secretora (10,11). Sendo assim, existem dois subtipos de TAB. O TAB subcutâneo é encontrado abaixo da pele, sendo as regiões abdominal e glútea os principais locais de depósito desse tipo de gordura. O acúmulo de lipídeos no TAB subcutâneo, principalmente no depósito glúteo-femoral, está associado com um melhor perfil metabólico comparado a outros depósitos. O TAB visceral é localizado dentro da cavidade abdominal, ao redor dos principais órgãos metabólicos e digestivos, e tem sido associado a uma maior incidência de complicações metabólicas, incluindo resistência à insulina (RI) e DM2, dislipidemia e doença cardiovascular (3,10,12).

A obesidade também é considerada uma doença inflamatória por secreção de citocinas pró-inflamatórias no TA, o que é considerado a principal ligação entre obesidade e suas complicações. Hotamisligil *et al.*, (13) mostrou pela primeira vez que no TA de camundongos obesos há secreção da citocina pró-inflamatória fator de necrose tumoral (TNF). O processo



inflamatório é caracterizado por ser uma adaptação contra uma infecção; entretanto, na obesidade temos um processo chamado de inflamação metabólica, que consiste na inflamação crônica que desencadeia mudanças na função metabólica e homeostase do organismo e, conseqüentemente, causa a exacerbação da doença.

O TA produz diferentes substâncias bioativas, sendo uma delas os mediadores inflamatórios conhecidos como adipocinas (exclusivo do TA) ou adipocitocinas (não exclusivo dos adipócitos) (14–16). Na obesidade, citocinas pró-inflamatórias estão elevadas, promovendo uma resposta persistente de inflamação de baixo grau (17). Leptina e adiponectina são duas das principais adipocitocinas envolvidas nessa via em resposta ao metabolismo energético (**Figura 2**). Leptina atua como um hormônio que suprime o apetite e a resposta da fome através do controle do hipotálamo; enquanto isso, aumenta o gasto energético e tem efeito potencializador sobre o eixo tireoidiano e a atividade simpática (18). Importante destacar que a diminuição da leptina devido a mutação no seu gene ou do seu receptor, pode levar a obesidade. Além disso, também foi observado que alguns pacientes com obesidade podem apresentar resistência à ação da leptina (hiperleptinemia) ou deficiência relativa de leptina (19–21). A adiponectina age em tecidos altamente ativos metabolicamente e a sua resposta nesses tecidos aumenta a sensibilidade à insulina, aumentando a oxidação de ácidos graxos e a disponibilidade de glicose. Camundongos com deficiência de adiponectina são resistentes à insulina (16,22). Em contrapartida, altos níveis de adiponectina sérica estão associados a redução no risco de DM2 (23,24).

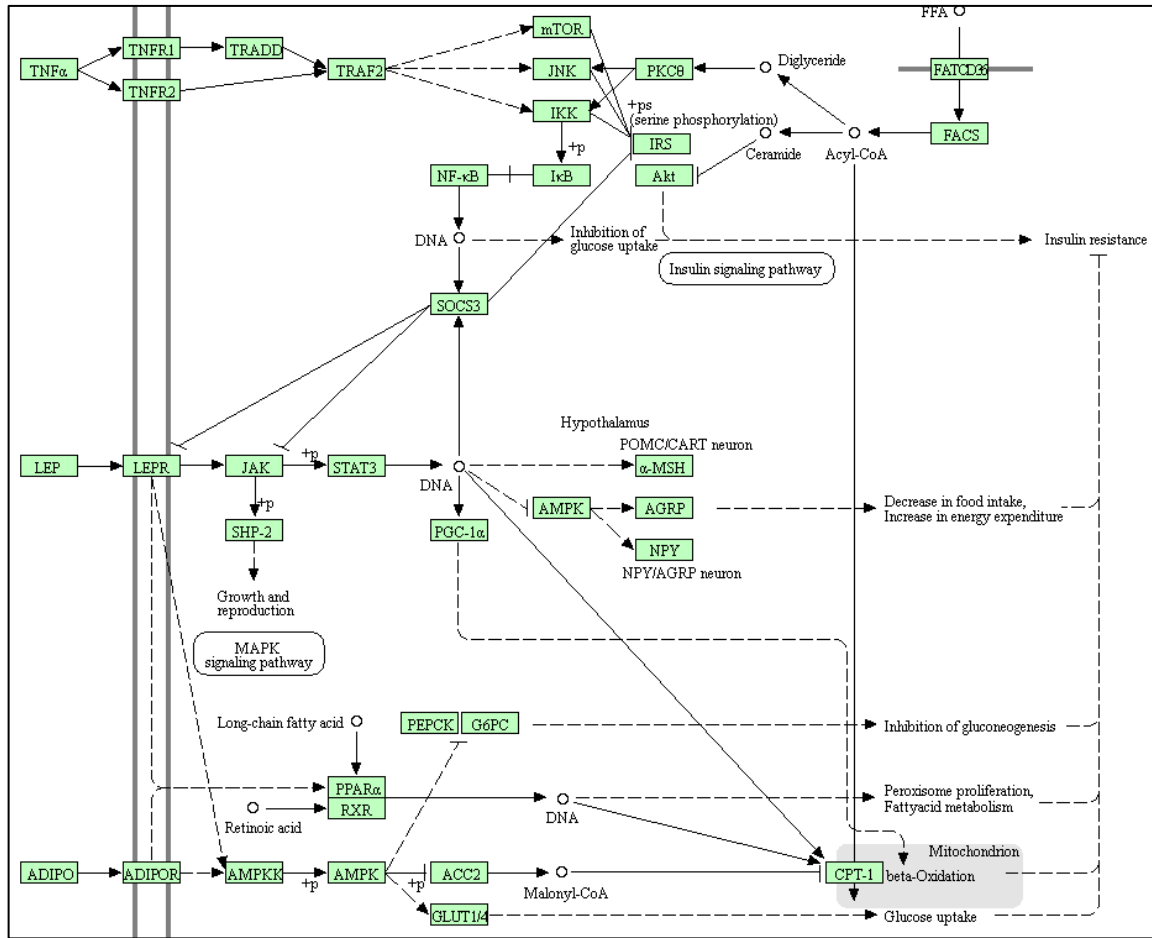
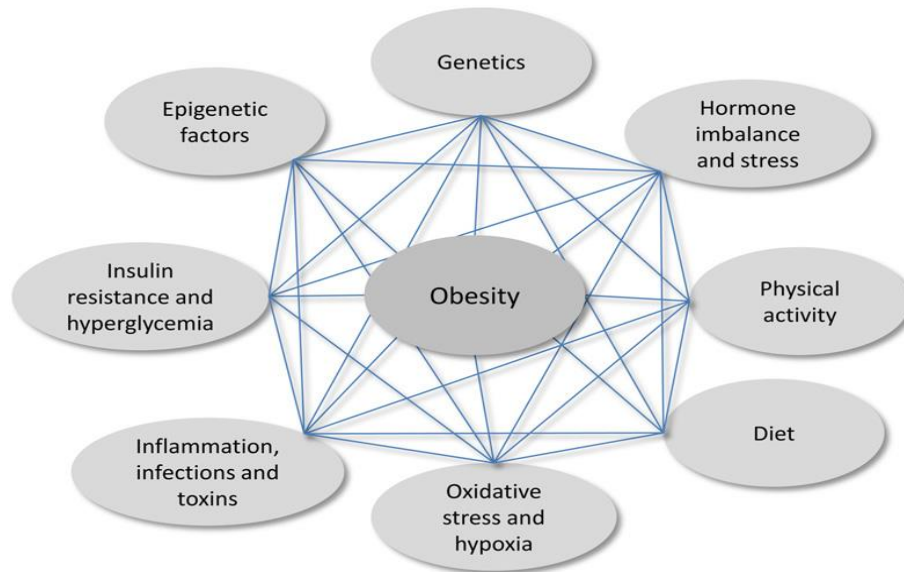


Figura 2. Rota de sinalização das adipocitocinas (25).

A obesidade também está associada à hipertensão arterial sistêmica (HAS). Um dos efeitos da HAS são as mudanças na função e estrutura renais que levam à ativação do sistema renina-angiotensina e retenção de sódio, o que é considerado um fator de risco para doenças cardiovasculares (26). Em suma, esse perfil inflamatório é considerado a principal característica da obesidade, DM2, MetS e dislipidemias.

Adicionalmente, sabe-se que a obesidade é decorrente da complexa interação entre meio ambiente, suscetibilidade genética e fatores epigenéticos (27–29) (Figura 3). O aumento na sua prevalência pode ser atribuído a diversas mudanças sociais e ambientais, as quais incluem hábitos alimentares inadequados, sedentarismo, fatores emocionais, urbanização e acesso socioeconômico a uma dieta saudável(30). Além disso, estudos em gêmeos monozigóticos demonstraram que 50-70% dos valores de IMC podem ser explicados por fatores genéticos (31).



**Figura 3.** Principais fatores associados ao desenvolvimento da obesidade (12).

## 1.2. Aspectos genéticos da obesidade

As principais características genéticas de interesse da obesidade consistem nas mutações em diversos genes chaves que controlam o apetite e metabolismo. Ainda, a obesidade pode ser explicada de duas formas: sindrômica (por exemplo: Síndrome de Prader Willi, provocada por alterações no cromossomo 15) (32) e não sindrômica (por exemplo: obesidade monogênica e poligênica) (**Figura 4**). (33).

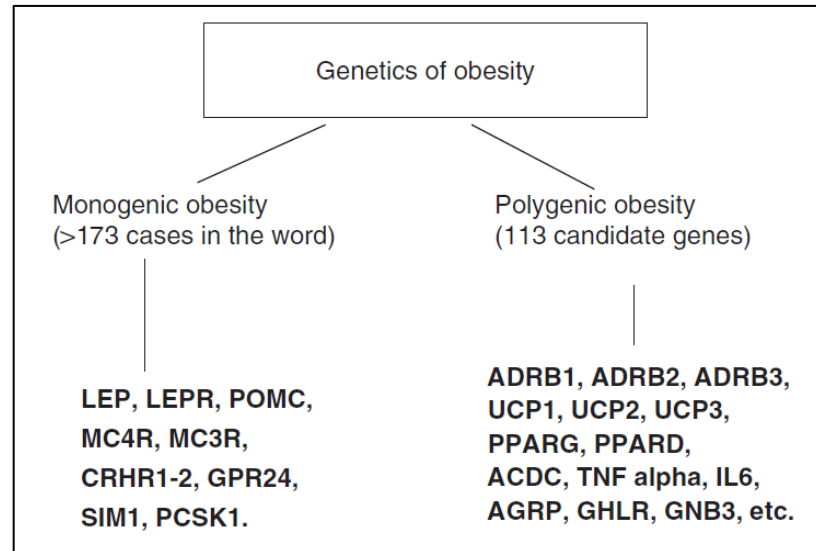
A influência monogênica é caracterizada por mutações em um único gene, cuja expressão não é afetada ou é pouco afetada pelo meio. Os casos deste tipo de obesidade são considerados raros e os genes estão envolvidos na regulação do peso corporal, consumo de energia, gasto energético e adipogênese (33). Dentre os genes afetados estão os pertencentes ao sistema leptina-melanocortina hipotalâmico, genes da leptina (*LEP*) e seu receptor (*LEPR*), da pró-ópio-melanocortina (*POMC*), da pró-hormônio convertase 1/3 (*PC 1/3*) e do receptor de melanocortina tipo 4 (*MC4R*) (**Figura 4**).

A maioria dos indivíduos com obesidade apresentam a obesidade poligênica ou multifatorial. A susceptibilidade para obesidade poligênica difere de indivíduo para indivíduo e é influenciada por um somatório de variantes genéticas e ambientais. Durante a última década, estudos de associação de varredura do genoma (GWAS) surgiram como uma poderosa ferramenta para buscar identificar *loci* associados com doenças poligênicas complexas, como a obesidade (34). Uma grande metanálise de estudos GWAS em indivíduos com diferentes graus de IMC identificou 750 polimorfismos de troca única de nucleotídeo (SNP) associados com

IMC em aproximadamente 700 mil indivíduos de populações europeias. Porém, estes SNPs explicaram 6% da variância genética do IMC (35).

Adicionalmente, o *FTO* foi o primeiro gene identificado como estando associado com obesidade (36,37) e, até o momento, possui a maior contribuição genética para a obesidade nas populações europeias (34). Entretanto, é importante pontuar que as variantes do gene *FTO* associadas com obesidade e IMC também foram associadas com estas características em estudos de GWAS em populações asiáticas, hispânicas e nativas americanas (38–43). Em suma, estudar populações de diferentes ascendências é benéfico para a identificação de genes (e suas vias correspondentes) com potencial para serem alvos na prevenção, diagnóstico e terapêutica da obesidade. No entanto, a função biológica dessas variantes genéticas não é bem compreendida.

Estudos de transcriptômica que visam a avaliação global da expressão gênica em pacientes com obesidade surgem como alternativa para obter mais dados sobre a função biológica dos genes que influenciam a obesidade (44). Estudos recentes demonstraram que perfis de transcriptoma [genes diferencialmente expressos (GDEs)] de sangue total oferecem dados válidos associados com peso corporal, uma vez que fornecem dados sobre genômica funcional da obesidade (45–47). Além disso, Hao *et al.*, (48) analisou dados de transcriptômica de 549 indivíduos com obesidade, em 20 tecidos diferentes, obtidos do banco de dados *GTEX project*. Eles identificaram GDEs relacionados ao IMC nesses 20 tecidos e mostraram que 6 destes tecidos (tecido adiposo, esôfago, pâncreas, pituitária, nervoso e pele) estavam fortemente associados com obesidade. Além disso, 185 genes foram identificados com 42 vias relacionadas a obesidade a partir de análise de enriquecimento funcional, mostrando que estudos utilizando banco dados de tecidos animais ou humanos se tornam relevantes na busca de genes relacionados a obesidade e suas comorbidades. Portanto, futuros estudos que integrem dados de genética e epigenética podem ser uma melhor abordagem para prever risco no ganho de peso e obesidade.



*Figura 4. Características genéticas da obesidade (33).*

### 1.3. Aspectos epigenéticos da obesidade

As alterações epigenéticas correspondem a uma série de modificações moleculares no DNA e na cromatina que não modificam a sequência de bases do DNA (49,50). Essas alterações na estrutura do DNA são extremamente dinâmicas, sendo coordenadas por mecanismos complexos que fazem uma interface entre a genética e os fatores ambientais. Além disso, essas modificações na estrutura do DNA são constantemente ativadas e desativadas à medida que um indivíduo entra em contato com diferentes agentes ambientais durante a vida (51). Assim, indivíduos podem sofrer alterações epigenéticas em diferentes períodos do desenvolvimento, o que regulará diversos mecanismos associados da expressão gênica, que, quando desregulados, podem levar ao desenvolvimento de diversas patologias.

A metilação de DNA é uma modificação química na qual normalmente ocorre a adição de um grupamento metil (CH<sub>3</sub>) no carbono 5 de citosinas pertencentes ao dinucleotídeo CpG (52). Existem regiões no DNA que são ricas em dinucleotídeos CpG, chamadas de ilhas CpG, as quais são definidas por uma densidade maior que 70% em uma região de 300 a 3000 pb (30). A maioria das regiões promotoras dos genes possuem ilhas CpG (50). Assim, as citosinas dos dinucleotídeos CpGs das regiões reguladoras, quando metiladas, regulam negativamente a expressão gênica, uma vez que a metilação impede que os fatores de transcrição se liguem aos seus sítios de ligação ou que reguladores específicos se liguem de maneira específica ao DNA metilado. Dessa forma, as ilhas CpG estão associadas com o controle da expressão gênica, exibindo padrões de metilação tecido-específico (50).

Como já mencionado, a obesidade é uma doença complexa resultante da interação entre fatores ambientais, genéticos e epigenéticos (53–55). Dessa forma, a combinação dos genótipos e epigenótipos poderá ajudar a revelar associações entre a dieta e a suscetibilidade à obesidade e outras comorbidades relacionadas (27,55). Em suma, nos últimos anos, muitos genes envolvidos na regulação das principais vias metabólicas da obesidade e do DM2 foram descritos como sendo afetados pela regulação epigenética (55). Inclusive, análises *in silico* como análise de bioinformática integrativa de *arrays*, utilizando biologia de sistemas a partir de bancos de dados públicos surgiram como uma abordagem promissora para identificar e classificar GDEs e genes diferencialmente metilados (GDMs) (56–58). Logo, uma análise integrativa usando conjuntos de dados de expressão gênica e metilação de DNA de pacientes com obesidade, documentados em estudos anteriores, também poderá facilitar a identificação de novas e potenciais vias patológicas moleculares relacionadas a esta doença.

#### 1.4. Modelos animais de obesidade

Embora a origem genética desempenhe um papel fundamental no estabelecimento da obesidade, características do estilo de vida, como inatividade física e padrões alimentares, são atualmente considerados fatores importantes por trás do aumento exponencial de doenças metabólicas relacionadas à obesidade (59–61). Nesse sentido, modelos animais de obesidade induzidos por dieta (DIO) têm ganhado cada vez mais relevância, pois mimetizam o processo de desenvolvimento da obesidade em humanos com maior acurácia, comparado a modelos apenas genéticos. Nas últimas duas décadas, pesquisas com roedores, especialmente camundongos, despontaram em estudos sobre a obesidade e DM2 (60,62). Por exemplo, estudos com roedores levaram a descoberta das ações centrais do balanço energético de leptina e grelina (63,64). Sua popularidade alcançou aproximadamente 60% dos estudos em animais conduzidos na espécie *Mus musculus*, já que a fisiologia desses roedores é mais próxima dos humanos quando comparado a não mamíferos (62). Seu pequeno tamanho, alta fecundidade e ciclo de vida curto, juntamente com a relativa facilidade de editar seu genoma também explicam sua popularidade, principalmente, comparados ao uso de animais de grande porte (62).

Nos últimos anos, Dietas com Muita-Gordura e/ou Muito-Açúcar (DMG e/ou DMA) tornaram-se as dietas preferidas para induzir a obesidade e suas comorbidades, como MetS e RI (62). Todavia, sua principal desvantagem é de que os humanos não consomem consistentemente a mesma comida ultraprocessada com altos teores de açúcar e gordura como encontrados nessas dietas em formato de *pellets* usadas em modelos animais (65).

Adicionalmente, as dietas DMG/DMA geralmente contêm níveis mais altos de gordura do que os humanos normalmente consomem (>45% de energia/calorias -% kcal- de gordura em modelos animais *versus* ~30/35% em humanos) (66,67). Em uma recente revisão, Leigh *et al.*, (68) demonstraram que alimentos palatáveis podem aumentar o consumo da dieta, pois são ofertados em formato *in natura* e estimulam a região sensorial do cérebro que está envolvido na regulação do consumo alimentar. Essa hipótese foi levantada uma vez que DMG/DMA quando ofertadas por muito tempo levaram a uma diminuição no consumo (hipofagia) em ratos (65). Assim, outros tipos de dietas surgiram para simular o padrão alimentar do ser humano atualmente envolvido na epidemia de obesidade.

A dieta de cafeteria (CAF) foi usada pela primeira vez na década de 1970 em estudos com obesidade, mas tornou-se popular na última década (65,69). Nesse tipo de dieta são ofertados alimentos ultraprocessados não saudáveis, mas palatáveis, como bacon, cookies e salsicha em formato *in natura*. Esses alimentos são encontrados com facilidade em mercados, por isso são chamados de “*junk foods*”, “*supermarket diet*” e, por se aproximarem mais de uma dieta de consumo ocidental, são chamados também de “*western diet*”. É importante destacar que esse tipo de dieta se caracteriza por emitir sinais sensoriais como cheiro e sabor que promovem o alto consumo em roedores (65).

Estudos com dieta CAF mostraram que esta dieta induz não só o aumento do peso corporal, mas também obesidade, MetS, sintomas diabéticos graves, inflamação do fígado e outras desregulações metabólicas (70). De fato, outros estudos observaram que o desenvolvimento desses desfechos metabólicos é mais eficientemente induzido por dieta CAF comparado a DMG/DMA (71,72). Em suma, modelos animais com dieta CAF são considerados bons modelos obesogênicos (65) e podem também ser usados para buscar o entendimento de adaptação molecular identificando genes que são sensíveis a desregulação por esse tipo de dieta (73).

Como mencionado anteriormente, as vias de ação das adipocitocinas são bastante relevantes para obesidade, uma vez que muitos estudos observaram que a regulação dessa via prejudica a comunicação órgão-órgão, contribuindo para distúrbios metabólicos na obesidade (74); entretanto, os resultados são inconclusivos em resposta ao efeito da dieta CAF sobre os genes relacionados a essa via e precisam ser mais bem compreendidos.

## 2. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

### 2.1 Justificativa

Recentemente, alguns estudos têm sugerido que fatores epigenéticos também têm um papel importante no desenvolvimento da obesidade, uma vez que regulam a expressão gênica em resposta a diferentes estímulos ambientais, sem modificar a sequência de bases do DNA. A metilação do DNA é uma das principais alterações epigenéticas, regulando negativamente a expressão gênica em resposta a fatores ambientais. Alguns estudos relataram níveis de metilação alterados nas regiões regulatórias de alguns genes em indivíduos com obesidade ou em modelos murinos; entretanto, os resultados são ainda inconclusivos. Estudos como análise integrativa por bioinformática também surgiram como uma abordagem de análise a partir de banco de dados públicos de expressão gênica e metilação do DNA; entretanto, poucos estudos foram realizados em pacientes com obesidade. Dessa forma, a realização desses estudos no contexto da obesidade poderá contribuir para uma melhor compreensão da patogênese dessa doença. Além disso, estes estudos também podem levar à descoberta de biomarcadores epigenéticos para identificação de indivíduos em risco para obesidade ou que respondem melhor a uma determinada dieta, bem como o desenvolvimento de estratégias terapêuticas baseadas em agentes nutricionais ou farmacológicos que possam modificar a metilação de genes relacionados à obesidade.

Além dos fatores genéticos e epigenéticos, fatores ambientais também contribuem de forma importante para a obesidade. Diversas mudanças sociais e ambientais influenciam no risco para obesidade, todavia o principal componente na epidemia da obesidade é a mudança no padrão da dieta. Especialmente, o aumento do consumo de alimentos palatáveis ricos em açúcar, alimentos industrializados e os chamados “*junk foods*” mais característicos da alimentação dos países ocidentais. Estudos mostraram que a dieta CAF mimetiza os padrões de consumo moderno de alimentação e é conhecida por induzir obesidade, inflamação, MetS e DM2 em modelos animais. Além disso, é considerado um modelo robusto para estudar os efeitos da obesidade em modelos animais quando comparados a outros tipos de dietas obesogênicas. No entanto, poucos estudos estudaram os efeitos da CAF em mecanismos relacionados à obesidade e características metabólicas associadas. Estes estudos empregaram diferentes conteúdos nutricionais para a dieta CAF, sendo um desafio padronizar os componentes desta dieta. Sendo assim, novos estudos de modelos animais de obesidade e RI induzida por uma dieta obesogênica



(neste caso a CAF) contribuirão para uma melhor compreensão de seus mecanismos patogênicos.

## 2.2 Objetivos

### 2.2.1 Objetivos gerais

- Identificar perfis globais alterados de metilação de DNA e expressão gênica associados à obesidade através de uma abordagem de bioinformática integrativa de dados públicos de pacientes com e sem obesidade.
- Avaliar o efeito da exposição à dieta CAF em parâmetros antropométricos, glicêmicos e de RI em camundongos C57BL/6, bem como o efeito desta dieta na expressão de genes da rota da adipocitocinas no TAB visceral destes animais.

### 2.2.2 Objetivos específicos:

- 1) Identificar genes diferencialmente expressos (GDEs) e diferencialmente metilados (GDMs) no TAB subcutâneo de indivíduos com e sem obesidade a partir de análise de bioinformática de dados obtidos no banco de públicos GEO.
- 2) Selecionar os genes presente em ambos os conjuntos, GDEs e GDMs, para identificar aqueles GDEs regulados por metilação (MeGDEs).
- 3) Realizar uma rede de interação proteína-proteína (IPP), identificar genes *hub-bottleneck* e realizar análises de enriquecimento funcional com base em termos de *Gene Ontology* e *KEGG Pathways*.
- 4) Investigar o efeito da exposição de camundongos C57BL/6 à dieta de CAF (hipercalórica) sobre parâmetros antropométricos, glicêmicos, RI e esteatose hepática.
- 5) Avaliar o efeito da exposição de camundongos C57BL/6 à dieta CAF sobre a expressão de genes relacionados à via de sinalização das adipocitocinas no TAB visceral em comparação a camundongos expostos à dieta controle.
- 6) Avaliar a correlação entre o perfil de expressão gênica na via de sinalização das adipocitocinas no TAB visceral com características clínicas relacionadas a obesidade.

Os resultados dos objetivos específicos 1 a 3 são apresentados no **capítulo 1** dessa tese (*“Integrated bioinformatics approach reveals methylation-regulated differentially expressed genes in obesity”*– submetido para publicação na revista *Archives of endocrinology and metabolism*).

Os resultados dos objetivos específicos 4 a 6 são apresentados no capítulo **2** dessa tese (*“Western style-based cafeteria diet induces alterations in metabolic profile and adipocytokines signaling pathways gene expression in C57BL/6 mice”*).

### 3 REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

1. WHO. Obesity and overweight [Internet]. 2020. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
2. Health M of. Vigitel Brazil 2020: surveillance of risk and protective factors for chronic diseases by telephone survey: estimates of frequency and sociodemographic distribution of risk and protective factors for chronic diseases in the capitals of the 26 Brazilian states [Internet]. 2020th ed. 2021. Available from: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/publicacoes-svs/vigitel/relatorio-vigitel-2020-original.pdf>
3. Lorente-Cebrián S, González-Muniesa P, Milagro FI, Alfredo Martínez J. MicroRNAs and other non-coding RNAs in adipose tissue and obesity: Emerging roles as biomarkers and therapeutic targets. *Clinical Science*. 2019.
4. Ye J. Mechanisms of insulin resistance in obesity. *Frontiers of Medicine in China*. 2013.
5. Calle EE, Kaaks R. Overweight, obesity and cancer: Epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nature Reviews Cancer*. 2004.
6. Maria Aiello A, Marques de Mello L, Souza Nunes M, Soares da Silva A, Nunes A. Prevalence of Obesity in Children and Adolescents in Brazil: A Meta-analysis of Cross-sectional Studies. *Current Pediatric Reviews*. 2015;
7. Bartelt A, Heeren J. Adipose tissue browning and metabolic health. *Nature Reviews Endocrinology*. 2014.
8. van Dijk SJ, Molloy PL, Varinli H, Morrison JL, Muhlhausler BS, Buckley M, et al. Epigenetics and human obesity. *International Journal of Obesity*. 2015.
9. Martínez JA, Cordero P, Campión J, Milagro FI. Opening Lecture: Interplay of early-life nutritional programming on obesity, inflammation and epigenetic outcomes. In: *Proceedings of the Nutrition Society*. 2012.
10. Lee MJ, Wu Y, Fried SK. Adipose tissue heterogeneity: Implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. *Molecular Aspects of Medicine*. 2013.
11. Arner E, Westermark PO, Spalding KL, Britton T, Rydén M, Frisén J, et al. Adipocyte turnover: Relevance to human adipose tissue morphology. *Diabetes*. 2010;

12. Cohena P, Spiegelmanb BM. Cell biology of fat storage. *Molecular Biology of the Cell*. 2016.
13. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. Vol. 444, *Nature*. 2006.
14. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation*. 2003;112(12).
15. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*. 2003;112(12).
16. Maximus PS, al Achkar Z, Hamid PF, Hasnain SS, Peralta CA. Adipocytokines: Are they the Theory of Everything? Vol. 133, *Cytokine*. 2020.
17. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. Vol. 11, *Nature Reviews Immunology*. 2011.
18. Flier JS. Starvation in the midst of plenty: Reflections on the history and biology of insulin and leptin. Vol. 40, *Endocrine Reviews*. 2018.
19. Knight ZA, Hannan KS, Greenberg ML, Friedman JM. Hyperleptinemia is required for the development of leptin resistance. *PLoS ONE*. 2010;5(6).
20. Scarpace PJ, Zhang Y. Leptin resistance: A predisposing factor for diet-induced obesity. Vol. 296, *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*. 2009.
21. Zhang Y, Chua S. Leptin function and regulation. *Compr Physiol*. 2018;8(1).
22. Tateya S, Kim F, Tamori Y. Recent advances in obesity-induced inflammation and insulin resistance. Vol. 4, *Frontiers in Endocrinology*. 2013.
23. Li S, Shin HJ, Ding EL, van Dam RM. Adiponectin levels and risk of type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. Vol. 302, *JAMA - Journal of the American Medical Association*. 2009.
24. Keane KN, Cruzat VF, Carlessi R, de Bittencourt PIH, Newsholme P. Molecular Events Linking Oxidative Stress and Inflammation to Insulin Resistance and  $\beta$ -Cell Dysfunction. Vol. 2015, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2015.

25. Kanehisa M, Sato Y. KEGG Mapper for inferring cellular functions from protein sequences. *Protein Science*. 2020;29(1).
26. Singh RK, Kumar P, Mahalingam K. Molecular genetics of human obesity: A comprehensive review. Vol. 340, *Comptes Rendus - Biologies*. 2017.
27. F.I. M, M.L. M, C. DM, J.A. M. Dietary factors, epigenetic modifications and obesity outcomes: Progresses and perspectives. *Molecular Aspects of Medicine*. 2013;
28. Hinney A, Vogel CIG, Hebebrand J. From monogenic to polygenic obesity: Recent advances. *European Child and Adolescent Psychiatry*. 2010.
29. Feinberg AP, Irizarry R a. Evolution in health and medicine Sackler colloquium: Stochastic epigenetic variation as a driving force of development, evolutionary adaptation, and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;
30. Marie. P, Fereshteh.T. Y, Yuvreet. K, David. M. Recent progress in genetics, epigenetics and metagenomics unveils the pathophysiology of human obesity. *Clinical Science*. 2016;
31. Allison DB, Kaprio J, Korkeila M, Koskenvuo M, Neale MC, Hayakawa K. The heritability of body mass index among an international sample of monozygotic twins reared apart. *International Journal of Obesity*. 1996;
32. Sadaf Farooqi I. Genetic and hereditary aspects of childhood obesity. Vol. 19, *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2005.
33. Martínez-Hernández A, Enríquez L, Moreno-Moreno MJ, Martí A. Genetics of obesity. *Public Health Nutrition* [Internet]. 2007 Oct [cited 2022 Mar 20];10(10A):1138–44. Available from: <https://www.cambridge.org/core/journals/public-health-nutrition/article/genetics-of-obesity/C42E38F9DBC314F9EC9B7564FC65EB23>
34. Sun C, Kovacs P, Guiu-Jurado E. Genetics of Obesity in East Asians. Vol. 11, *Frontiers in Genetics*. 2020.
35. Yengo L, Sidorenko J, Kemper KE, Zheng Z, Wood AR, Weedon MN, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies for height and body mass index in ~700 000 individuals of European ancestry. *Human Molecular Genetics*. 2018;27(20).

36. Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, et al. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* (1979). 2007;316(5826).
37. Loos RJF, Yeo GSH. The bigger picture of FTO - The first GWAS-identified obesity gene. Vol. 10, *Nature Reviews Endocrinology*. 2014.
38. Hotta K, Nakata Y, Matsuo T, Kamohara S, Kotani K, Komatsu R, et al. Variations in the FTO gene are associated with severe obesity in the Japanese. *Journal of Human Genetics*. 2008;53(6).
39. Cho YS, Go MJ, Kim YJ, Heo JY, Oh JH, Ban HJ, et al. A large-scale genome-wide association study of Asian populations uncovers genetic factors influencing eight quantitative traits. *Nature Genetics*. 2009;41(5).
40. Rong R, Hanson RL, Ortiz D, Wiedrich C, Kobes S, Knowler WC, et al. Association analysis of variation in/near FTO, CDKAL1, SLC30A8, HHEX, EXT2, IGF2BP2, LOC387761, and CDKN2B with type 2 diabetes and related quantitative traits in pima indians. *Diabetes*. 2009;58(2).
41. Dong C, Beecham A, Slifer S, Wang L, McClendon MS, Blanton SH, et al. Genome-wide linkage and peak-wide association study of obesity-related quantitative traits in Caribbean Hispanics. *Human Genetics*. 2011;129(2).
42. Villalobos-Comparán M, Teresa Flores-Dorantes M, Teresa Villarreal-Molina M, Rodríguez-Cruz M, García-Ulloa AC, Robles L, et al. The FTO gene is associated with adulthood obesity in the Mexican population. *Obesity*. 2008;16(10).
43. Monda KL, Chen GK, Taylor KC, Palmer C, Edwards TL, Lange LA, et al. A meta-analysis identifies new loci associated with body mass index in individuals of African ancestry. *Nature Genetics*. 2013;45(6).
44. Permana PA, del Parigi A, Tataranni PA. Microarray gene expression profiling in obesity and insulin resistance. *Nutrition*. 2004;20(1).
45. Wang W, Jiang W, Hou L, Duan H, Wu Y, Xu C, et al. Weighted gene co-expression network analysis of expression data of monozygotic twins identifies specific modules and hub genes related to BMI. *BMC Genomics*. 2017;18(1).

46. Berisha SZ, Serre D, Schauer P, Kashyap SR, Smith JD. Changes in whole blood gene expression in obese subjects with type 2 diabetes following bariatric surgery: A pilot study. *PLoS ONE*. 2011;6(3).
47. Croteau-Chonka DC, Chen Z, Barnes KC, Barraza-Villarreal A, Celedón JC, Gauderman WJ, et al. Gene Coexpression Networks in Whole Blood Implicate Multiple Interrelated Molecular Pathways in Obesity in People with Asthma. *Obesity*. 2018;26(12).
48. Hao RH, Yang TL, Rong Y, Yao S, Dong SS, Chen H, et al. Gene expression profiles indicate tissue-specific obesity regulation changes and strong obesity relevant tissues. *International Journal of Obesity*. 2018;42(3).
49. Richards EJ. Inherited epigenetic variation - Revisiting soft inheritance. Vol. 7, *Nature Reviews Genetics*. 2006.
50. Jones PA. Functions of DNA methylation: Islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Reviews Genetics*. 2012.
51. Skinner MK. Environmental epigenomics and disease susceptibility. In: *EMBO Reports*. 2011.
52. Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. Vol. 38, *Neuropsychopharmacology*. 2013.
53. Samblas M, Milagro FI, Martínez A. DNA methylation markers in obesity, metabolic syndrome, and weight loss. Vol. 14, *Epigenetics*. 2019.
54. González-Muniesa P, Martínez-González MA, Hu FB, Després JP, Matsuzawa Y, Loos RJJ, et al. Obesity. *Nature Reviews Disease Primers*. 2017;3.
55. Ling C, Rönn T. Epigenetics in Human Obesity and Type 2 Diabetes. Vol. 29, *Cell Metabolism*. 2019.
56. Liu Y, Jin J, Chen Y, Chen C, Chen Z, Xu L. Integrative analyses of biomarkers and pathways for adipose tissue after bariatric surgery. *Adipocyte*. 2020;
57. Li H, Liu J wei, Liu S, Yuan Y, Sun L ping. Bioinformatics-Based Identification of Methylated-Differentially Expressed Genes and Related Pathways in Gastric Cancer. *Digestive Diseases and Sciences*. 2017;

58. Lin Y, Li J, Wu D, Wang F, Fang Z, Shen G. Identification of hub genes in type 2 diabetes mellitus using bioinformatics analysis. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*. 2020;
59. Beigrezaei S, Ghiasvand R, Feizi A, Iraj B. Relationship between dietary patterns and incidence of type 2 diabetes. *International Journal of Preventive Medicine*. 2019;10(1).
60. Preguiça I, Alves A, Nunes S, Fernandes R, Gomes P, Viana SD, et al. Diet-induced rodent models of obesity-related metabolic disorders—A guide to a translational perspective. Vol. 21, *Obesity Reviews*. 2020.
61. Rice Bradley BH. Dietary Fat and Risk for Type 2 Diabetes: a Review of Recent Research. Vol. 7, *Current Nutrition Reports*. 2018.
62. Kleinert M, Clemmensen C, Hofmann SM, Moore MC, Renner S, Woods SC, et al. Animal models of obesity and diabetes mellitus. Vol. 14, *Nature Reviews Endocrinology*. 2018.
63. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 1999;402(6762).
64. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994;372(6505).
65. Lanza JF, Snoeren EMS. The cafeteria diet: A standardized protocol and its effects on behavior. Vol. 122, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2021.
66. Bergström M, Hakansson A, Blücher A, Andersson HS. From carbohydrates to fat: Trends in food intake among Swedish nutrition students from 2002 to 2017. *PLoS ONE*. 2020;15(1).
67. Bennett E, Peters SAE, Woodward M. Sex differences in macronutrient intake and adherence to dietary recommendations: Findings from the UK Biobank. *BMJ Open*. 2018;8(4).
68. Leigh SJ, Lee F, Morris MJ. Hyperpalatability and the Generation of Obesity: Roles of Environment, Stress Exposure and Individual Difference. Vol. 7, *Current obesity reports*. 2018.



69. Sclafani A, Springer D. Dietary obesity in adult rats: Similarities to hypothalamic and human obesity syndromes. *Physiology and Behavior*. 1976;17(3).
70. Sampey BP, Vanhoose AM, Winfield HM, Freerman AJ, Muehlbauer MJ, Fueger PT, et al. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: Comparison to high-fat diet. *Obesity*. 2011;19(6).
71. Buyukdere Y, Gulec A, Akyol A. Cafeteria diet increased adiposity in comparison to high fat diet in young male rats. *PeerJ*. 2019;2019(4).
72. Gual-Grau A, Guirro M, Mayneris-Perxachs J, Arola L, Boqué N. Impact of different hypercaloric diets on obesity features in rats: a metagenomics and metabolomics integrative approach. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2019;71.
73. Watson PM, Commins SP, Beiler RJ, Hatcher HC, Gettys TW. Differential regulation of leptin expression and function in A/J vs. C57BL/6J mice during diet-induced obesity. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*. 2000;279(2 42-2).
74. Unamuno X, Gómez-Ambrosi J, Rodríguez A, Becerril S, Frühbeck G, Catalán V. Adipokine dysregulation and adipose tissue inflammation in human obesity. Vol. 48, *European Journal of Clinical Investigation*. 2018.



## 6. CONCLUSÕES

Através de dados de expressão gênica e metilação obtidos do banco público GEO, foi realizada uma sobreposição de GDEs e GDMs por análise *in silico*. Esta análise possibilitou identificar 54 MeGDEs, sendo que 25 genes apresentaram padrão hipermetilado-expressão reduzida e 29 apresentaram padrão hipometilado-expressão aumentada no TAB subcutâneo de indivíduos com obesidade.

Na nossa análise de enriquecimento funcional observamos que os 54 MeGDEs estão envolvidos na regulação da produção do fator de crescimento de fibroblastos, na função molecular do ácido araquidônico e na atividade da ubiquitina-proteína transferase, a qual estão relacionados com inflamação, metabolismo da glicose e RI. Os nossos resultados da rede de interação entre esses MeGDEs mostraram 3 genes *hub-bottleneck* (*PTGS2*, *TNFAIP3* e *FBXL20*), sendo *PTGS2* e *TNFAIP3* hipometilados-expressão aumentada e *FBXL20* hipermetilado-expressão reduzida. Além disso, esses 3 genes participam de vias associadas à patogênese da obesidade, como TNF, NF-kappa B (NF-κB), IL-17, ubiquitina-proteína transferase, Wnt e lipólise. Também realizamos uma comparação dos nossos resultados com o banco de dados DisGeNET, observando que um total de 11 MeGDEs identificados no nosso estudo já haviam sido descritos como estando associados com obesidade. Em suma, nosso resultado sugere que novos MeGDEs podem ter um papel importante na obesidade, permitindo uma análise funcional desses genes.

No estudo experimental, a dieta CAF foi padronizada e ofertada aos camundongos C57BL/6, a qual levou ao desenvolvimento eficiente da obesidade nesses animais. Após as 16 semanas de protocolo, observamos que o grupo dieta CAF ganhou mais peso comparados aos controles e apresentou desordens metabólicas associadas à indução da obesidade, como hiperglicemia, hiperinsulinemia, RI, hiperleptinemia, hiperadiponectinemia e esteatose hepática. Também mostramos que CAF induz a desregulação de alguns genes relacionados a via das adipocitocinas, como *Tnf*, *Lep*, *Adipoq*, *AdipoR1*, *Ppargc1a*, *Cpt1a* e *Ins1* no TAB visceral desses animais. Tais resultados poderão levar ao estudo de outros modelos animais com dieta CAF e a compreensão dos efeitos moleculares da via das adipocitocinas na busca de novas estratégias terapêuticas da obesidade.

## 7. COLABORAÇÃO EM OUTROS TRABALHOS DURANTE O ANDAMENTO DO DOUTORADO

Além dos artigos que fazem parte da presente tese, ao longo do período de doutorado foram desenvolvidos, em colaboração, os seguintes manuscritos:

1. **Duarte, Guilherme Coutinho Kullmann**; Assmann, Tais Silveira; De Souza, Bianca Marmontel; Crispim Daisy. Polymorphisms in GLIS3 and susceptibility to diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *Meta Gene*, v. 29, p. 100898, 2021.
2. Dieter, Cristine; Lemos, Natália Emerim; Dorfman, Luiza Emy; **Duarte, Guilherme Coutinho Kullmann**; Assmann, Tais Silveira; Crispim, Daisy. The rs11755527 polymorphism in the BACH2 gene and type 1 diabetes mellitus: case control study in a Brazilian population. *Archives of Endocrinology Metabolism*, v. 64, p. 138-143, 2020.
3. Lemos, Natália Emerim; Dieter, Cristine; Dorfman, Luiza Emy; Assmann, Tais Silveira; **Duarte, Guilherme Coutinho Kullmann**; Canani, Luis Henrique; Bauer, Andrea Carla; Crispim, Daisy. The rs2292239 polymorphism in ERBB3 gene is associated with risk for type 1 diabetes mellitus in a Brazilian population. *Gene*, v. 644, p. 122-128, 2018.
4. Assmann, Tais Silveira; **Duarte, Guilherme C. K.**; Brondani, Letícia A.; De Freitas, Pedro H. O.; Martins, Égina M.; Canani, Luis H.; Crispim, Daisy. Polymorphisms in genes encoding miR-155 and miR-146a are associated with protection to type 1 diabetes mellitus. *Acta Diabetologica*, v. 1, p. 1-9, 2017.
5. Massignam, Eloíá Toscan; Dieter, Cristine; Assmann, Taís Silveira; **Duarte, Guilherme C. K.**; Bauer, Andrea C.; Canani, Luis H; Crispim, Daisy. The rs705708A allele of the ERBB3 gene is associated with protection to diabetic retinopathy and arterial hypertension and with improved renal function in type 1 diabetic patients. *Microvascular Research*, 2022. Aceito para publicação.