



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO

RAQUEL PATRICIA ATAIDE LIMA

**IMPACTO DA INGESTÃO DO FOLATO E CÁPSULA DE ÓLEO DE
AVELÃ NOS NÍVEIS DE METILAÇÃO DO GENE *ADRB3*, *LEP* E *POMC*,
PERFIL ANTROPOMÉTRICO, LIPÍDICO E ESTRESSE OXIDATIVO**

João Pessoa/PB

2017

RAQUEL PATRICIA ATAIDE LIMA

**IMPACTO DA INGESTÃO DO FOLATO E CÁPSULA DE ÓLEO DE
AVELÃ NOS NÍVEIS DE METILAÇÃO DO GENE *ADRB3*, *LEP* E *POMC*,
PERFIL ANTROPOMÉTRICO, LIPÍDICO E ESTRESSE OXIDATIVO**

Tese de doutorado apresentado ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Nutrição, do Centro de Ciências da
Saúde, da Universidade Federal da Paraíba,
para obtenção do título de Doutora.

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Maria José
de Carvalho Costa

João Pessoa/PB

2017

Catálogo na publicação
Setor de Catalogação e Classificação

L732i Lima, Raquel Patricia Ataíde.
Impacto da ingestão do Folato e cápsula de óleo de avelã nos níveis de metilação do gene ADRB3, LEP E POMC, perfil antropométrico, lipídico e estresse oxidativo / Raquel Patricia Ataíde Lima. – João Pessoa, 2017.
214 f. : il.

Orientadora: Maria José de Carvalho Costa.
Tese (Doutorado) – UFPB/CCS

1. Nutrição. 2. Epigenética. 3. Metilação do DNA. 4. Dieta - Folato.
5. Óleo de avelã. I. Título.

UFPB/BC

CDU - 612.39(043)

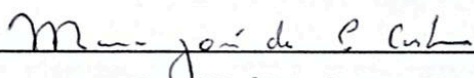
RAQUEL PATRICIA ATAIDE LIMA

IMPACTO DA INGESTÃO DO FOLATO E CÁPSULA DE ÓLEO DE AVELÃ NOS
NÍVEIS DE METILAÇÃO DO GENE *ADRB3*, *LEP* E *POMC*, PERFIL
ANTROPOMÉTRICO, LIPÍDICO E ESTRESSE OXIDATIVO

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como requisito obrigatório para obtenção do título de Doutora pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

APROVADA EM 26/09/2017

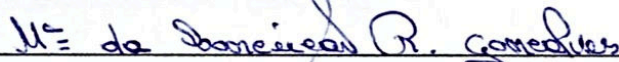
BANCA EXAMINADORA



Prof^a Dr^a Maria José de Carvalho Costa

Orientadora titular

(UFPB/Centro de Ciências da Saúde/Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição)



Prof^a Dr^a Maria da Conceição Rodrigues Gonçalves

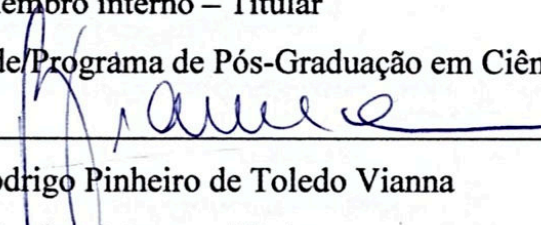
Membro interno – Titular

(UFPB/ Centro de Ciências da Saúde/Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição)

Prof^a Dr^a Marciane Magnani

Membro interno – Titular

(UFPB/ Centro de Ciências da Saúde/Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição)


Prof. Dr. Rodrigo Pinheiro de Toledo Vianna

Membro interno – Titular

(UFPB/Centro de Ciências da Saúde/Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição)

Prof^a Dr^a. Naila Francis Paulo de Oliveira

Membro externo – Titular

(UFPB/Centro de Ciências Exatas e da Natureza/Programa de Pós-Graduação em Biologia
Celular e Molecular)

Prof^a Dr^a. Patrícia de Oliveira Prada

Membro externo – Titular

(UNICAMP/ Faculdade de Ciências Aplicada/ Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Nutrição, do Esporte e Metabolismo (CNEM))

Prof. Dr. Alessio Tony Cavalcanti de Almeida

Membro externo – Suplente

(UFPB/Centro de Ciências Sociais Aplicada /Programa de Pós-Graduação em Economia)

João Pessoa

2017

Dedico este trabalho a **Deus**, fonte maior de amor e esperança, a toda minha família, em especial a minha querida mãe Maria Bernadete, a minha atenciosa e amada, **Prof^a** Maria José de Carvalho Costa e a toda equipe do projeto que esteve envolvida nesta conquista.

AGRADECIMENTOS

Antes de qualquer coisa, devemos seguir o salmo 117, “*Dai graças a Senhor, porque Ele é bom; eterna é a sua misericórdia*” e assim venho fazendo todos os dias ao me levantar.

Aos meus pais *Aluísio Pereira Lima e Maria Bernadete Ataíde Lima*, que sempre acreditaram em mim. Através de seu amor me mantiveram firme nesta caminhada. Seu amor incondicional é o que me mantém na luta diária, por compreenderem toda a minha ausência nesta longa jornada e me ajudando a suportar a dor de ter que conviver longe, com palavras de carinho que me encorajam a continuar na árdua caminhada. A vocês, o meu muito obrigado, amo vocês!

Aos meus irmãos *Aluisio Bruno e Rafael Márcio*, por serem fonte de inspiração e torcerem pelo meu crescimento profissional, me apoiando com palavras e o seu amor. Sempre tão inteligentes, brilhantes, compreensíveis e amorosos, não consegui ainda em toda minha vida identificar algum defeito em vocês. Amo vocês, obrigada!

Ao *Eduardo Diniz*, o qual acompanhou toda a fase final e compreendeu toda ausência pela temporada em Lyon – França, com todo carinho e paciência, reconheço e dedico todo meu amor e gratidão.

À minha admirável orientadora, *Professora Doutora Maria José de Carvalho Costa*, a você dedicaria toda a minha caminhada e minhas palavras não caberiam apenas em um pedaço de papel, por não conseguir descrever todo meu amor eu então decidi fazer da minha vida uma forma de gratidão ao que a senhora representa a todos ao seu redor e a seus familiares. Por toda essa doçura que transmite, minha admiração e convivência ultrapassaram os muros acadêmicos e se estendeu a sua família que assim como a senhora são doces e amorosos, por seus três filhos, *Eduardo, Ricardo e Rodrigo*, suas esposas *Luciana, Flávia e Juliana*, os quais lhe deram lindas netas *Mariana, Amanda, Sofia* e o mais novo *Erick* que sempre respeitaram suas horas de dedicação a nutrição e a pesquisa, e não diferente da mãe sempre me espelhei em suas condutas éticas e de respeito com o próximo e ao seu querido esposo *Francisco*, onde carinhosamente chamamos de *Chico*, agradeço por toda sua paciência e carinho, durante nossa longa jornada de dedicação a pesquisa, seja ela em finais de semana, feriados e turnos da noite

porém, Chico sempre esteve nos apoiando, por tudo isso reconheço e dedico minha profunda gratidão. Afim de não se estender muito pois, não será nossa separação e sim nosso inicio de mais um belo caminho. Que venham mais dez anos e muitos anos de convivência, amo muito a senhora.

Às minhas amadas amigas *Jéssica Bezerra, Dandara Felizardo, Myrella Cariry, Ynara Fádua, Sara Falcão e Caio Victor*, por todos os momentos de apoio as suas amizades foram fundamentais na conquista de mais uma etapa da minha vida. Meu amor e admiração por vocês são infinitos.

À professora *Naila Francis de Paulo Oliveira*, pela sua recepção tão doce e por ser uma professora tão dedicada, inteligente, a você professora todo meu amor a qual decidi seguir por sua postura ética e responsabilidade.

Ao querido *Rodrigo Pinheiro de Toledo Vianna* por tão gentilmente ter aceito o convite para participação nesta banca, e por ter contribuído de forma intensa com esta caminhada, o qual admiro desde minha graduação.

Às minhas queridas amigas *Liz Helena e Livia Lyra* por estarem comigo desde o início de minha caminhada e dividirem comigo momentos bons e ruins, por me apoiar, incentivar e ajudar sempre que precisei, com uma luz que amigos anjos possuem. Obrigada, levarei nossa amizade sempre no meu coração!

À *Marina Ramalho Ribeiro*, por acreditar em mim e por toda sua confiança depositada, agradeço a Deus pela oportunidade em tê-la no meu caminho e ter deixado muito mais feliz minha trajetória pois, és uma critura doce e muito “quista” por todos, brincadeiras a parte: Amo você. Continuando em princesas e tão importane quanto, agradeço também a *Jéssica Lisboa, Thamyres Ribeiro Chaves, Keylha Quirino, Nadjenny, Erika Souza e Jessica Vicky*, por serem estrelas na minha vida, apoio em minhas dificuldades, me arrancaram sorrisos e por vocês dediquei todo este meu tempo, amo todas por igual.

À *Professora Doutora Maria da Conceição Rodrigues Gonçalves*, pelo precioso apoio em momentos difíceis, sempre com palavras de carinho e acolhimento, por sempre ser tão presente em minha vida, a qual admiro pelo carinho com todos, inteligência e amor.

À *Professora Doutora Marciane Magnani*, professora integra, inteligente e responsável, características de sobra para elogir e admirar, agradeço por toda sua companhia ao longo deste tempo pelo precioso apoio em momentos difíceis, sempre com palavras de carinho e acolhimento, a você toda a minha gratidão.

Ao *Professor Doutor Alésio Tony Cavalcanti de Almeida*, por toda paciência e sabedoria, por ter o dom de ensinar e repassar todos seus conhecimentos por demonstrar tanto amor a seus alunos e acreditar na nutrição, a você professor todo meu carinho e agradecimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, representado por *Carlos e Marcos*, pela paciência e carinho nos compromissos diários.

À primeira turma de doutorado em Ciências da Nutrição, onde Deus em sua linda e sábia conduta me presenteou com sete pessoas das quais levarei em meu coração, *Juliana Padilha, Myrella Cariry, Anna Flávia Brito, Cristhiane Leite, Luciana Tavares, Katharyne Árabe e Raphaella Rodriques* por todo o convívio, colaboração, ensinamentos, experiências, tristezas e alegrias compartilhadas. Levarei para sempre comigo o carinho por cada um de vocês!

À equipe do Laboratorio - Labim, *Rayner Ferreira, Mayara, Vanessa, Juliana Padilha, Marina Ramalho e Jessica Lisboa*, em especial ao meu nobre e grande amigo *Rayner* o qual com toda sua dedicação e amor a ciência esteve presente comigo e os demais no laboratorio dia de domingo, feriado, com chuva ou sol, sempre com sorriso no rosto e muita responsabilidade.

À minha equipe de Lyon – França, *Whyara Almeida, Jéssica Fragoso, Oscar Araujo, Allan Lira, Monique Assis e Isabeli Goes*, a maior dificuldade de passar uma temporada

distante de familiares e amigos é a dor da saudade e juntos formamos nossa família aliviamos esta saudade, fomos exemplo de responsabilidade e compromisso com nossos sonhos.

Aos Pesquisadores *Luciano Pirolla, Emmanuelle Fouilloux-Meugnier* e todos do Laboratório CarMeN/INSA/Lyon, que me acolheram com todo carinho, preenchendo com todo amor o meu vazio por estar distante de todos, durante o período que estive em Lyon – França.

À *Rafaella Pordeus Luna e Mussara Monteiro*, doutorandas que em breve estarão alcançando essa tão linda e árdua caminhada. Agradeço por serem tão amáveis, pacientes e sábias. A vocês duas toda minha admiração e amor.

Ao Professor Doutor *Ronei Marcos de Moraes e Ana Hermínia Andrade e Silva* pela brilhante participação no embasamento estatístico do presente estudo.

À coordenação, vice-coordenação, professores, instituições executoras e financiadoras do Projeto II DISANDNT/PB por tornar possível a concretização deste trabalho por meio de investimentos na pesquisa científica.

À toda equipe do projeto o qual me dediquei desde a graduação, vocês todos contribuíram para a realização deste lindo projeto e para o meu crescimento. Obrigada!

Aos participantes da pesquisa, por confiarem e contribuírem com a Ciência da Nutrição, efetivando a concretização deste trabalho. Em especial, as mulheres que participaram da intervenção do estudo as quais sempre me receberam com sorriso e abraços de domingo a domingo, no sol e chuva, a vocês toda minha gratidão.

RESUMO

Compreender os efeitos da dieta com folato e óleo de avelã, no perfil de metilação do DNA, perfil antropométrico, lipídico e estresse oxidativo é relevante, podendo a investigação nesse estágio fornecer subsídios dietéticos importantes para o desenvolvimento de estratégias de prevenção dessas doenças ainda na fase adulta. O presente projeto de doutorado está vinculado a um projeto maior intitulado “II Ciclo de Diagnóstico e Intervenção da Situação Alimentar, Nutricional e das Doenças não Transmissíveis mais Prevalentes da População do Município de João Pessoa/PB” (II DISANDNT/PB) e teve dois desenhos metodológicos: o primeiro trata-se da composição de uma amostra representativa, da zona leste e oeste, de indivíduos adultos do município de João Pessoa, a partir do II DISANDNT/JP, estudo de base populacional e de corte transversal. O segundo desenho metodológico foi desenvolvido com uma subamostra da população acima mencionada, sendo do tipo ensaio clínico e intervencional. E como resultados encontrados no primeiro desenho metodológico, composto por 265 indivíduos adultos. Referente ao perfil de metilação foi observado que 50% da população estava metilada e 21% não metilada e quanto ao estado nutricional 53% da população encontrava-se com sobrepeso e obesidade. Foi observado, ainda quanto as relações entre os indivíduos metilados associação com maiores chances de risco para sobrepeso, obesidade e elevado RCA. No segundo desenho metodológico, constituído por 40 mulheres classificadas com sobrepeso e obesidade, encontrou-se que pós intervenção estas mulheres apresentaram uma redução nos valores de metilação do gene *ADRB3* e MDA e aumento nos valores de HDL- C e CAT, sendo estes significativos. Quanto ao grupo de intervenção dietética, que apresentou melhor resultado foi o grupo 3, com maior redução nos níveis de metilação do gene *ADRB3*, 18%. Conclusão: Observou-se que as alterações epigenéticas no locus do gene *ADRB3* irão contribuir para uma melhor compreensão do desenvolvimento da obesidade e doenças crônicas não transmissíveis envolvidas com o consumo de gordura trans, perfil lipídico e ácido fólico. Este estudo foi o primeiro a demonstrar o efeito benéfico do consumo da capsula de óleo de avelã para modular o perfil de metilação referente ao gene *ADRB3*, ^{nandera} redução da cintura, RCA e LDL-C.

Palavras – chaves: Epigenética. Metilação. DNA. Folato. Avelã.

ABSTRACT

Epigenetic mechanisms may be involved in the regulation of lipid metabolism and inflammatory markers may therefore contribute to the cardiovascular risk profile, as well as environmental factors have a significant impact on the epigenetic program of gene expression. Methyl groups are usually added or removed as needed and can be influenced by diet soon, dietary factors have been linked to the change of DNA methylation, resulting in changes in gene expression. Research on the prevalence of gene methylation levels on the impact of nutrient intake, as well as the inflammatory condition and the results of dietary interventions for the genes, it is a sparse area in studies and, therefore, expanding of the knowledge. Thus, understanding the effects of a diet rich in antioxidants and hazelnut oil, in inflammation and DNA methylation profile is important because chronic diseases with cardiovascular disease can begin with the consumption of modified lipids and can research this stage provide important dietary allowances for the development of this disease prevention strategies even in adulthood. This PhD project is linked to a larger project entitled "II Diagnosis Cycle and Intervention Food Situation, Nutrition and Noncommunicable Diseases Prevalent over the City Population of João Pessoa / PB" (II DISANDNT / PB) and have two methodological designs: the first one is the composition of a representative sample of adults in the city of João Pessoa, from II DISANDNT / JP, population-based study and cross-sectional. The second methodological design was developed with a subsample of the above population, selected from criteria being the type and interventional clinical trial. This model will have to evaluate the effect of a diet rich in antioxidant and hazelnut oil, in inflammation and gene expression.

Key-words: Methylation. DNA. Prevalence. Metabolism of Lipids. epigenetics

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS DA TESE

Figura 1. Modelo conceitual que liga a epigenética às doenças.....	25
Figura 2. Mecanismo de Metilação do DNA.	27
Figura 3. O sistema de reciclagem da metionina e metabolismo da homocisteína	28
Figura 4. Digestão dos lipídios.....	43
Figura 5. Via de Metabolismo do Folato.....	57
Figura 6. Mapa utilizado no sorteio de quadras, João Pessoa/PB	61
Figura 7. Diagrama dos cálculos para definição da amostra da Zona leste do município de João Pessoa.....	65
Figura 8. Diagrama dos cálculos para definição da amostra da Zona oeste do município de João Pessoa.....	66
Figura 9. Fluxograma da coleta de dados.....	69
Figura 10. Cálculo para estimativa do nível plasmático do Colesterol - LDL	72
Figura 11. Fluxograma dos grupos de intervenção.	79

LISTA DE QUADROS

QUADROS DA TESE

Quadro 1. Exemplos de fatores nutricionais com efeitos metabólicos benéficos que são regulados pelo mecanismo epigenético.	53
Quadro 2. Composição média dos nutrientes (por 100g).....	59
Quadro 3. Critérios para estratificação final da amostra.....	61
Quadro 4. Estratificação dos bairros por renda com desvio padrão.....	63
Quadro 5. Cálculo da estimativa do tamanho da amostra, por zona	63
Quadro 6. Amostra de quadras por bairro, número de quadras sorteadas por bairro e zonas visitadas	64

QUADROS DO ARTIGO 2

Quadro 1. Primers used to analyze the methylation status.....	182
--	-----

LISTA DE TABELAS

TABELAS DA TESE

Tabela 1. Sequência de primers e condições das reações de MSP	75
Tabela 2. Dieta consumida pelo Grupo 1 e 2 contendo 300g de vegetais e leguminosas ricos em folato	79
Tabela 3. Dieta consumida pelo Grupo 3 contendo 300g de vegetais e leguminosas	80
Tabela 4. Composição em ácidos graxos do óleo de avelã.....	82

TABELAS DO ARTIGO 1

Table 1. General characteristics of the adult individual	168
Table 2. Odds ratio (95% CI) for the association of nutritional status, lifestyle, and food intake according to <i>ADRB3</i> hypermethylation of adult individuals	170
Table 3. Odds ratio (95% CI) for the association of biochemical test results with <i>ADRB3</i> hypermethylation of the adult individuals	171
Table 4. Prevalence of inadequate intake of regular energy; total, saturated, monounsaturated, polyunsaturated, and trans fat; cholesterol; and folate.	172

TABELAS DO ARTIGO 2

Table 1. Anthropometric characteristics, methylation level, lipid profile and oxidative stress of women before and after intervention.....	193
Table 2. Methylation levels of the <i>ADRB3</i> gene, anthropometric data and regular food intake of women of the post-intervention groups.....	194
Table 3 Simple regression analysis of methylation levels, anthropometric measurements, lipid profile and oxidative stress for the different intervention groups	195
Table 4. Simple regression analysis of the regular intake of folate, total fat and fat fractions for the different intervention groups.....	197
Table 5. Analysis of methylation levels, waist, WHtR, lipid profile and oxidative stress, by group before and after intervention	199
Table 6. Comparison of post-intervention groups	200

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1°DISANDNT/JP Primeiro Diagnóstico e Intervenção da Situação Alimentar, Nutricional e das Doenças Não Transmissíveis Mais Prevalentes de João Pessoa

2°DISANDNT/JP Segundo Diagnóstico e Intervenção da Situação Alimentar, Nutricional e das Doenças Não Transmissíveis Mais Prevalentes de João Pessoa

ADRB3 *Adrenoreceptor Beta – 3* (Beta – 3 receptor adrenérgicos)

AdoHCY adenosilhomocisteína

AF Ácido Fosfatídico

AG Ácidos graxos

AGS Ácidos Graxos Saturados

AGL Ácidos Graxos Livres

AGT Ácidos Graxos Trans

AHA *Association American of Health* (Associação Americana do Coração)

APOB Apolipoproteína B

AVE Acidente Vascular Encefálico

BHMT Methyltransferase Betaine – Homocysteine

CE Ésteres de Colesterol

CBS Cistationa β - sintase

CDC *Center for Disease Control and Prevention* (Centro de Controle e Prevenção de Doenças)

DNA *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico)

DAG Diacilglicerol

DAC Doença Arterial Coronariana

DM Diabetes Mellitus

DMG Dimetilglicina

DCV Doenças Cardiovascular

CpG Citosina – fosfato - Guanina

CC Circunferência da Cintura

CCS Centro de Ciências da Saúde

CNPq Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

DNMT DNA metiltransferase

DHA Ácido Docosaheptaenóico

DCNT Doenças Crônicas não Transmissíveis

EPA Ácido Eicosapentaenóico

EDTA Ácido Etilenodiaminotetracético

FD Fosfatidilcolina

FE Fosfatidiletanolamina

FCMPB Faculdade de Ciências Médicas da Paraíba

FAPESQ Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba

GWAS *Genome-wide association study* (Estudo de associação em todo o genoma)

HP *Helicobacter Pylori*

HCy Homocisteína

HHCy Hiperhomocisteinemia

HAS S – Adenosilhomocisteína

HDL *High Density Lipoproteins* (Lipoproteína de alta densidade)

IL Interleucinas

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IMC Índice de Massa Corporal

LPA Ácido lipofosfatífico

Lep Leptina

LDL *Low Density Lipoproteins* (Lipoproteína de baixa densidade)

MAG Monoacilglicerol

MDA Malondealdeído

MGL Monoglicerídeo Lipase

MTHFR Metilenotetarhidrofolato redutase

MS Metionina sintase

MSM Método de Múltiplas Fontes

NIESN Núcleo Interdisciplinar de Estudos em Saúde e Nutrição

OMS Organização Mundial de Saúde

PPAGCR1A *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha*
(Peroxisoma coativador do receptor gama ativado proliferador 1 alfa)

PCR-us Proteína – C Reativa ultra - sensível

PLS Fosfolípidos

POMC Proopiomelanocortina

PUFA Ácidos Graxos Poliinsaturados

PPGCN Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição

QM Quilomicrons

ROS Espécies Reativas de Oxigênio

RNA *Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucléico)

RCQ Razão Cintura Quadril

RCEst Razão Cintura/ Estatura

SAM S- adenosilmetionina

TNF Fator de Necrose Tumoral

TAG Triacilglicerol

THF Tetrahydrofolato

TCLE Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UFPB Universidade Federal da Paraíba

WHO World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REFERENCIAL TEÓRICO	22
2.1.	EPIGENÉTICA	22
2.1.1.	Metilação do DNA	25
2.1.2.	Metilação de DNA e Homocisteína	27
2.2.	SOBREPESO E OBESIDADE	30
2.2.1.	Genética e Epigenética no contexto da Obesidade	33
2.3.	LIPÍDEOS	35
2.3.1.	Perfil de metilação do DNA em genes relacionados ao consumo de lipídeos e doenças crônicas não transmissíveis	37
2.3.2.	Consumo de Lipídeos	39
2.3.3.	Metabolismo dos lipídeos	42
2.4.	GENES	44
2.4.1.	ADRB3	44
2.4.2.	Leptina (Lep)	45
2.4.3.	POMC	47
2.5.	PROCESSO INFLAMATÓRIO	48
2.5.1.	Estresse Oxidativo	50
2.5.2.	Dieta Antioxidante	52
2.6.	ÁCIDO FÓLICO	56
2.6.1.	Óleo de Avelã	58
3	ABORDAGEM METODOLÓGICA	59
3.1.	CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO	59
3.1.1.	Questões ética	60
3.1.2.	Protocolo Amostral	60
3.2.	Desenhos Metodológicos:	67
3.2.1.	População e Amostra	67
3.3.	Coleta de dados.....	68
3.4.	Avaliação Nutricional.....	70
3.5.	Avaliação do Consumo Alimentar	70
3.5.1.	Estimativa do Consumo Habitual	71
3.6.	Análise Bioquímica	72

3.6.1.	Perfil Lipídico	72
3.6.2.	Malondealdeído (MDA)	73
3.6.3.	Capacidade de Antioxidante Total – CAT.....	73
3.6.4.	Homocisteína	73
3.6.5.	Ácido Fólico	74
3.7.	Análise do perfil de metilação	74
3.7.1.	Obtenção da amostra e Isolamento DNA genômico.....	74
3.7.2.	Análise de metilação de DNA em sítios específicos	75
3.8.	Desenho Metodológico 2:.....	76
3.8.1.	Questões Éticas	76
3.9.	População e amostra	76
3.9.1.	Cálculo Amostral	77
3.9.2.	Critérios de Inclusão	77
3.9.3.	Critérios de Exclusão	77
3.10.	Protocolo Experimental	77
	Fonte: Própria	79
3.10.1.	Elaboração dos Vegetais	79
3.10.2.	Cápsula de óleo de avelã	81
3.11.	Análise do Nível de metilação	82
3.11.1.	Obtenção da amostra e Extração de DNA a partir do sangue	82
3.11.2.	Desenho dos Primer	83
3.11.3.	Conversão do DNA pelo bissulfito.....	83
3.11.4.	Níveis de Metilação.....	83
4	REFERÊNCIAS	84
	IBGE.INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E	
	ESTATÍSTICA .Contagem da população 2010. Rio de Janeiro: Ministério do	
	Planejamento, 2010.....	96
	APÊNDICE	117
	APÊNDICE A – CERTIDÃO DO COMITÉ DE ÉTICA	118
	APÊNDICE B – CERTIDÃO DO COMITÉ DE ÉTICA	119
	APÊNDICE C - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	120
	APÊNDICE D – software methprimer	121
	APÊNDICE E – sequência do primer <i>adrb3</i>	122
	ANEXOS.....	125

ANEXO B – CARACTERIZAÇÃO SOCIOECONÔMICA E DEMOGRÁFICA	128
ANEXO C – CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA	129
ANEXO D - RECORDATÓRIO ALIMENTAR:	130
ANEXO E - AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA.....	132
ANEXO F - LISTA DO SISTEMA DE EQUIVALENTES ATUALIZADA E MODIFICADA PARA USO NO BRASIL	133
ANEXO G – FICHA DE EQUIVALENTES.....	149
7 ARTIGO 1	149
8ARTIGO 2	174
9ARTIGO 3	199

1 INTRODUÇÃO

Entende-se por epigenética um mecanismo associado a mudanças hereditárias na expressão do gene, que não envolvem alterações na sequência do DNA, são reversíveis e ainda podem ser herdadas entre gerações (MARTINEZ et al., 2014; HOLLIDAY, 2006). Embora a definição de epigenética esteja constantemente sendo atualizada, três características principais são preservadas: (1) sem alterações na sequência de DNA, (2) hereditariedade e (3) plasticidade e reversibilidade (ZHENG et al., 2014).

Embora, o estado de metilação do DNA é atualmente o marcador epigenético mais estudado, existe um reconhecimento crescente de que outras modificações, tais como a modificação de histona, sejam também tão importante pois, pode modificar a organização da cromatina, de tal modo que afete os padrões de expressão de genes (CHOI; FRISO, 2010; MARTINEZ et al., 2014). Estes mecanismos, juntamente com outros eventos reguladores da transcrição, em última instância regulam a atividade do gene e a sua expressão durante o desenvolvimento e diferenciação ou em resposta a estímulos ambientais e nutricionais.

Estudos pré-clínicos e clínicos têm demonstrado que a exposição aos desafios ambientais, modificam as marcas epigenéticas e que a maioria das pesquisas tem se concentrado em metilação do DNA (ORDOVÁS; SMITH, 2010). Investigações prospectivos são necessários para determinar se os indivíduos que estão expostos a vários desafios ambientais e desenvolvem fatores de risco podem acumular alterações epigenéticas ao longo do tempo, e se essas alterações aumentam a incidência de doenças cardiovasculares ou doenças crônicas não transmissíveis, em geral.

Ao contrário do genoma, o epigenoma pode ser modificado e, assim, alguns marcadores de risco epigenético tem o potencial para ser revertido. Tais modificações, podem ocorrer, por meio de medicamentos, dieta ou exposições ambientais (BISHOP; FERGUSON, 2015).

Mecanismos epigenéticos podem estar envolvidos na regulação do metabolismo de lipídeos e, portanto, podem contribuir para o perfil de risco cardiovascular (PFEIFFER et al., 2015) e obesidade. Como também os fatores genéticos e epigenéticos que contribuem para a suscetibilidade de um indivíduo as doenças cardiovasculares (KRISHNA et al., 2013).

Esses fatores citados quando associados ao estresse oxidativo e inflamação, tendem a influenciar e desempenharem papel na metilação do DNA ou na modificação da histona (GILBERT; LIU, 2012).

Nesse sentido, segundo Switzeny et al., (2012) e Kauwell, (2008), os fatores ambientais e dietéticos apresentam um impacto significativo sobre o programa epigenético da expressão do gene e foram encontrados para alterar a metilação do DNA, tanto globalmente como específico em lócus, levando a uma expressão alterada dos genes.

Quanto a essas relações, estão disponíveis dados limitados em humanos, principalmente no que se refere ao consumo de gorduras. De acordo com Brons et al., (2010), o consumo de uma dieta rica em gordura (60%) aumentou a metilação do DNA no promotor *PPARGC1* no músculo esquelético de homens jovens saudáveis de uma forma reversível. Esta conclusão é corroborada por estudos de células musculares humanas, onde com a exposição aos ácidos graxos *in vitro* houve um aumento igualmente da metilação de *PPARGC1A* (BARRES et al., 2009). Sendo que, dieta com 60% de gordura é considerada muito rica neste nutriente, com base em consenso, que em uma dieta adequada, deve conter entre 30 – 35% de gordura total distribuídas entre gordura total e ácidos graxos (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2017)

Considerando a necessidade de estudos que investiguem se há relação entre a ingestão de nutrientes, como o folato e gordura, dados antropométricos e bioquímicos durante a vida adulta com os mecanismos epigenéticos, como a metilação de DNA (LILLYCROP et al., 2014; DO AMARAL et al., 2014), este estudo, foi desenvolvido com o primeiro objetivo de identificar a prevalência da hipermetilação do gene *ADRB3* em adultos e sua relação com perfil antropométrico, lipídico e estresse oxidativo (MDA, CAT), Homocisteína e ácido fólico com indivíduos adultos.

E em um segundo momento, foram avaliados o impacto da ingestão de alimentos ricos em folato e cápsula de óleo de avelã nos níveis de metilação do gene *ADRB3*, *Lep* e *POMC*, perfil antropométrico, lipídico e estresse oxidativo em adultos do sexo feminino com sobrepeso e obesidade. Com o objetivo de estimar se esta intervenção nutricional poderia atuar na prevenção ou no tratamento destes indivíduos, ao preencher a lacuna referente a se a dieta proposta pode modificar o perfil antropométrico, lipídico, estado inflamatório e reverter e/ou modificar o nível de metilação do DNA.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. EPIGENÉTICA

Em 2003, o projeto Genoma Humano lançou uma versão avançada do genoma humano, disponibilizando sequências de alta qualidade, iniciando a construção de uma nova era de pesquisa em diversas disciplinas, incluindo a nutrição humana e seu papel na prevenção da doença. A nutrigenômica surgiu ao lado de outros campos após a revolução do genoma e se refere ao estudo das interações gene-nutriente que poderia subsidiar possíveis intervenções dietéticas com o objetivo geral de manutenção de uma ótima saúde ou prevenção da doença (MUTCH et al., 2005).

Nutrigenômica é uma área bem estabelecida de pesquisa em ciência nutricional. Sendo estudados o polimorfismos e a epigenética, os polimorfismos foram identificados nos genes envolvidos em uma grande variedade de vias, que alteram o metabolismo dos nutrientes e modificam o risco de doença. No entanto, tais polimorfismos são fixos ao longo da vida e os seus efeitos devem ser selecionados dentro da dieta e estilo de vida de um indivíduo, a fim de manter a saúde ótima. Quanto a nutriepigénomica é um campo emergente de pesquisa que centra-se na interação entre nutrição e epigenoma. Marcas epigenéticas podem apresentar plasticidade ao longo da vida, embora em graus diversos, e podem ser modificados por fatores ambientais, incluindo dieta (BURDGE; LILLYCROP, 2010).

A epigenética é definida como o estudo de alterações na expressão do gene hereditários, sem alterar a sequência do DNA, ou fenótipo celular. A Hereditariedade é um parâmetro que indica o grau em que a variabilidade de cada característica em uma população pode ser atribuída a fatores genéticos (CHMURZYNSKA; MLODZIK, 2017).

O termo epigenética foi criado por Conrad Waddington em 1940. Originalmente, a epigenética refere-se à forma como os genes e seus produtos trouxeram o fenótipo (JABLONKA; LAMB, 2002), ou seja, a epigenética é o sistema regulatório biológico através do qual os organismos respondem às pressões ambientais (HERCEG; VAISSIERE, 2011).

A epigenética é responsável por mudanças programadas durante o desenvolvimento embrionário, como resultado “das interações causais entre genes e seus produtos que contribuem para mudanças no fenótipo”. O epigenoma atua como uma ponte entre a genética e o ambiente, e o código epigenético modifica a expressão gênica para determinar

o fenótipo final sem alterações nas sequências de DNA. As modificações epigenéticas podem alterar o fenômeno da doença, afetando diretamente o gene alvo, como resposta a sinais ambientais e estados patológicos, como dieta, exercício, toxinas, estresse oxidativo, inflamação e alterações metabólicas (SUN et al., 2017).

As alterações epigenéticas do (s) gene (s) têm um efeito importante na formação e desenvolvimento de embriões, inativação do cromossomo X, impressão genômica, diferenciação e identidade celular, herança estável da expressão gênica, função das células imunes, plasticidade das células-tronco e celular e respostas a sinais ambientais. As modificações da histona e a metilação do DNA, juntamente com os RNAs não codificados, são coletivamente conhecidas como modificações epigenéticas que contêm a informação epigenética necessária para a hereditariedade estável dos protótipos de expressão gênica em células diferenciadas (SUN et al., 2017).

Os principais mecanismos epigenéticos em células de mamífero são a metilação de carbono 5 de resíduos de citosina no nucleótidos CpG; modificações covalentes de histonas, tais como a metilação, acetilação, fosforilação, e ubiquitinação; e as atividades de pequenos RNAs interferentes (BIRD, 2002; UDALI et al., 2013) e pode ser transmitida por mitose (através da divisão celular) ou meioticamente (herança transgeracional) (LOPOMO et al., 2016).

Estudos recentes sugerem que a regulação epigenética da expressão gênica (metilação do DNA e modificações de histonas) poderiam ser um dos principais contribuintes para a variação da suscetibilidade a doenças como obesidade e diabetes tipo 2 (SHWENK et al., 2013a). Por exemplo, mecanismos epigenéticos podem ser a razão por que murganhos C57BL/6 exibem grande variabilidade na expressão de genes em resposta a uma dieta rica em gordura, apesar de serem geneticamente idênticos (KOZA et al., 2006). Em estudos com ratos observou-se que a alimentação rica em gordura interfere com o metabolismo da glicose hepática, a metilação e a repressão dos genes que codificam para a glucoquinase e do tipo L de piruvato -quinase (JIANG et al., 2011). Além de alterações no metabolismo da glicose, o acúmulo de lipídios no fígado é um evento no início do aparecimento da resistência à insulina induzida por dieta e obesidade (SHWENK et al., 2013).

Existem dois principais mecanismos da epigenética, como já mencionado, que são a modificação pós-tradução de proteínas histonas da cromatina e a metilação de DNA. Parece haver um papel fundamental desempenhado pela epigenética em doenças humanas, tais como na doença inflamatória e em câncer (WILSON, 2008).

Em contraste com o fundo genético herdado dos pais, a epigenética considera mudanças que constituem a memória dos eventos anteriores, mesmo dentro do útero. Mais tarde a exposição a um ambiente hostil pode, portanto, resultar em diversas patologias, tais como diferentes doenças crônicas complexas (WHAYNE , 2014). Um exemplo desta ocorrência pode envolver doenças metabólicas, tais como obesidade, síndrome metabólica, e diabetes mellitus tipo 2 (DM).

A eucariótica (eucariota refere-se a um organismo cujas células têm estruturas complexas fechados dentro das membranas) do genoma é a mesma em todas as células somáticas de um organismo, mas as estruturas e as funções específicas é quem diferencia um tipo de célula a partir de outro. A explicação destas diferenças é devido a padrões de expressão gênica em células únicas, como determinado durante a diferenciação celular (TAMMEN et al., 2012).

A cromatina é um complexo de proteínas e ácidos nucleicos básicos, tais como histonas, presentes em células eucarióticas, dispersos no núcleo e condensadas em cromossomas durante a mitose e meiose. É o substrato fisiologicamente relevante para todos os processos genéticos no interior dos núcleos das células eucarióticas. Alterações dinâmicas na organização do local e global desta cromatina parecem ser os reguladores-chave da função do genoma (FISCHLE et al., 2003). Vários sinais de células dentro e fora parecem convergir sobre esta importante plataforma de sinalização. Numerosas modificações pós-tradução de histonas, as principais componentes das proteínas da cromatina, foram analisadas e definidas. Estes foram chamados de marcas epigenética que parecem ser mediadores importantes da atividade funcional do genoma e agem em resposta a vias de sinalização que vêm de "montante" (ONG; CORCES, 2011).

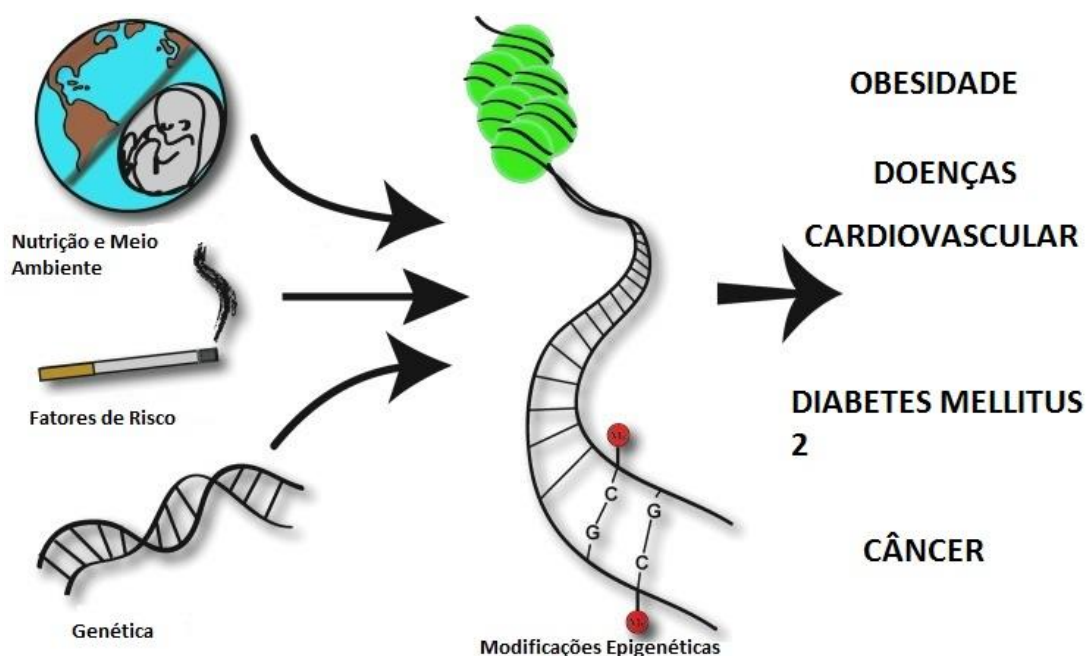
Existem várias situações cruzadas (cross talk) entre os vários componentes deste sistema regulatório complicado que estão sendo cada vez mais definida em relação a estes circuitos epigenéticos. O DNA que é embalado em cromatina é a base fisiologicamente relevante para todas as funções dependentes de DNA no interior dos núcleos das células eucarióticas (NEMETH; LANGST, 2004). Estruturas altamente compactadas de DNA, as histonas tendem a reprimir os processos dependentes de DNA.

Logo, a epigenética está relacionada com mudanças, a partir de marcas no genoma que são copiadas de uma geração de células para a próxima (MATHERS, 2008). Essas marcas envolvem a metilação do DNA e modificações pós-tradução de caudas das histonas que se projetam a partir de núcleos de nucleossomos. Uma hipótese é que a alteração da

marca epigenética é a forma como os efeitos ambientais, incluindo a nutrição, dieta e exercício, são recebidas e registradas pelo genoma.

A promessa da epigenética nutricional é que ela vai ajudar a elucidar a forma como a nutrição poderia manter um indivíduo saudável e contribuir na prevenção de doenças, como diabetes mellitus tipo 2, obesidade, inflamação e distúrbios cognitivos através dos efeitos dos nutrientes sobre o epigenoma. O atual conhecimento sobre as influências dietéticas no mecanismo epigenético é de expansão, e certamente é uma abordagem promissora para melhorar a saúde da população (JIMENEZ – CHILLARON et al., 2012).

Figura 1. Modelo conceitual que liga a epigenética às doenças.



Fonte: Adaptado de KIM et al., 2013

2.1.1. Metilação do DNA

A metilação do DNA é a mais conhecida marca epigenética (SCHUBELER, 2015) e ocorre, geralmente, em dinucleotídeos citosina-fosfato-guanina (CpG), onde uma das numerosas enzimas das metiltransferases específicas adiciona um grupo metilo da citosina no carbono posição 5' de um dinucleótido CpG e são potencialmente hereditárias do genoma dos mamíferos (ANWAY et al., 2006; AFMAN; MULLER, 2012).

Esta metilação, pode afetar a expressão do gene e a estabilidade cromossômica e potencialmente influenciar os resultados fenotípicos na saúde e na doença (CALVANESE

et al., 2008). Perfis epigenéticos são influenciados pela genética (MCKAY et al., 2012), como o envelhecimento e fatores ambientais, incluindo a dieta, os produtos químicos e hábito de fumar (CHRISTENSEN et al., 2009).

O padrão epigenético é principalmente estabelecido no início da vida e em seguida mantidos em células diferenciadas, mas alterações dependentes da idade, ainda tem o potencial de modular a expressão do gene e traduzir fatores ambientais em traços fenotípicos (SANDOVICI et al., 2011).

A metilação da citosina é comum em todo o genoma humano. Esta modificação covalente ocorre com maior frequência em citosinas dentro de um dinucleótido 5'-CpG-3' quando um grupo metilo da S-adenosilmetionina (SAM) é transferido enzimaticamente para a posição 5 de citosina para gerar 5-metilcitosina (5-MC) em DNA genômico. Os padrões de metilação do DNA são um produto da frequência da metilação do DNA de citosina em locais específicos ao longo de uma cadeia de DNA. A análise recente de metilação de DNA de alta resolução do genoma de uma linha celular de fibroblastos humanos primários demonstrou que 4,25% das citosinas totais em DNA genômico são metiladas, 67,7% dos CpGs são metilados e 99,98% da metilação do DNA ocorre em dinucleótidos CpG (CRIDER et al., 2012).

Os Dinucleótidos CpG podem ser agrupado em regiões conhecidas como ilhas de CpG. Em termos gerais, a hipermetilação de CpG dentro dos promotores de genes está associada com a inativação da transcrição, ao passo que os promotores não metilados (hipometilados) são potencialmente transcricionalmente ativo (LILLYCROP et al., 2014; VEL SZIC et al., 2015). No entanto, há exceções, se o CpG metilado cai dentro do elemento de resposta de um repressor da transcrição, este pode induzir a expressão do gene. Aproximadamente 70% dos dinucleótidos CpG são metilados, principalmente na heterocromatina e sequências repetitivas, tais como retrotransposições (YODER et al., 1997). A maioria dos estudos têm-se centrado sobre o efeito da metilação dos dinucleótidos CpG dentro de regiões reguladoras a 5' dos genes na transcrição. Alguns genes, por exemplo, apolipoproteína E (WANG; OELZEB, 2008), contém ilhas de CpG em direção à extremidade 3', embora a função reguladora é incerto.

Como mencionado anteriormente, a metilação do DNA é a mais conhecida pois, seus ensaios e interpretações são mais fáceis do que mudanças nas modificações das histonas (CHERYL ; CASANUEVA, 2016)

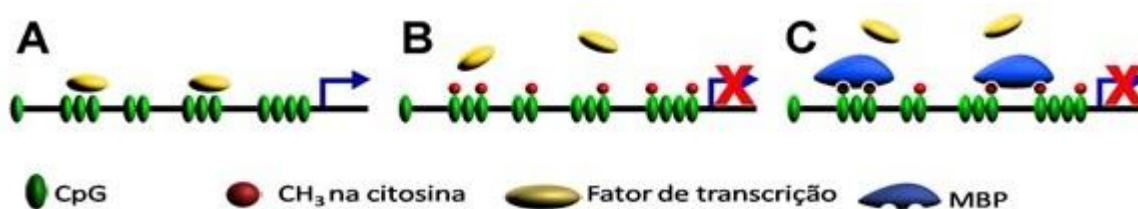
A hipermetilação dos promotores ricos em CpG desencadeia modificações do código de histona locais que resultam num mecanismo de camuflagem celular que

sequestra promotores de genes longe de fatores de transcrição, causando silenciamento estável da expressão do gene (SPROUL; MEHAN, 2013)

A metilação do DNA ocorre com a transferência covalente de um grupo metilo a partir de S-adenosil-L-metionina para citosinas em dinucleótidos CpG (HERMAN; BAYLIN, 2003; WEBER; SCHÜBELER, 2007). E é catalisada por uma família de DNA metiltransferases estreitamente relacionados (DNMT1, DNMT3a, e DNMT3B) (HERMANN et al., 2004). DNMT1 é uma metiltransferase de manutenção e é o mais abundante da DNA metiltransferase, em mamíferos. O DNMT3A / B, amplamente aceito, por ser o principal responsável para a metilação do DNA durante o desenvolvimento (diferenciação), enquanto DNMT1 mantém padrões de metilação do DNA durante a replicação do DNA (e divisão celular) (VEL SZIC et al., 2015).

A metilação do DNA suprime o processo de transcrição dependendo da localização e densidade do promotor das ilhas CpG (KASS et al., 1997), onde, a hipermetilação de ilhas de CpG está geralmente associada à repressão da transcrição, ao passo que a hipometilação está associada à ativação transcricional (LOPOMO et al., 2016). Na figura 1, observa-se o mecanismo pelo qual a metilação do DNA inibe a transcrição gênica.

Figura 2. Mecanismo de Metilação do DNA.

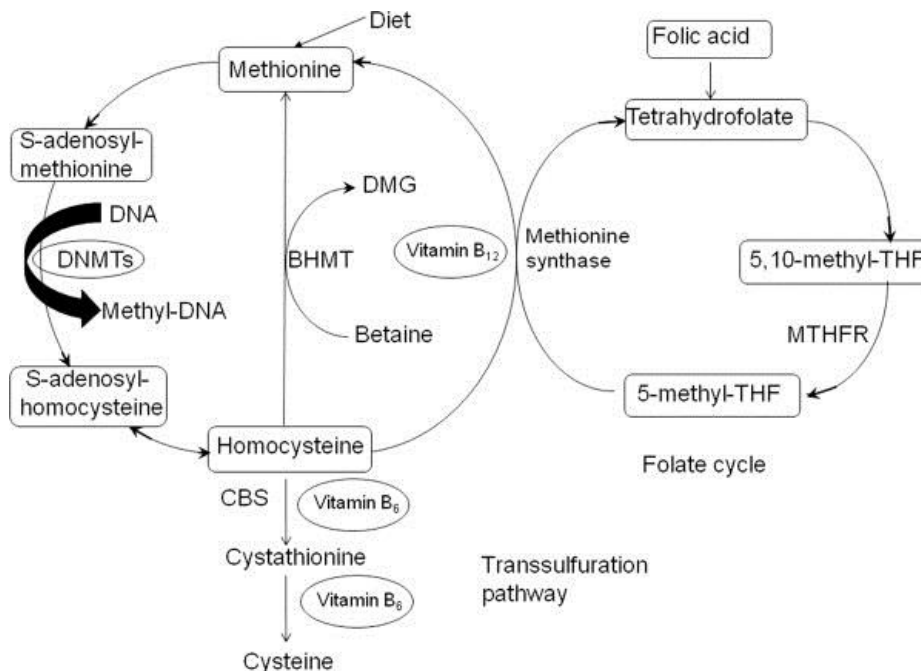


Legenda: A. região promotora desmetilada permitindo a ligação dos fatores de transcrição. B. Metilação impedindo a ligação dos fatores de transcrição. C. Proteínas que se ligam à metilcitosina em ilhas CpG bloqueiam a ligação dos fatores de transcrição. Fonte: Attwood et al., (2002).

2.1.2. Metilação de DNA e Homocisteína

A homocisteína (Hcy) é um aminoácido contendo enxofre derivado da metionina após desmetilação através de dois compostos intermediários, S-adenosilmetionina (SAM) e S-adenosilhomocisteína (HAS) (FINKELSTEIN, 1998). A metionina é um aminoácido essencial na maior parte adquirida a partir do sistema de reciclagem de metionina e em parte a partir da dieta (Figura 3).

Figura 3. O sistema de reciclagem da metionina e metabolismo da homocisteína



Fonte: Zhou et al., 2014

Abreviações: BHMT: metiltransferase betaína-homocisteína, DMG: Dimetilglicina, THF: tetrahydrofolato, MTHFR: reductase 5,10-metiltetrahydrofolato, CBS: cistationina β-sintase.

O SAM, proveniente da metionina (dieta) é o dador mais importante e universal do grupo metilo no corpo humano para todas as metiltransferases que metilam o DNA e histonas (KIM et al., 2008).

Com a transferência de um grupo metilo, é convertido para o SAM - HAS e a proporção SAM / HAS pode servir como um indicador para a capacidade de metilação intra-celular (HOFFMAN et al., 1980). A maioria das metiltransferases dependentes de SAM-, incluindo DNA metiltransferases (DNMTs), pode ser inibida por HAS, que tem uma maior afinidade do que com metiltransferases SAM. HAS pode ser adicionalmente hidrolizado para Hcy e adenosina. Esta reação é reversível com o equilíbrio termodinâmico que favorece fortemente a síntese de HAS em vez de hidrólise (ZHOU et al., 2014).

A homocisteína (Hcy) é metabolizada in vivo através de duas vias: remetilação ou transulfuração. Na via de remetilação, Hcy é primeiro transformado em metionina por adição de um grupo metilo a partir de 5- metiltetrahydrofolato ou betaína. 5- metiltetrahydrofolato é um produto de conversão de ácido fólico para 5,10- metiltetrahydrofolato e finalmente metabolizado a 5-metiltetrahydrofolato por enzima redutase 5,10-metiltetrahydrofolato (MTHFR). Em quase todos os tipos de tecidos, o cofactor de vitamina B12 participa na remetilação com 5-metiltetrahydrofolato, ao passo

que a reação com betaína é restrita ao fígado, e é independente de vitamina B12. Na via transsulfuração, a Hcy é convertido para cistationina por cistationina β -sintase (CBS) e, finalmente, a cisteína com a vitamina B6, tal como um cofactor (SELHUB, 1999).

Os níveis plasmáticos de Hcy variam geralmente entre 5 e 15 mmol / L em adultos saudáveis. De acordo com jejum níveis de homocisteína no plasma, hiperhomocisteinemia (HHcy) pode ser classificada como moderada (15-30 nmol / L), intermediária (31-100 nmol / L) e grave (> 100 nmol / L) (KAUL et al., 2006). A hiperhomocisteinemia se origina a partir de um desvio no metabolismo da metionina, homocisteína, incluindo distúrbios de enzimas, deficiências de vitaminas e outros fatores (KAUL et al., 2006).

A hiperhomocisteinemia moderada (15-30 nmol / L) geralmente reflete via prejudicada de remetilação. As causas possíveis incluem deficiência de ácido fólico, vitamina B12 ou disfunção no gene *MTHFR* (ZHOU et al., 2014).

Mesmo que a Hiperhomocisteinemia (HHcy) tenha sido consistentemente associada a uma gama de doenças cardiovasculares independentes de outros fatores de risco, as razões exatas para a associação dos níveis circulantes mais elevados de homocisteinemia com as doenças cardiovasculares são controversos (MEI et al., 2010). Ainda não está claro se a própria Hcy é um fator casual ou apenas um marcador metabólico indireto de alguns dos processos bioquímicos que ocorrem em doenças cardiovasculares (BRATTSTROM; WILCKEN, 2000; LENTZ, 2005).

No sistema de reciclagem da metionina, HAS hidrolisa a Hcy e adenosina. Esta reação é reversível, assim, elevado nível de homocisteína pode induzir a síntese de HAS. O aumento da HAS pode, através de um feedback negativo, inibir metiltransferase SAM-dependentes, como DNMTs. DNMTs irão mediar a metilação de DNA por transferência de grupos metilo da SAM para resíduos de citosina no contexto de um dinucleótido CpG. Assim, a disfunção das vias metabólicas de Hcy podem resultar em hipometilação de DNA. Existem evidências crescentes de que indicam que HHcy pode estar associada com níveis de metilação de DNA in vivo (ZHOU et al., 2014).

A disponibilidade de SAM pode ser diminuída em algumas circunstâncias por disponibilidade insuficiente de ácido fólico, vitamina B 12, vitamina B 6, vitamina B 2, colina, betaína e metionina, tanto devido ao baixo consumo e vulnerabilidades genéticas individuais (KIM et al., 2008).

2.2. SOBREPESO E OBESIDADE

Em 2013, a American Medical Association reconheceu a obesidade como uma doença (KYLE et al., 2016) e em 2015, a Declaração de Nagoya identificou a "doença da obesidade" como um estado patológico que requer uma intervenção clínica. Isto foi seguido em curto prazo por uma série de outras organizações profissionais de saúde que reconhecem a obesidade como um processo de doença, incluindo a Associação Americana de Endocrinologistas Clínicos, Academia Americana de Médicos de Família, American College of Cardiology, American College of Surgeons, Sociedade Americana para a Medicina Reprodutiva, Associação Americana de Urologia, Sociedade Endócrina, Sociedade da Obesidade, Sociedade para Angiografia Cardiovascular e Intervenções e pela Organização Mundial de Saúde, a Food and Drug Administration e os Institutos Nacionais de Saúde (GARVEY et al., 2016).

A Federação Mundial de Obesidade é uma organização que representa as sociedades profissionais de muitos países que se concentram em pesquisas, educação e cuidados de saúde para pessoas com obesidade. A Federação Mundial da Obesidade encomendou esta declaração para argumentar sobre a posição de que "a obesidade é um processo crônico da doença recorrente" e para servir como base para sua posição sobre esta questão (BRAY et al., 2017).

O status de pandemia de alto índice de massa corporal (IMC) (obesidade) foi atribuído ao aumento de um ambiente "obesogênico", que inclina o equilíbrio entre a ingestão de energia e gasto de energia, impulsionando os indivíduos para o aumento da adiposidade ao longo de linhas ambientalmente determinadas. Apesar disso, é importante perceber que, dentro do mesmo ambiente, nem todos os indivíduos tornam-se com excesso de peso ou desenvolvem obesidade (GONZÁLEZ-MUNIESA et al., 2017).

Concentrando-se no IMC especificamente, embora seja absolutamente claro que existem associações fortes e replicáveis entre este fator de risco e saúde, a interpretação das associações existentes não é simples. Na realidade, uma complexa interação de fatores genéticos e ambientais devem ser considerados, a fim de melhor compreender o IMC como um proxy fenotípica para a adiposidade, por que ela parece ter um grande impacto na saúde, e como esse impacto pode ser atenuado no futuro (CORBIN; TIMPSON, 2016).

A obesidade é um fator de risco que contribui para problemas de saúde graves, incluindo hipertensão, doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2 e câncer. Os fatores clínicos e ambientes infantis influenciam o risco de obesidade mais tarde na vida.

Os fatores ambientais conhecidos por aumentar o risco de obesidade incluem, entre outros, o alto índice de massa corporal (IMC), obesidade dos pais, tabagismo materno, sono insuficiente crônico durante a infância e classe socioeconômica baixa. O agrupamento familiar de obesidade é devido a ambos os fatores genéticos e ambientais compartilhados (SEYEDNASROLLAH et al., 2017).

A obesidade é muitas vezes definida como sendo, o resultado de baixa atividade física (um estilo de vida sedentário), o consumo excessivo de alimentos de alto rendimento energético acima das necessidades do indivíduo, a microbiota intestinal, os disruptores endócrinos (isto é, produtos químicos que interferem na regulação endócrina), fatores reprodutivos (como maior fertilidade entre pessoas com maior adiposidade) e acasalamento assortivo (isto é, acasalamento entre indivíduos com fenótipos similares), drogas, efeitos intergeracionais intrauterinos e epigenéticos (GONZÁLEZ-MUNIESA et al., 2017). No entanto, na realidade, a etiologia da obesidade é mais complexa (SELLAYAH et al., 2014; VANVLIET-OSTAPTCHOUK et al., 2012).

De fato, circunstâncias como o status socioeconômico, o ambiente e os comportamentos pessoais e as interações genótipo-fenotípico devem ser levadas em consideração para entender a obesidade, pois todos esses fatores afetam a ingestão de alimentos, o turnover dos nutrientes, a termogênese, a utilização lipídica de ácidos graxos. O controle do peso corporal e a composição deve considerar a ingestão e o gasto de energia e a deposição de gordura, que estão interligados e sob uma regulação integral pelos sistemas neural e endócrino, onde diferentes neuropeptídeos e hormonas participam (BHUPATHIRAJU; HU, 2016).

Para determinar se e em que medida alguém é obeso, diferentes métodos foram projetados e desenvolvidos, incluindo avaliação baseada em antropometria, análise de impedância bioelétrica, densitometria e métodos baseados em imagens (HEYMSFIELD et al., 2015; SEABOLT et al., 2015).

Mesmo que o índice de massa corporal (IMC) seja uma ferramenta imprecisa, é o mais comumente usado (JAVED et al., 2015). O IMC calcula grosseiramente a adiposidade e identifica o excesso de peso e a obesidade com base no peso do indivíduo expressado em quilogramas (kg) e dividido pela altura quadrada em metros (m²). A classificação da OMS que utiliza IMC define a desnutrição como $<18,5 \text{ kg} / \text{m}^2$, peso normal como $18,5\text{-}24,9 \text{ kg} / \text{m}^2$, sobrepeso como $25\text{-}29,9 \text{ kg} / \text{m}^2$, obesidade como $\geq 30 \text{ kg} / \text{m}^2$ e $\geq 40 \text{ kg} / \text{m}^2$ é considerada extrema obesidade (DESPRES, 2012).

O IMC pode ser complementado pela medição da circunferência da cintura para discriminar a obesidade subcutânea e a obesidade visceral (SAHAKYAN et al., 2015). Os baixos valores de gordura do quadril (ajustada para a altura ou a circunferência da cintura) pode proteger contra doenças, a proporção das circunferências da cintura para o quadril e a relação cintura para altura também foram propostas para refinar a avaliação do risco. No entanto, por razões práticas, comparabilidade e facilidade para medir peso e altura, o IMC ainda prevalece como o indicador mais usado de adiposidade em todo o mundo.

Atualmente, 39% da população mundial é obeso ou com excesso de peso, apesar de décadas de esforços para retardar o progresso da epidemia (WHO, 2015). Esta prevalência traduz-se em um custo global de saúde equivalente a 2,8% do produto interno bruto mundial, ou aproximadamente US \$ 2 trilhões (DOBBS et al., 2014). A obesidade já foi considerada um problema de países economicamente desenvolvidos, mas o número de pessoas com sobrepeso e obesidade agora está aumentando dramaticamente nos países de baixa e média renda a uma taxa nunca antes vista (VANVLIET-OSTAPTCHOUK et al., 2012).

Se as tendências recentes continuem inalteradas, até 2030, os números absolutos poderiam ascender a 2,16 bilhões de sobrepeso e 1,12 bilhão de indivíduos obesos, ou 38% e 20% da população adulta mundial, respectivamente (KELLY et al., 2008).

Para travar a epidemia, as estratégias de tratamento individualizadas, como modificações de estilo de vida de precisão, devem ser complementadas com abordagens e soluções mais amplas, incluindo prevenção.

Recentemente, vários países, como os Estados Unidos e o Reino Unido, iniciaram linhas de pesquisa nesta área. A pesquisa envolverá uma análise do genótipo de > 1 milhão de pessoas, o que será comparado com seus fenótipos. Além disso, estratégias de saúde pública foram implementadas, como tributação para reduzir gorduras não saudáveis e consumo de açúcar adicionado, e abordagens de nutrição personalizada (CORNELSEN et al., 2015).

Vários agentes modificam esses processos regulatórios: fatores ambientais (por exemplo, falta de sono ou trabalho por turnos e temperaturas ambiente), qualidade geral da dieta, nível de atividade física, microbiota intestinal, disruptores endócrinos (isto é, produtos químicos que interferem com a regulação endócrina), fatores reprodutivos (como maior fertilidade entre pessoas com maior adiposidade e acasalamento assortivo (ou seja, acasalamento entre indivíduos com fenótipos similares)), drogas e efeitos intergeracionais intrauterinos e epigenéticos (GONZÁLEZ-MUNIESA et al., 2017). No entanto, 40-70%

das diferenças interindividuais no risco de obesidade na população em geral são explicadas por genética e é de grande interesse para futuras estratégias de intervenção para desvendar fatores genéticos e vias biológicas relacionadas envolvidas na obesidade (BLAW et al.,2017).

2.2.1. Genética e Epigenética no contexto da Obesidade

A obesidade humana, geralmente surge dos efeitos combinados das interações entre genes múltiplos, fatores ambientais e comportamento, e esta etiologia complexa torna o manejo e a prevenção da obesidade humana especialmente desafiadora. Existe uma base genética para a obesidade que provou ser uma tarefa ardua. Os métodos epidemiológicos genéticos para a descoberta genética de traços complexos, como a obesidade, podem ser divididos em duas classes amplas: abordagens baseadas em hipóteses (gene candidato ou via biológica) e abordagens sem hipótese (vínculo genoma-amplo e associação genômica - GWAS), essas análises em GWAS são responsáveis por avaliar a associação de milhões de variantes genéticas sem uma hipótese prévia (RAO et al., 2014).

A identificação de genes que determinam a suscetibilidade à obesidade pode fornecer informações sobre os mecanismos fisiopatológicos subjacentes à regulação do peso corporal e à distribuição de gordura, o que, por sua vez, pode levar a novas abordagens para tratamento e prevenção (GONZÁLEZ-MUNIESA et al.,2017).

A pesquisa sobre obesidade monogênica revelou a biologia da obesidade na população em geral. O mapeamento molecular de mutações que causaram obesidade monogênica em camundongos foi uma das primeiras estratégias para pesquisar genes que controlam o peso corporal. Os resultados proeminentes desta abordagem incluem genes que codificam leptina (*LEP*) e seu receptor (*LEPR*), o receptor de melanocortina 4 (*MC4R*) e pró-opiomelanocortina (*POMC*), entre outros; Esses genes afetam o peso corporal através de caminhos no sistema nervoso central (LEVIAN et al.,2014).

Estudos de associação em grande escala em todo o genoma (GWAS) que avaliam a associação de milhões de variantes genéticas comuns sem uma hipótese prévia sobre seu papel presumido identificaram > 300 loci genéticos para traços de obesidade. O primeiro grande sucesso do GWAS foi a descoberta do locus F7978,79. Um conjunto de variantes não codificantes comuns em FTO mostrou uma associação altamente significativa com o risco de obesidade (FRAYLING et al.,2007).

A biologia que está subjacente a esta associação está sendo lentamente resolvida; O locus FTO pode regular a expressão do *RPGRIPL* proximal ou do *IRX3-IRX5* distante para influenciar o peso corporal, regulando o apetite, a termogênese, o adipócito e os mecanismos epigenéticos relacionados à obesidade (MILAGRO et al.,2016). GWAS adicionais identificaram loci genéticos associados a traços de adiposidade, IMC e relação cintura-quadril (LOCKE et al.,2015; WINKLER et al.,2015).

A evidência do papel da epigenética na obesidade vem principalmente de modelos animais (LOCHE; OZANNE, 2016) e apenas ocasionalmente de estudos em seres humanos, embora 600 artigos já tenham sido publicados nesta área. Por exemplo, os filhos nascidos de mulheres que ficaram famintos durante a primeira metade da gravidez durante a fome holandesa estavam em um risco significativamente maior de desenvolver obesidade do que indivíduos comparáveis; Isto foi posteriormente relacionado a modificações epigenéticas (RAVELLI et al.,1976; HEIJMANS et al., 2008). Este estudo intergeracional sugere que a privação nutricional de gestantes pode ter efeitos não genéticos duradouros sobre o peso corporal da próxima geração..

Dois outros estudos epigenéticos em larga escala, que envolvem 10 mil e 7,800 indivíduos, respectivamente, identificaram um grande número de loci de metilação do DNA associadas ao IMC sendo 187 no primeiro e 83 no segundo estudo (MENDELSON et al., 2017).

A exposição materna a vários outros produtos químicos (os chamados obesogênicos) tem sido associada ao aumento do IMC na prole, sugerindo ainda que a obesidade está sendo programada pré-natal ou na primeira infância e a interrupção da regulação epigenética normal que altera a expressão de genes-chave É provável que esteja envolvido nas vias adipogênicas (JANESICK; BLUMBERG, 2012).

No entanto, nossa compreensão de como a influência ambiental nas marcas epigenéticas pode levar à obesidade permanece bastante rudimentar. Por exemplo, o gene FTO codifica para uma enzima que é capaz de remover grupos de metilo do DNA (GERKEN et al.,2007) e a exposição a longo prazo a dieta rica em gordura pode diminuir a metilação do gene do receptor de melanocortina-4 (MC4R) (WIDIKER et al.,2010).

A Obesidade induzida por dieta rica em gordura pode modificar os padrões de metilação da leptina (MILAGRO et al., 2009). A expressão do gene $PPAR\gamma$, um regulador chave da diferenciação de adipócitos, foi reduzida devido à metilação do DNA de seu promotor em adipócitos de tecido adiposo visceral em mamíferos (FUJIKI et al., 2009).

Vários outros genes envolvidos na adiposidade têm promotores que parecem ser alvos epigenéticos em relação à obesidade (genes epi-obesogênicos). Um dos primeiros estudos de metilação em todo o genoma revelou aumento dos níveis de metilação em um site de CpG (gene *UBASH3A*) e níveis de metilação reduzidos em um site de CpG (gene *TRIM3*) em indivíduos obesos em comparação com controles, fornecendo evidências de que a obesidade está associada a alterações epigenéticas (WANG; LUK, 2010).

Embora coletivamente, esses estudos poderiam indicar que as marcas epigenéticas levam à obesidade, não é realmente claro se eles predizem ou precedem a obesidade (FRANKS; LING, 2010). As diferenças genéticas entre os indivíduos também podem influenciar a regulação epigenética e as variantes genéticas podem explicar a variância específica do locus em estados epigenéticos. Nos seres humanos, verificou-se que 10% dos SNPs comuns estão localizados em regiões com diferenças na propensão para a metilação do DNA local entre os dois alelos. Com isso em mente, é possível que a interação da genética e da epigenética possa estar subjacente ao estabelecimento de doenças, como a obesidade.

No entanto, a medida em que a sequência de DNA determina mudanças epigenéticas em loci específicos e subseqüentemente leva à obesidade é mal compreendida. Avaliar a contribuição relativa de fatores genéticos e ambientais para o estabelecimento do epigenoma e elucidar a relação causal entre epigenética e obesidade constituem grandes desafios, dada a inter-relação complexa desses determinantes.

2.3. LIPÍDEOS

A gordura é a fonte mais concentrada de energia na dieta, proporcionando 9 kcal / g. Em adição ao seu valor como uma fonte energética, moléculas lipídicas são componentes cruciais das células estruturais básicas, constituem a maioria das lojas de tecido adiposo, atuam no transporte de vitaminas lipossolúveis (A, D, E, e K) e são precursores para a síntese de hormônios e mensageiros intracelular (WOTJALA et al., 2017).

Os lipídeos e seus derivados são os principais componentes do corpo e estão envolvidos em muitas funções diferentes, além de serem essenciais para a manutenção da boa saúde, assim como todos os macros e micronutrientes nas devidas proporções, desempenhando diversas funções biológicas, como constituintes de membranas, isolantes

térmicos (VAN MEER et al., 2008) e reserva de energia, especialmente durante períodos de demanda metabólica elevada.

Eles podem ser classificados de acordo com o tamanho de sua cadeia de carbono, nível de saturação e forma, sendo tidos, de maneira geral como simples, compostos e derivados (TIRAPEGUI, 2005).

Os simples são formados basicamente por triglicerídeos, estruturas lipídicas predominantes no organismo, mais especificamente nas reservas corporais que estabelecem o tecido adiposo. Os lipídeos compostos constituem em uma molécula de triglicerídeos combinada com outro elemento químico, correspondendo cerca de 10% da gordura corporal (BIESEK et al., 2005), sendo constituídos principalmente por glicolipídeos, fosfoglicerídeos e lipoproteínas.

Os lipídeos derivados são formados por substâncias provenientes de lipídeos simples e compostos, sendo o colesterol o mais conhecido deles, que serve de base para todos compostos esteróides do organismo, como sais biliares, vitamina D, hormônios sexuais e adrenocorticais, além de estar presente nas membranas celulares (MANORE; TOMPSON, 2000).

Os lipídeos, a mais abundante fonte de energia para o organismo, são mobilizados do tecido adiposo intramuscular, das lipoproteínas séricas, dos lipídeos intramusculares e da ingestão calórica. A quebra dos lipídeos do tecido adiposo ou intramuscular em ácidos graxos livres (AGLs) e glicerol ocorre por um processo denominado lipólise, o qual é iniciado no trato gastrointestinal, garantindo que os lipídeos sejam bem absorvidos (ZECHNER et al., 2012)

Esse processo é representado por uma sequência de reações estimuladas pela secreção do hormônio lipase sensível (HLS), que é ativado pela fosforilação via adenosina monofosfato cíclica (AMPC), dependente da enzima proteína quinase, produzida nas células do tecido adiposo quando a epinefrina se liga aos receptores de membrana celular e ativa a adenil ciclase. Após ativação, o HLS metaboliza o lipídeo a uma molécula de monoglicerídeo que em um processo final, sofre a ação da enzima monoglicerídeo lipase (MGL), resultando, ao final da lipólise em três moléculas de ácidos graxos livres (AGLs) e uma molécula de glicerol (BIESEK et al., 2005).

A mobilização dos AGL a partir do tecido adiposo depende da taxa de lipólise, da capacidade de transporte dos AG pelo plasma e da taxa de reesterificação do plasma pelo adipócito. Tal taxa se mensura pela velocidade de liberação dos ácidos graxos livres ou

glicerol, que representa o equilíbrio entre a taxa de lipólise do tecido adiposo e a taxa de recatção e reesterificação dos AGL (MAUGGHAN et al., 2000).

E quando, a ingestão de gordura ultrapassa a necessidade metabólica do corpo, o excesso de gordura se acumula como triglicéridos no tecido adiposo, esse acúmulo de gordura prolongado sobrecarrega o armazenamento do tecido adiposo, eventualmente, levará a um transbordamento de gordura, que conduz a níveis aumentados de lipídios na circulação, sob a forma de lipoproteína de baixa densidade (LDL), e acumulação hepática. É esse excesso de lipídios que decorre a sua fração gorda responsáveis pelo fenômeno da lipotoxicidade (WOTJALA et al., 2017).

2.3.1. Perfil de metilação do DNA em genes relacionados ao consumo de lipídeos e doenças crônicas não transmissíveis

Dadas as implicações médicas e de saúde pública, alguns estudos têm examinado o potencial da herança epigenética no risco metabólico nutricional em populações humanas (HEARD; MARTIENSSEN, 2014).

E, pouco se conhece sobre a influência do metabolismo dos nutrientes no controle epigenético. Porém, sabe-se que genes envolvidos no metabolismo podem contribuir para diferenças entre os indivíduos em relação às necessidades de nutrientes e susceptibilidade à doença (MILAGRO et al., 2009).

Foi proposto, por Hales;Barker, (2013) que as alterações na (dieta rica em gordura ou de baixa proteína) dieta paterna ou então uma história prévia de exposição intra-uterina a restrição calórica materna pode resultar em aumento do risco metabólico na prole (também conhecido como teoria de Barker. As condições nutricionais durante o desenvolvimento uterino pode ter efeitos mais tarde na vida, e influenciar a ocorrência de alterações no metabolismo e doenças durante a fase adulta.

Quanto aos tipos de gordura o destaque é para o ômega -3, de acordo com HUANG et al., (2011), em sua meta-análise concluiu que o alto consumo (acima de 9% da caloria total), desta gordura, foi associado com uma diminuição significativa na homocisteína plasmática. Além disso, o ômega-3 tem sido relacionado por regular positivamente a expressão de genes envolvidos na via de metabolismo de um carbono aumentando potencialmente a remetilação de homocisteína a metionina (HUANG et al., 2011).

Nove estudos, até o presente momento, foram encontrados na literatura, que investigaram a relação entre a metilação do DNA e a ingestão de gordura em seres

humanos, mas os ensaios de metilação em tais estudos limitaram-se apenas há alguns genes importantes.

No primeiro estudo realizado por HOLLOWAY et al., (2009), foi com o gene *NCOA1*, sendo estes um dos genes mais significativo encontrado em todas as proporções de ácidos graxos, e está envolvido no mecanismo de regulação de genes por proliferadores de peroxisoma através de PPARα, um gene mestre, cuja regulação é alterada na obesidade.

No ano de 2010, Lomba et al., não encontraram nenhuma correlação significativa entre uma dieta rica em gordura e sacarose com metilação dos genes hidroxiacil-coenzima A desidrogenase (HADH) e glucoquinase (GCK). Ainda no mesmo ano, Brons et al., descobriram que uma dieta rica em gordura aumentou a metilação do DNA, no promotor *PPARGC1A* (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha*), no músculo esquelético de homens, jovens e saudáveis de uma forma reversível.

Outro artigo, relataram falta de correlação entre quatro dietas enriquecidas, com diferentes tipos de gordura, e os níveis de metilação dos genes leptina (*LEP*), a leptina receptor (*LEPR*), e pró-opiomelanocortina (*POMC*) (FAN et al., 2011).

Em seguida, Jacobsen et al., (2012), relataram, pela primeira vez, que a curto prazo dieta rica em gordura, introduz mudanças de metilação do DNA em larga escala no genoma do músculo esquelético humano, e concluíram que essas mudanças foram apenas parcialmente revertida após 6-8 semanas sendo mudanças amplas, enquanto modestas em magnitude, destaca a plasticidade e reversibilidade dos níveis de metilação do DNA em resposta a intervenções dietéticas em seres humanos.

Em outro estudo, o gene regulador circadiano (*CLOCK*) foi negativamente associado com a ingestão dos ácidos graxos monoinsaturados, mas positivamente associado com a ingestão dos poli-insaturados (MILAGRO et al., 2012). HERMSDORFF et al., (2013) mostraram que a maior ingestão de ômega -6 (poliinsaturado) foi associada a menor metilação no promotor do fator de necrose tumoral-α (TNF).

No estudo realizado por ASLIBEKYAN et al., (2014) de caráter transversal com 185 indivíduos adultos, realizaram uma pesquisa em toda a epigenoma para os sítios de metilação CpG associados com a ingestão de EPA e DHA derivados de marinha, encontrando associação positiva com os genes *ACTA2/FAS* e *CCL17*.

Em 2015, Kurylowicz e Colaboradores encontrou associação onde o gene *ADRB3* (Receptor β3 – adrenérgicos) está envolvido na regulação da lipólise, fornecendo ácidos graxos livres para a termogênese e há evidências indiretas de que este mesmo gene pode participar na regulação do peso corporal em humanos.

O último, também, em 2015 realizado por Voisin et al., teve como participantes a faixa etária de adolescentes, e apenas realizaram relação entre os diversos tipos de ácidos graxos em genes diversos e sugeriram que as alterações específicas na metilação do DNA pode ter um papel importante nos mecanismos envolvidos nas respostas fisiológicas aos diferentes tipos de gordura na dieta, os autores sugeriram ainda, com base em seus resultados, que a qualidade da gordura é susceptível de influenciar a metilação do DNA em escala genômica.

A família de receptores de *PPARGC1A* consiste em fatores de transcrição que regulam genes envolvidos nos processos celulares, tais como a inflamação, β -oxidação, e homeostase da glicose; sendo estes fatores considerados alvos promissores para intervenção farmacológica em doenças crônicas (LUND; ZAINA, 2011). Os vários *PPARGC1A* (α , β , δ , e γ) são componentes essenciais de uma rede de transcrição que impõe marcas epigenética e uma resposta de transcrição apropriado para ligantes e moléculas específicas como fatores cruzados com a sinalização do *PPARGC1A*.

Estes fatores incluem ácidos graxos, mediadores inflamatórios intracelulares, polifenóis, e provavelmente múltiplos fatores dietéticos que afinam a transcrição de genes envolvidos nos processos metabólicos associados com o metabolismo de ácido graxo e inflamação. Por causa dessas relações, a epigenética se tornou um jogador importante no estudo das interações entre genes e dieta, inflamação e meio ambiente (LUND; ZAINA, 2011).

De acordo com, Pfeiffer et al., (2015), mecanismos epigenéticos podem estar envolvidos na regulação do nível de lipídeos e, portanto, podem contribuir para o perfil de risco cardiovascular. Nesse sentido, mudanças dietéticas específicas, tais como a ingestão de óleo de peixe, têm sido associados com a metilação diferencial de 27 locais de CpG específicas em um estudo dos nativos do Alasca Yup'ik (ASLIBEKYAN et al., 2014).

Pheiffer et al., (2014) relataram que mecanismos epigenéticos estão associados com o desenvolvimento de muitas doenças crônicas e devido à sua natureza reversível, pode oferecer uma janela de oportunidade única para reverter o fenótipo destas doenças. Em relação as marcas epigenéticas e as doenças cardiovasculares, FINDEISEN et al., (2013) sugerem que a detecção de alterações de metilação do DNA poderia ser uma ferramenta promissora para predição de risco cardiovascular e diagnóstico.

2.3.2. Consumo de Lipídeos

As gorduras incluem: os ácidos graxos saturados, poli-insaturados e monoinsaturados, suas diferenças estruturais explicam por que eles têm diferentes efeitos biológicos (TVRZICKA et al., 2011). Com base em uma revisão sistemática, a redução da ingestão alimentar dos ácidos graxos saturados (AGS), deve ser feita por meio da modificação dietética.

Reduzir os ácidos graxos, em vez de redução da gordura total, poderia reduzir eventos cardiovasculares em 14% (HOOPER et al., 2016), tal redução é justificada por uma pequena escala de estudos nutricionais em voluntários com síndrome metabólica onde demonstraram que uma dieta enriquecida em gorduras monoinsaturadas melhora a função endotelial pós-prandial e diminuição plasmática do ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1) solúvel, em comparação com uma dieta enriquecida em gorduras saturadas (PEREZ-MARTINEZ et al., 2010), a OMS recomenda uma redução das gorduras saturadas para <10% de energia (en) com a substituição de carboidratos ou gorduras monoinsaturadas, para a prevenção das doenças cardiovasculares (CHANG et al., 2016).

Nos seres humanos, a restrição calórica tem efeitos benéficos sobre o metabolismo, hormônio, mudanças funcionais associadas com o envelhecimento, diminuição de riscos cardiovasculares e câncer (FONTANA et al., 2010). No entanto, não há uma orientação clara sobre qual macronutriente deve substituir parte dos AGS na dieta. Evidências sugerem que a substituição por gorduras insaturadas em vez de carboidratos pode permitir uma maior redução do risco de doenças cardiovasculares (MICHA et al., 2010), em parte por sua capacidade de melhorar o perfil lipídico porém, ainda não existem recomendações específicas sobre quais tipos de gorduras insaturada é ideal por causa de estudos insuficientes (WELCH et al., 2014). De acordo com, Jacobsen et al., (2009), a substituição de ácidos graxos saturados por poliinsaturados pode reduzir o risco de doença cardíaca.

Os ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (PUFA) são ácidos graxos, com comprimento de cadeia de 20 a 24 carbonos, PUFA, como o ácido eicosapentaenóico (EPA; 20: 5n-3), ácido araquidônico (ARA; 20: 4n-6) e ácido docosa-hexaenóico (DHA; 22: 6n-3) são essenciais, uma vez que estes ácidos graxos produzem energia, manter a integridade e a fluidez da membrana celular, fornecer precursores para a síntese de eicosanóides e regulam as expressões genéticas e caminhos de transdução de células (SIMOPOULOS, 1991).

Em humanos, a inclusão na dieta de EPA e DHA reduz o risco de doença cardíaca coronária e mortalidade cardiovascular (GISSI, 1999). O DHA, é um componente importante da membrana celular neuronal e é importante para o desenvolvimento e função

do cérebro (NEURINGER et al., 1988). Em seres humanos, a fonte primária de ingestão dietética do PUFA é através do consumo de peixes marinhos e outros frutos do mar (ARTS et al., 2001).

Particularmente, o ácido eicosapentaenóico (EPA; 20: 5 – ômega -3) e ácido docosa-hexaenóico (DHA, 22: 6 – ômega-3) são os ácidos graxos poliinsaturados (PUFA n-3) que ocorrem no óleo de peixe e têm sido mais amplamente estudado devido aos seus efeitos sobre melhoras na saúde (YASHODHARA et al., 2009). Por exemplo, o consumo de uma dieta saudável global, incluindo peixes gordos, pelo menos, duas vezes por semana é uma recomendação para a redução do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (LICHTENSTEIN et al., 2006). Além disso, o ômega-3 (PUFA), também têm sido propostos para reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias (OLIVER et al., 2010).

As Diretrizes Dietéticas (USDA, 2010), para os americanos recomendam que menos de 10 % das calorias sejam consumidos de gordura saturada, além de destacar que o consumo de menos de 7% de calorias provenientes de gordura saturada pode reduzir ainda mais o risco de doenças cardiovasculares.

Quanto aos ácidos graxos trans (AGT), estes tem efeitos adversos para a saúde (MICHA; MOZAFFARIAN, 2009), são produzidos por hidrogenação de gordura na indústria de processamento de alimentos e têm sido extensivamente ligadas a patologias tais como doenças cardiovasculares, diabetes e obesidade (CHAJÈS et al., 2015). Os efeitos patogênicos de AGT foram atribuídas a alterações bioquímicas no metabolismo do colesterol e alterações estruturais em biomembranas, isto é, um aumento na rigidez da membrana, devido ao rompimento da estrutura ordenada da bicamada lipídica (VENDEL et al., 2013).

As concentrações de AGT em fosfolípidos circulante estão ligados a uma maior inflamação sistêmica (MOZAFFARIAN et al., 2004), morte súbita e doença arterial coronária fatal (LEMAITRE et al., 2006). Porque ligações trans não podem ser sintetizados pelo homem, a exposição aos AGT é só do consumo de dieta, especialmente de alimentos embalados ou preparados que contêm óleos vegetais parcialmente hidrogenados, mas também de carnes ou produtos lácteos de ruminantes (por exemplo, bovinos, ovinos e caprinos) que contêm pequenas quantidades de AGT, no entanto, as concentrações circulantes de AGT são apenas parcialmente correlacionada com a ingestão dietética desses alimentos (MICHA et al., 2010), sugerindo possíveis influências não dietéticas.

No entanto, após o consumo, pouco se sabe sobre o destino metabólico dos AGT ou seus determinantes. Por exemplo, os mecanismos endógenos de incorporação, metabolismo e / ou concorrência com outros ácidos graxos poderia influenciar as concentrações circulantes de AGT (SEBEDIO; CHRISTIE, 2009) e modular ou mediar seu impacto na saúde. Nesse sentido, em 2015, foi aprovado pelo FDA – Food and Drug Administration, o marco inicial da proibição da comercialização de alimentos contendo AGT.

Sabendo que, há cada vez mais evidências de que os lipídeos dietéticos e seus derivados são moduladores dinâmicos de vias de expressão gênica pro- ou anti-inflamatórias, via receptores nucleares envolvidos na regulação de várias funções biológicas, incluindo o metabolismo de lipídeos, a produção de mediadores inflamatórios, e homeostase vascular, isto leva ao conceito de que determinados componentes da dieta podem induzir um fenótipo celular aterosclerótico, pelo menos em parte, causando marcas epigenética que deslocam a ativação diferencial de genes e de repressão. Marcas epigenéticas aberrantes de inflamação podem, posteriormente, resultar em mudança fenotípica (LUND; ZAINA, 2011). Nesse sentido, com base em vários estudos, uma dieta materna com alto teor de gordura saturada estimulou as vias de inflamação na prole em animais (SASAKI et al., 2014; XUE et al., 2014) e em humanos (LEIBOWITZ et al., 2012).

2.3.3. Metabolismo dos lipídeos

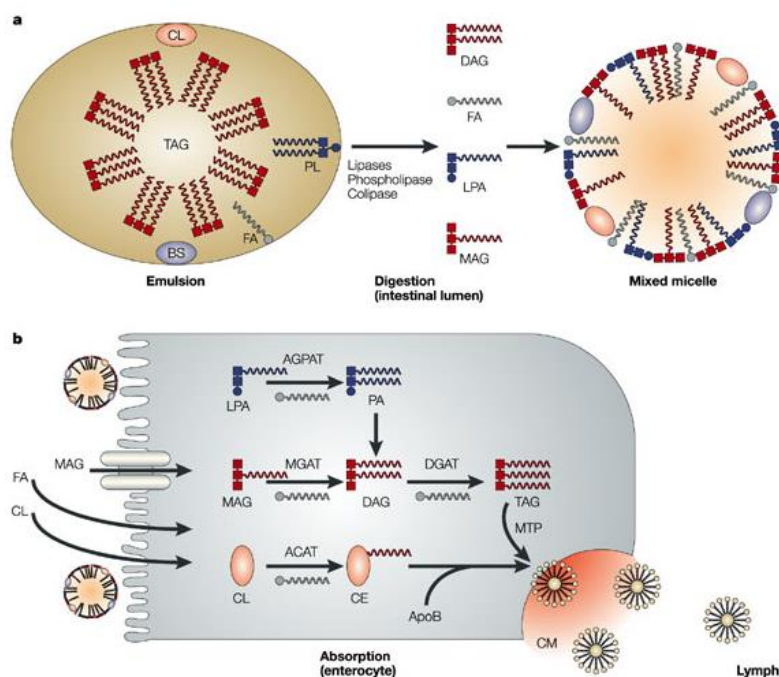
Lipídios e metabolismo das lipoproteínas podem ser vistos como uma via biológica complexa contendo múltiplos passos. A homeostase dos lipídios é alcançada através da ação coordenada de um grande número de fatores nucleares, proteínas de ligação, apolipoproteínas, enzimas e receptores envolvendo centenas de genes. Metabolismo lipídico também está intimamente ligada com o metabolismo energético e é submetido a muitos controles hormonais que são essenciais para a adaptação às condições ambientais e internas (ORDOVAS, 2009).

A digestão dos lipídeos dietéticos começa no estômago, onde os lipídeos são submetidos a digestão parcial pela lipase gástrica e formam grandes glóbulos de gordura com triacilglicerol hidrofóbico (TAG) núcleos rodeados por moléculas polares, incluindo fosfolipídeos (PLS), colesterol (CL), ácidos graxos (AGs) e proteínas ionizados. Os processos digestivos são completados no lúmen intestinal, onde grandes emulsões de glóbulos de gordura são misturados com sais biliares (BS) e suco pancreático de lipídeos

contendo enzimas digestivas para formar uma suspensão aquosa de gotículas de gordura pequenas para maximizar a exposição das lipases pancreáticas para a hidrólise de lipídeos. O Monoacilglicerol (MAG), diacilglicerol (DAG) e AGLs, são liberados por hidrólise lipídica para juntar aos sais biliares, colesterol, ácido lisofosfatídico (LPA) e vitaminas lipossolúveis para formar micelas mistas que proporcionam uma fonte contínua de produtos alimentares digeridos para a absorção nas membranas de borda em escova dos enterócitos (TIRAPEGUI,2005).

Os ácidos graxos e MAG entram nos enterócitos por difusão passiva e são facilitados pelos transportadores, como a proteína intestinal AG-obrigatório (IFABP), CD36 e proteína-4 FA-transporte (FATP4). Eles são então re-esterificados sequencialmente dentro do retículo endoplasmático por aciltransferase MAG (MGAT) e diacilglicerol aciltransferase (DGAT) para formar TAG. Os fosfolípidos da dieta, bem como a bile - principalmente LPA - são acilados pela aciltransferase de 1-acil-glicerol-3-fosfato (AGPAT) para formar o ácido fosfatídico (AF), que também é convertido em TAG. O CL dietético é acilado por acil-CoA: colesterol aciltransferase (ACAT) para ésteres de colesterol (CE) e facilitado pela proteína de transferência de triglicerídeos microsossomal (MTP), TAG junta com CE e apolipoproteína B (ApoB) para formar quilomícrons (QM) que entram em circulação através da linfa.

Figura 4. Digestão dos lipídios



Fonte: Yuguang Shi; Paul Burn, 2004.

Abreviações: FA – Ácidos Graxos.

2.4. GENES

2.4.1. ADRB3

O *ADRB3*, Beta -3 receptor adrenérgicos, é um gene que pode estar associado a dislipidemia e de acordo com GUAY et al., (2014), em seus resultados encontrados com indivíduos adultos homens, sugeriram que as alterações epigenética no locus do gene *ADRB3* podem estar envolvidos no desenvolvimento da obesidade e suas complicações metabólicas associadas. Além de desempenhar um papel importante na regulação da lipólise no tecido adiposo marron e branco de humanos que fornecem ácidos graxos livres para a termogênese e há evidências indiretas de que o *ADRB3* pode participar na regulação do peso corporal em humanos (KURYLOWICZ et al., 2015).

Foi relatado por Anderson et al., (2009) que indivíduos com uma baixa função no *ADRB3* do tecido adiposo (avaliada pela sua atividade lipolítica) tendem a aumentar o seu peso corporal ao longo do tempo, e o contrário também pode ocorrer, ou seja, a medida que a função do receptor *ADRB3* é elevada este parece proteger o ganho de peso. Portanto, foi sugerido que uma função não afetada de *ADRB3* é crucial para a termogênese e lipólise no tecido adiposo (KURYLOWICZ et al., 2015). E ainda, estar na lista de genes que participam do metabolismo de lipídeos (DIAS et al., 2015). Houve ainda, outro estudo que encontrou relação entre o gene *ADRB3*, metilado no sangue, com relação cintura-quadril (GUAY et al., 2014).

Portanto, é necessário confirmar com estudos científicos a associação de genes com o desenvolvimento da obesidade. Principalmente, esses genes que regulam a ingestão de alimentos e tem influência no metabolismo de nutrientes. Por exemplo, o *ADRB3* que responde a noradrenalina e medeia a lipólise em adipócitos (BRETTFELD et al., 2012).

Em um estudo com base em genes candidatos para a inflamação, trombose, tônus vascular e metabolismo lipídico em uma coorte prospectiva de chineses com diabetes tipo 2, as variantes *SCYA11* (eotaxina), *PON2* (paroxonase 2) e *ADRB3* (receptor β 3-adrenérgicos) foram independentemente associados a eventos cardíacos incluindo insuficiência cardíaca (WANG; LUK, 2010).

2.4.2. Leptina (Lep)

A leptina é o produto do gene *ob* que foi identificado pela primeira vez como um hormônio secretado pelo tecido adiposo branco que envia o sinal de saciedade para o cérebro e seus níveis em circulação estão correlacionados com o grau de adiposidade (ZHANG et al., 1994). Estudos de defeitos da via de sinalização da leptina têm elucidados mecanismos para a obesidade em modelos animais. Uma deficiência de leptina em ratos e indivíduos humanos está associada à obesidade maciça e ao hipogonadismo (ZHANG et al., 1994; MONTAGUE et al., 1997; LICINIO et al., 2004). Demonstrou-se que a administração exógena crônica de leptina ou expressão excessiva em camundongos transgênicos reduz a gordura corporal reduzindo a ingestão de alimentos e aumentando a atividade catabólica do sistema nervoso simpático (CONSIDINE, 2005).

Estudos têm demonstrado que o *LEP* é um hormônio proteico, principalmente sintetizado por tecido adiposo branco que atua através de um receptor específico e está diretamente relacionado à quantidade de tecido adiposo. Os indivíduos obesos têm hiperleptinemia e resistência à leptina, que é causada por alterações nos receptores de leptina (LEPRs), bem como na sua isoforma ou em deficiências no sistema de transporte de sangue-cérebro (COLLARES et al., 2014).

Atua no controle da ingestão de alimentos através de receptores específicos (LEPR) localizados no hipotálamo e nos órgãos periféricos como o fígado. Este hormônio atua sobre o sistema nervoso central, promovendo redução da ingestão de alimentos e gastos com energia. Em um estudo sobre o sangue de indivíduos obesos e magros, Pardina et al. (2010) observaram maiores níveis de *LEP* em indivíduos com obesidade mórbida em comparação com indivíduos magros. Os autores também relataram que os níveis de *LEP* foram reduzidos um ano após a cirurgia bariátrica, tornando-se idênticos aos do grupo controle. Esteghamati et al. (2011) também observou que os indivíduos obesos com síndrome metabólica têm níveis mais elevados de leptina, sugerindo que a hiperleptinemia está associada a essa síndrome (COLLARES et al., 2014).

Vários estudos mostraram que a obesidade extrema dos ratos (*ob / ob*) foi atribuída a mutações no gene que codifica a leptina, que é uma proteína segregada com adipócitos específicos com efeitos profundos sobre o consumo de energia. Estudos clínicos de pesquisa de mutações genéticas de leptina demonstraram obesidade grave na deficiência congênita de leptina, o que é revertido com o tratamento com leptina. Essas descobertas

sustentam a conclusão de que a leptina é um importante regulador do equilíbrio energético em seres humanos (LICINIO et al.,2007).

A leptina é o gene que mais chama atenção pois, o mesmo já foi relatado que suas concentrações plasmáticas são aumentadas em indivíduos obesos (HJORT et al.,2017; HOUDE et al.,2015), regula a transcrição dos genes que codificam o *POMC*. Independentemente da diminuição do consumo de alimentos e do peso corporal, a sinalização de leptina através de neurônios POMC hipotalâmicos diminui potencialmente a glicemia e aumenta a atividade locomotora, prevenindo assim a hiperglicemia e a atividade física normalizadora de camundongos *Leprdb / db* deficiente em receptores leptídeos obesos, gravemente diabéticos e hipoativos (SILVA et al.,2016).

As mutações dos genes *Lep*, receptor de leptina, *POMC* e *MC4-R* iduzem a obesidade severa em roedores e em seres humanos, ressaltando a importância da sinalização central de leptina-melanocortina para a regulação do balanço energético (PERFILYEV et al.,2017). Além disso, a obesidade humana comum é frequentemente associada à resistência à leptina caracterizada por uma incapacidade de leptina para diminuir o peso corporal.

Um estudo relatou que a metilação do DNA do promotor de leptina variou com a obesidade. No tecido adiposo de ratos obesos induzidos por dieta, a fração metilada do promotor de leptina foi diminuída alimentando uma dieta rica em gordura no estágio inicial; No entanto, aumentou após 12 semanas de alimentar uma dieta rica em gordura em comparação com o controle e ratos ricos em gordura (SHEN et al.,2014). Em amostras de sangue periférico de adolescentes obesos humanos, a metilação do promotor *LEP* mostrou-se associada negativamente ao IMC (GARCIA-CARDONA et al.,2014). Além disso, pacientes obesos que responderam a um tratamento com baixa caloria com uma perda de peso superior a 5% apresentaram menores níveis de metilação de leptina no tecido adiposo subcutâneo do que aqueles que perderam menos de 5% do peso corporal inicial (CORDERO et al.,2011).

Em geral, a revisão atual mostra que a resistência à leptina é um fator relevante na patogênese da obesidade e que, dentre os mecanismos moleculares envolvidos, as modificações epigenéticas podem contribuir para a expressão da leptina e distúrbios de sinalização na obesidade. Considerando que as marcas epigenéticas são reversíveis e modificáveis pelo ambiente e podem estar envolvidas na resistência à leptina associada à obesidade, as marcas epigenéticas no gene da leptina e os genes nas suas vias de sinalização podem constituir um alvo terapêutico para o desenho de sensibilizadores de

leptina para contrariar a leptina Resistência comumente observada na obesidade. Os nutrientes e compostos alimentares que demonstraram modificar ligeiramente os padrões epigenéticos de diferentes linhas e tecidos celulares poderiam ajudar a induzir a sensibilidade à leptina e a melhorar o fenótipo obesogênico (CRUJEIRAS et al.,2015).

Portanto, a compreensão da influência do microambiente relacionado à obesidade na regulação epigenética do apetite e na maquinaria da homeostase energética fornecerá novas ferramentas para melhorar o manejo e a prevenção de distúrbios metabólicos. São necessários mais estudos para elucidar se as amostras de células sanguíneas são adequadas para refletir a regulação epigenética da leptina e outros genes relacionados com as vias reguladoras da leptina em estudos humanos.

2.4.3. POMC

O gene *POMC* (Pro-opiomelanocortin) e de acordo com KUHNNEN et al., (2016) o *POMC* representa um bom candidato para investigar os efeitos potenciais das diferenças de metilação e na obesidade / IMC.

O *POMC* é um polipéptido precursor para o hormônio estimulante dos α -melanócitos (α -MSH). α -MSH atua como um agonista para MC3 / 4-Rs de neurônios de sinalização de segunda ordem no P núcleo periventricular para inibir a ingestão de alimentos e aumentar o gasto de energia.

A expressão hipotalâmica de *Pomc* é regulada principalmente pela leptina circulante periférica. Mediada pelo receptor de leptina hipotalâmico, a ligação de leptina aos neurônios de *Pomc* ativa um mecanismo de transdução de sinal que inclui a ativação e a ligação de vários fatores de transcrição [por exemplo, proteína de especificidade 1 (Sp1), factor nuclear κ -cadeia leve de potenciadores de células B ativadas (Nf-kB)] para o promotor *Pomc*. Verificou-se que, em formas comuns de obesidade, animais e seres humanos tornam-se resistentes à leptina, fenômeno associado à redução da regulação da homeostase energética (MARCO et al.,2014).

O *POMC* é relatado na literatura por representar um bom candidato para investigar os efeitos potenciais das diferenças de metilação na expressão gênica e na obesidade / IMC (KÜHNEN et al.,2016) e ainda encontram em seus estudos,com adultos e analise de

metilação no sangue, que a metilação do *POMC* humano está correlacionada com o peso corporal individual.

Windholz et al., (2017), citou como sendo a *Leptina* e *POMC* os genes da obesidade. Um conjunto diferente de neurônios produz a pró-opiomelanocortina (*POMC*) - péptidos de melanocortina derivados, que atuam como fatores de saciedade (HENRY, 2017). Vários são os estudos que correlacionam os genes *lep* e *POMC* em ratos (KLEIN et al., 2017; CIFANI et al., 2015; DESAI et al., 2016), porém são escassos estudos em humanos. Perfilyev et al., (2017) e CRUJEIRAS et al., (2015) sugeriram que a metilação do DNA do gene *POMC* no sangue podem prever a recuperação do peso após a dieta

2.5. PROCESSO INFLAMATÓRIO

A dieta constitui um dos principais fatores ambientais que exerce um efeito crucial sobre o desenvolvimento do sistema imunológico e sua função, e, portanto, influencia grandemente em muitos aspectos da saúde e da doença de risco (JIMÉNEZ-CHILLARÓN et al., 2012).

As tendências internacionais fornecem alguma indicação de que as mudanças ambientais podem afetar a função imunológica, independentemente do fundo genético. Há uma evidência emergente de que os mecanismos que regulam a expressão epigenética do gene durante a diferenciação imune são susceptíveis a estas influências ambientais (PRESCOTT; SAFFERY, 2011).

A inflamação é uma resposta de defesa complexa do sistema imunológico (HIRAHARA et al., 2013). É principalmente mediada e regulada por citocinas inflamatórias. As citocinas pró-inflamatórias estão relacionadas com a melhoria das reações inflamatórias, enquanto as citocinas anti-inflamatórias amortecem a resposta das citocinas pró-inflamatória (MASON; LIBY, 2015)

Na inflamação aguda, a resposta inicial do corpo a um estímulo é conseguida através do aumento da migração de leucócitos e plasma a partir do sangue para as áreas lesadas. Quando a inflamação tem um início lento e persiste durante um longo período de tempo, torna-se crônica. Os sintomas da inflamação crônica não são tão graves como na inflamação aguda, mas a condição é persistente (BAYARSAIHAN, 2011). A inflamação crônica tem sido associada com diferentes doenças, tais como câncer, diabetes, distúrbios cardiovasculares, pulmonares e doenças neurológicas (MASON; LIBY, 2015; PUGLIESE et al., 2015).

Referente ao processo inflamatório é relatado na literatura que a metilação do DNA é importante na regulação de genes inflamatórios. Fatores ambientais, incluindo infecção bacteriana foram mostrados em contribuir para o estado epigenético do genoma (BARROS; OFFENBACHER, 2009).

A metilação do DNA desempenha um papel importante no desenvolvimento fetal. Por exemplo, infecção bacteriana induz a hipermetilação do promotor do gene *Igf2* em ratinhos (BOBETIS et al., 2007). Estudos de microarranjos de expressão em camundongos demonstraram que a infecção materna foi associada a alterações na expressão de genes no desenvolvimento placentário, incluindo vários genes marcados (BOBETIS et al., 2010). Colonização crônica do estômago humano pelo *Helicobacter pylori* (HP) causa inflamação dentro da mucosa gástrica e activa múltiplas vias oncogênicas (DING et al., 2010). HP induz alterações no padrão de metilação do DNA em células epiteliais gástricas (NIWA et al., 2010). Katayama et al., (2009) demonstraram que a metilação do DNA-HP induzida no locus *RUNX3* provoca a perda de expressão em células epiteliais gástricas.

Um fato importante, é conhecer os marcadores pró e anti-inflamatórios, principalmente, na identificação de indivíduos com risco de DCV, sendo os valores de PCR, por exemplo, importantes, para quantificar a eficácia das intervenções e prevenção da DCV (BOEKHOLDT; KASTELEIN, 2010), mas há controversas, por serem utilizados em inúmeras patologias, tais como câncer e doença do pulmão, tornando-os bastante inespecífico, como demonstrou-se na meta-análise realizado por pesquisadores no estudo denominado Emerging Risk Factors Collaboration (2010), ao observarem que os valores de PCR não possuem valor de relevância na predição ou direcionamento de doença coronária ou Acidente Vascular Encefálico (AVE) (WALD; BESTWICK, 2010).

Outro fator, segundo Gormsen et al., (2011); Sanders et al., (2011) é a exposição repetitiva de células endoteliais para as citocinas pró – inflamatórias que podem levar a progressão de doenças crônicas, como as doenças cardiovasculares. Como se relata na literatura que o baixo grau de inflamação crônica está associada com o risco de doenças cardiovascular (KAPTOGE et al., 2010; WANG; NAKAYAMA, 2010; TOUVIER et al., 2013), porém seu papel nesta patologia ainda é incerto (CHATURVEDI et al., 2013).

A contagem de leucócito foi definido como marcador de inflamação sistêmica, considerado como um fator de risco de mortalidade das DCV, em populações japoneses (TAMAKOSHI et al., 2007). Este marcador inflamatório pode ser utilizado, quando não há disponibilidade de realizar a PCR-us, em síndrome metabólica, de forma alternativa,

salientando que a PCR-us se sobrepõe em relação ao leucócito nesta situação, considerando que os valores de leucócitos são bastante utilizados na prática clínica (NORDESTGAARD et al., 2010; ODA; KAWAI, 2010).

Além do mais, observou-se que a contagem de leucócitos e neutrófilos foram positivamente associadas com fatores de riscos cardiovasculares em indivíduos saudáveis da população ocidental e asiática (ODA; KAWAI, 2010). Estudo de base transversal tem observado que a contagem de leucócitos e seus sub-conjuntos (neutrófilos, monócitos, linfócitos, basófilos e eosinófilos) tiveram associações diferenciais com fatores de risco cardiovasculares em japoneses supostamente saudáveis, com idade média de $49,3 \pm 5,75$ anos, logo, a contagem de leucócitos e seus subconjuntos podem ser utilizados, também, para avaliar o risco de DCV.

Cabe ressaltar que, embora o processo inflamatório seja principalmente conhecido pelo seu papel destrutivo, causando consequências maléficas para o organismo, a inflamação tem finalidade fisiológica. Em geral, a resposta inflamatória controlada pode ser benéfica como, por exemplo, na proteção contra a infecção, mas pode tornar-se prejudicial se desregulada, por exemplo, causando choque séptico. Sugere-se que a inflamação desencadeada pelo mau funcionamento dos tecidos, como ocorre nas doenças cardiovasculares, tem como objetivo a restauração da homeostase e a adaptação a este estresse (MEDZHITOV, 2008). Assim, todo estado patológico inflamatório tem uma contrapartida fisiológica.

Outra principal força motriz, além do processo inflamatório, para o aumento dos fatores de risco cardiometabólico ,poderia ser escolhas alimentares pouco saudáveis (SONG et al., 2010), as evidências indicam que o tipo de gordura consumida é mais importante do que a ingestão de gordura total para apoiar metas metabólicas, embora as recomendações específicas para a distribuição de composição de gordura podem variar, as organizações geralmente suportam uma redução no consumo de gorduras saturadas e gorduras trans de hidrogenação industrial para reduzir o risco de doença cardiovascular (EVART et al., 2014). Pois, os níveis de lípidos séricos elevados estão associados a predisposição para um estado inflamatório e outras complicações metabólicas (MANCO, 2011).

2.5.1. Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo resulta de um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e substâncias antioxidantes, culminando em alterações biomoleculares deletérias sobre estruturas celulares tais como DNA, lipídeos e proteínas. Tais alterações podem contribuir para a patogênese de diversos problemas de saúde como, por exemplo, doenças degenerativas, processos inflamatórios e doenças cardiovasculares (PISOSCHI; POP, 2015).

Alguns biomarcadores são utilizados rotineiramente em investigações clínicas para medir o estresse oxidativo, dentre eles o malondialdeído (MDA) e capacidade total de antioxidante (CAT) (KHOUBNASABJAFARI et al., 2016).

O Malondialdeído (MDA) é um produto final da decomposição oxidativa do radical-iniciado de ácidos graxos poli-insaturados; portanto, é frequentemente utilizado como um biomarcador de estresse oxidativo. Os dados clínicos indicam que o tipo MDA epitopos são proeminentes e prevalente e são importantes na doença cardiovascular (CHING-YANG et al., 2014). Assim, esses antígenos são candidatos principais para o uso na caracterização de respostas imunes que são relevantes para a aterosclerose (TSIMIKAS et al., 2011).

O Veterans Affairs Diabetes Trial, um ensaio clínico recente que investigou a associação entre MDA e diabetes mellitus, mostrou que os níveis de MDA e LDL em complexos imunes circulantes podem prever a ocorrência de infarto do miocárdio e eventos cardiovasculares agudas em pacientes com diabetes tipo 2 (LOPES-VIRELLA et al., 2012). No entanto, o mecanismo preciso pelo qual MDA pode estar causando essa citotoxicidade endotelial não é conhecido (CHING-YANG et al., 2014).

A capacidade antioxidante total (CAT) resulta da soma de antioxidantes endógenos e exógenos, fornecendo um panorama completo da capacidade antioxidante. Tornando-se um marcador bioquímico de grande importância quando comparado com parâmetros antioxidantes individual, tendo em vista que os antioxidantes tem ação simultânea sistêmica no combate aos danos oxidativos causados por radicais livres (RANI; MYTHILI, 2014).

O CAT é um dos marcadores do estresse oxidativo mais utilizados para avaliar o equilíbrio radical-antioxidante, a partir da análise de um substrato oxidável como por exemplo plasma, saliva, sêmem, lipídios e sondas fluorescentes, com um oxidante, a fim de se obter um nível máximo de oxidação, seja na ausência ou na presença da amostra antioxidante a ser avaliada. O grau da inibição oxidativa irá definir o quantitativo da

amostra antioxidante que oferece um determinado grau de proteção (FRAGA et al., 2013).

2.5.2. Dieta Antioxidante

O conceito biológico de antioxidante refere-se a qualquer composto que, quando presente a uma concentração mais baixa comparada com a de um substrato oxidável, é capaz de atrasar ou evitar a oxidação do substrato (GODIC et al., 2014). Funções antioxidantes implicam redução estresse oxidativo, mutações de DNA, as transformações malignas, assim como outros parâmetros de danos celulares.

Estudos epidemiológicos mostraram a capacidade dos antioxidantes para conter os efeitos da atividade de espécies reativas de oxigênio (ROS), e diminuir a incidência de câncer e outras doenças degenerativas. No entanto, principalmente a ação de radicais livres sustentado, a capacidade do sistema de defesa contra ROS pode ser sobrecarregado, levando à ocorrência da doença (GODIC et al., 2014).

O consumo de frutas e vegetais tem sido associado com a diminuição da incidência e mortalidade por uma variedade de doenças relacionadas com a obesidade, incluindo diabetes tipo 2 e as doenças cardiovasculares (COOPER et al., 2012; HERMSDORFF et al., 2010), que são condições de estresse oxidativo e inflamação crônica (KIZHAKEKUTTU; WIDLANSKY, 2010). Estas associações têm sido atribuídos ou a uma interação entre micro e macronutrientes, ou aos nutrientes isolados.

Os micronutrientes modulam o sistema imunológico e exercem uma ação protetora ao reduzir a oxidação de LDL-colesterol através da indução de enzimas antioxidantes (BEYDOUN et al., 2011).

Os benefícios relatados pelo consumo de frutas e vegetais na saúde são, em parte, dependente de seu conteúdo de antioxidantes naturais como vitaminas A, C e E, pois, combatem o estresse oxidativo que é um mecanismo subjacente para várias doenças crônicas (NÚÑEZ-CÓRDOBA; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, 2011). Estudos em modelos animais e humanos forneceram evidências sobre as vias pelas quais micronutrientes podem induzir efeitos cardiometabólicos de proteção (HENRIKSEN et al., 2011). Desequilíbrio entre a produção de radicais livres e enzimas antioxidantes causam danos de vários componentes celulares e até mesmo a morte (LANDETE, 2013), e esperar o restabelecimento do equilíbrio redox poderia atenuar o risco de doenças como a diabetes tipo 2 e aterosclerose (RAIN; JAIN, 2011).

No entanto, a suplementação de multivitaminas em estudos randomizados não demonstraram reduzir a morbidade e mortalidade cardiovascular. Considerando-se que altas doses de certas vitaminas podem afetar adversamente as concentrações de lipídios, para tanto, a ingestão natural através de uma dieta saudável tem sido recomendada (LANDETE, 2013).

Nos últimos anos, uma série de estudos estão sendo realizados para entender a influência de diferentes compostos nutricionais (macronutrientes, micronutrientes, fitoquímicos, antioxidantes, etc.) sobre a alteração de marcas epigenéticas e, conseqüentemente, na regulação da expressão gênica e a probabilidade de desenvolver ou prevenir doenças (MARTINEZ et al., 2014). Alguns destes fatores nutricionais são mostrados no Quadro 1.

Quadro 1. Exemplos de fatores nutricionais com efeitos metabólicos benéficos que são regulados pelo mecanismo epigenético.

Fator Nutricional	Desordem Metabólica	Mecanismo Epigenético	Referência
Doadores de Metil			
Betaina	Insulina Resistência e Esteatose hepática	Modificação de Histona e Metilação do DNA	Wang et al., 2010
Colina	Esteatose hepática	Modificação de Histona e Metilação do DNA	Guerrero et al., 2012
Folato	Adiposidade e insulina resistente	Metilação do DNA	Sinclair et al., 2007
Metionina	Insulina resistente e obesidade	Modificação de Histona e Metilação do DNA	Sinclair et al., 2007
Vitamina B-12	Obesidade e insulina resistente	Metilação do DNA	Sinclair et al., 2007
Fitoquímicos			
Curcumina	Obesidade e Inflamação	Acetilação de Histona, Metilação do DNA e microRNA	Shao et al., 2012
Epigallocatequina-3-galato	Obesidade, insulina resistente, Esteatose	Acetilação de Histona e Metilação do DNA	Yun et al., 2010

Fator Nutricional	Desordem Metabólica	Mecanismo Epigenético	Referência
	hepática		
Genisteína	Obesidade	Acetilação de Histona e Metilação do DNA	Dolinoy et al., 2006
Resveratrol	Obesidade e Esteatose hepática	Acetilação de Histona	Bujanda et al., 2008
Sulforaphane	Diferenciação de Adipócito	Acetilação de Histona	Choi et al., 2012
Ácidos graxos			
Butirato e outros ácidos graxos	Insulina resistência e Inflamação	Acetilação de Histona	Gao et al., 2009

Para Jones, (2012) um fator importante para se estudar a metilação do DNA, é poder ser modificada regulamente e ser influenciada por fatores ambientais e externos.

A dieta é um fator muito influente na origem da doença metabólica, e ambos os componentes dietéticos específicos, bem como mudanças de regimes alimentares globais podem afetar os níveis de metilação do DNA (JACOBSEN et al., 2012).

Switzeny et al., (2012) concluíram que uma dieta rica em antioxidantes e vitaminas, especialmente o folato, foi capaz de alterar a metilação do DNA, e compensar lesões epigenéticas induzidas por ROS (espécies reativas de oxigênio), em indivíduos idosos diabéticos tipo 2. Essas lesões dizem respeito à desmetilação ocasionada pelo aumento de ROS como resultado da hiperglicemia crônica. A intervenção resultou em metilação significativamente mais alta em duas particulares regiões promotoras, *MLH1* e *MGMT*, que geram enzimas de reparo do DNA. Os autores consideram que a intervenção nutricional pode ter levado a uma menor carga de ROS e, dessa forma, diminuído os efeitos da desmetilação, a metilação do DNA foi associado com maior consumo de frutas / vegetais (ZHANG et al., 2011).

Ainda referente as vitaminas Van Wijk et al., (2012) sugeriram em seu estudo que o ácido fólico na dieta, pode influenciar o perfil de ácidos graxos, particularmente o ácido docosa-hexaenóico (DHA), um importante ácido graxo do omega-3, por influenciar a síntese de fosfolípidos tais como fosfatidilcolina (FD) e fosfatidiletanolamina (FE).

Alterações epigenéticas tornaram-se mais significativamente associada com o gene-dieta e interações gene-ambiente, resultando em metabolismo alterado de lipídios, inflamação e outros desequilíbrios metabólicos que levam a doenças cardiovasculares e obesidade (ORDOVAS et al., 2011). Fatores nutricionais, como ácido fólico e vitaminas B1, B2 e B12, podem alterar o perfil de metilação do DNA (BERNI CANANI; DI

COSTANZO, 2011), acúmulo de homocisteína no sangue leva a um aumento intracelular de S-adenosilhomocisteína (AdoHcy), que é um potente inibidor da metiltransferase competitiva (INGROSSO; PERNA, 2009).

A administração do folato resulta na redução da homocisteína, mas, infelizmente, a prova de subsequente redução do risco de doença cardiovascular não foi estabelecida e há ainda a sugestão de um efeito nocivo a partir de tratamento com vitamina B combinado com o ácido fólico, vitamina B6 e vitamina B12 (BONAA et al., 2006). Um conceito terapêutico importante é que nutrientes e medicamentos podem ser capazes de reverter os padrões epigenéticos anormais e que programação epigenética, ou reprogramação quando indicado, pode tornar-se mecanismos eficazes que conduzam à melhoria da saúde através da intervenção dietética em pontos específicos de desenvolvimento (HANLEY et al., 2010).

Entre os micronutrientes, o ácido fólico é bem conhecido, como doador de carbono para metilação e síntese de DNA (CLAYCOMBE et al., 2015). Nutrientes anti-inflamatórios tal como o ácido fólico pode ser benéfico na prevenção a resposta inflamatória (KINOSHITA et al., 2012). Estudos in vitro, demonstraram que as condições de deficiência em ácido fólico, aumentou a expressão de mediadores inflamatórios, tais como IL-1, IL-6 e TNF- α nos ratos da linha celular RAW264.7 (KOLB;PETRIE, 2013), em humanos, ainda não foi encontrada, na literatura, se existe essa relação, até o atual momento.

Os componentes dietéticos que aumentam o nível de componentes da via de doadores de metilo incluem ácido fólico, cobalamina (vitamina B12), colina, betaína / trimetilglicina (TMG), e l-metionina. O metabolismo da metionina é regulado pela ingestão de nutrientes de B12, piridoxina (vitamina B6), e riboflavina (vitamina B2) uma vez que estas vitaminas B são co-fatores para hormônios que regulam o metabolismo da metionina (KALHAN; MARCZEWSKI, 2012). Dieta deficiente em doadores de grupos metilo e co-fatores do ciclo da metionina-homocisteína (por exemplo, ácido fólico, metionina, colina, betaína) reduzem a metilação e a regulação da expressão de genes envolvidos na absorção de ácidos graxos livres e na síntese dos triglicérides, promovendo doença do fígado gordo e, presumivelmente, a obesidade (POGRIBNY et al., 2009).

Dietas suplementadas com estas vitaminas irão contribuir para a manutenção ou a criação de marcas de DNA, e consumo elevado de etanol inibe a disponibilidade de vitaminas B6 e B12, interferindo, assim, a produção de SAM e metilação de DNA apropriada, através dos ciclos de folato / metionina (BALLARD et al., 2012).

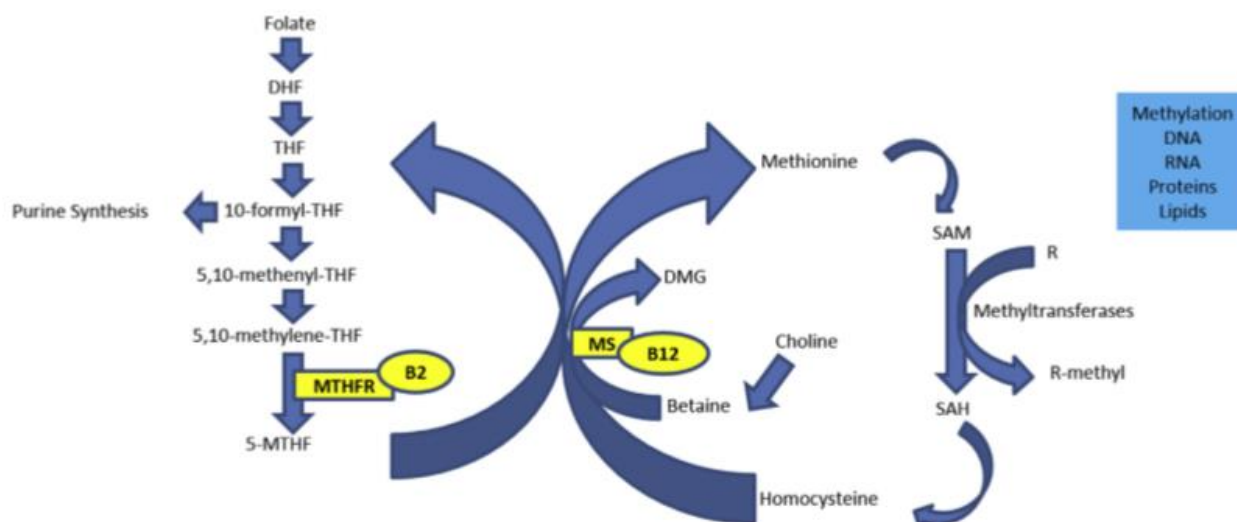
A metionina é a molécula precursora de S-adenosilmetionina (SAM), que ativamente doa um grupo metilo para mais de 60 produtos, incluindo DNA, RNA e histonas (HOLLENBECK, 2012). A colina é oxidado a aldeído betaína por betaína aldeído desidrogenase, que é um niacina (vitamina B3) enzima dependente (HOLLENBECK, 2012). Síntese de betaína / trimetilglicina a partir de colina é um processo irreversível nos seres humanos. O ácido fólico, vitamina B12 e betaína / trimetilglicina são coenzimas importantes para conversão de homocisteína em metionina.

2.6. ÁCIDO FÓLICO

Um dos nutrientes alimentares mais intensamente investigados é o folato, derivado de alimentos ricos em ácido fólico, como vegetais, legumes e grãos integrais. O folato participa tanto da metilação de DNA e de reações de nucleótidos de biossíntese e está envolvido, ainda, na formação de grupos de metilo, que serve como um doador de metilo na metilação de DNA (JENNINGS, 1995) e desempenha também um papel importante na novo síntese de purinas e pirimidinas, os quais são necessários durante a replicação e reparação de DNA (BOTTIGLIERE, 1996).

A via metabolismo do folato leva à síntese de purina e de síntese de 5-metiltetrahydrofolato (5-MTHF) utilizando a enzima 5-metilenotetrahydrofolato redutase (5-MTHFR) e um cofator de vitamina B2 (Fig. 4). A metionina é então produzido com a ajuda de vitamina B12 e metionina sintase (MS). A metionina é convertida em S-adenosilmetionina (SAM), a molécula de doador de metilo. SAM doa um grupo metilo, enquanto enzimas metiltransferase adicionam o grupo metilo no DNA, RNA, proteínas, e lipídeos (SHORTER et al., 2015).

Figura 5. Via de Metabolismo do Folato.



Fonte: SHORTER et al., 2015

O ácido fólico (folato) é metabolizado eventualmente a metionina, a qual é depois convertida em S-adenosilmetionina (SAM), o doador da molécula metil. SAM doa um grupo metilo para DNA, RNA, proteínas e lipídeos. Vitamins B2 e B12 são necessários para este processo. Metileno tetra hidrofolato redutase (MTHFR) é em grande parte responsável por este processo, bem como, a mutações no gene que codifica para esta enzima são ligadas à hiper leve como a homocisteína pode também ser convertida em metionina (SHORTER et al., 2015).

A deficiência de folato pode ocorrer, por diversos medicamentos e o consumo do álcool por interferirem na sua absorção. A má absorção também pode estar relacionada, mais raramente, aos defeitos enzimáticos congênitos. A deficiência de cobalamina acarreta captação reduzida de folato através do intestino e de outras paredes celulares, além de retenção celular reduzida de folato.

Os fármacos podem interferir de diversas formas na absorção, metabolização e utilização do folato no organismo. A principal droga antagonista do folato é o metotrexato, uma droga com propriedades antineoplásicas e imunossupressoras, desempenhando a função de potente inibidor da dihidrofolato redutase. A inibição dessa enzima leva a defeitos de metilação que comprometem a síntese de DNA, acarretando eritropoiese ineficaz. Outros inibidores da dihidrofolato redutase são a pentamidina, o trimetopim, o triantereno e a pirimetamina. Os anticonvulsivantes, tais como fenitoína, fenobarbital e primidona, competem com o folato por receptores intestinais, cerebrais e de outras

superfícies celulares, estando associados ao desenvolvimento de macrocitose em até 40% dos pacientes em uso dessas drogas (VANNUCCHI;MONTEIRO, 2010).

2.6.1. Óleo de Avelã

Por definição, as nozes são frutos secos, com uma semente em que a parede do ovário torna-se difícil na maturidade. Entre os mais populares nozes comestíveis, destacam-se: são amêndoas (*Prunus amigdal*is), avelãs (avelã), nozes (*Juglans regia*), e pistácios (*Pistachia vera*). Outros nozes comestíveis comuns são pinhões (*Pinus pinea*), castanha de caju (*Anacardium occidentale*), nozes (*Carya illinoensis*), macadâmia (*Macadamia integrifolia*) e castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*). A definição dos consumidores também inclui amendoim (*Arachis hypogea*), que são botanicamente amendoim ou legumes, mas são amplamente identificados como parte do grupo de alimentos nozes (BRUFAU et al., 2006; ROS;MATAIX, 2006).

Em países como o Brasil, o consumo destas nozes, são comumente realizadas na forma de petiscos, óleos, sobremesa, sorvete, molhos (DREHER et al., 1996), porém este perfil ultimamente vem sendo alterado e o consumo destas nozes vem aumentando por orientações nutricionais, que relatam seus benefícios a saúde, segundo Widmer et al., (2015), o consumo de nozes é associado a redução de eventos coronarianos e prevenção primária para as doenças cardiovasculares, quando utilizadas como fonte de gordura.

O consumo destes oleos tendem ser mais comum na dieta mediterranea, como o azeite de oliva e noze, com estudos relatando que estas dietas são uma estratégia tão ou mais eficaz para perda de peso (ESPOSITO et al., 2011) porem, estudos associando o consumo de óleo de qvela com perda de peso e processo inflamatório nao foi encontrado.

Quanto ao perfil lipídico as nozes é considerada benéfica, devido ao seu baixo conteúdo em gorduras saturadas e rica em gorduras mono e poli-insaturadas, como observa-se no quadro 2. Quando comparada as outras nozes a avelã se destaca na quantidade de ácido fólico (113mg) sendo a mais rica neste nutriente, está em segundo lugar quanto ao teor de gordura saturada (4,5g) e monoinsaturada (45,7g). Importante ainda, ressaltar que na literatura, até o presente momento não foi relatado estudos com óleo de avelã e epigenética.

Quadro 2. Composição média dos nutrientes (por 100g)

Nozes	Calorias (kJ)	Fat (g)	SFA (g)	MUFA (g)	PUFA (g)	LA (g)	ALA (g)	Fibras (g)	Ác. Fólico (µg)
Amêndoas	2418	50.6	3.9	32.2	12.2	12.2	0.00	8.8	29
Castanha do Brasil (Pará)	2743	66.4	15.1	24.5	20.6	20.5	0.05	8.5	22
Castanha do Brasil	2314	46.4	9.2	27.3	7.8	7.7	0.15	5.9	25
Avelã	2629	60.8	4.5	45.7	7.9	7.8	0.09	10.4	113
Macadâmia	3004	75.8	12.1	58.9	1.5	1.3	0.21	6.0	11
Amendoins	2220	49.2	6.8	24.4	15.6	15.6	0.00	25.8	8.5
Noz pecã	2889	72.0	6.2	40.8	21.6	20.6	1.00	9.2	8.4
Pinhões (seco)	2816	68.4	4.9	18.8	34.1	33.2	0.16	3.7	34
Pistache	2332	44.4	5.4	23.3	13.5	13.2	0.25	9.0	51
Nozes	2738	65.2	6.1	8.9	47.2	38.1	9.08	6.4	98

Abreviações: SFA, ácidos graxos saturado ; MUFA, ácidos graxos monoinsaturados; PUFA, ácidos graxos poliinsaturados; LA, ácido linoleico (ômega 6); ALA, ácido α -linolênico (ômega 3).

Fonte: US Department of Agriculture Nutrient Data Base at: http://www.nal.usda.gov/fnic/cgi-bin/nut_search.pl (Accessado em 12 Ago 2015).

3 ABORDAGEM METODOLÓGICA

3.1. CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

Esta tese está vinculada a uma pesquisa de base populacional intitulado “II Ciclo de Diagnóstico e Intervenção da Situação Alimentar, Nutricional e das Doenças não Transmissíveis mais Prevalentes da População do Município de João Pessoa/PB” (II DISANDNT/PB), financiado pela FAPESQ/MS/CNPQ, aprovado através do edital 001/2013, que foi conduzida no período de maio de 2015 a março de 2016.

3.1.1. Questões ética

O protocolo de pesquisa do projeto mencionado anteriormente, ao qual está vinculado o presente trabalho, foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da UFPB, sob o protocolo nº 0559/2013, segundo as normas éticas para pesquisa envolvendo seres humanos, constantes da Resolução 466, de 12 de dezembro de 2012 do Conselho Nacional da Saúde/Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (APÊNDICE A).

Para o presente estudo de tese, após a identificação do domicílio, das quadras sorteadas localizadas nas zonas leste e oeste do município de João Pessoa, os pesquisadores apresentaram-se aos moradores, relatando o objetivo do estudo e solicitando a participação na pesquisa, sendo respeitadas as diretrizes éticas que regem as pesquisas com seres humanos, portanto, para validar a inclusão dos indivíduos residentes dos domicílios selecionados na pesquisa esses deram o seu consentimento mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE B).

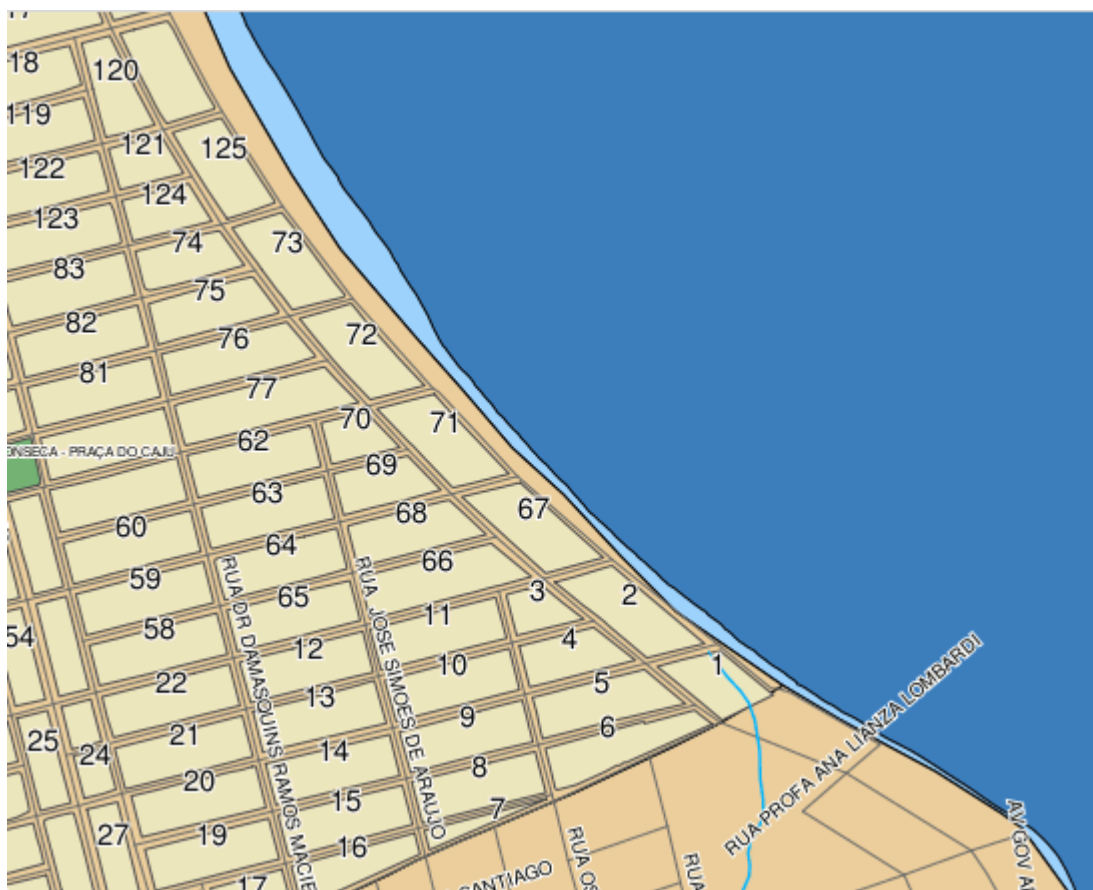
3.1.2. Protocolo Amostral

Para realização da presente tese, estudo inédito de base populacional, representativa dos adultos das zonas Leste e Oeste do município de João Pessoa, realizou-se o cálculo de uma amostragem representativa para o grupo etário de adultos, utilizando informações fornecidas pela prefeitura, como mapa do município, número de quadras por bairro (Figura 6) e dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010).

Para o cálculo da casuística, utilizou-se um procedimento amostral único, composto em níveis. Dada a heterogeneidade da variável "renda" e a relação existente entre renda, prevalência de doenças e nutrição (KAC et al., 2007), utilizou-se uma amostragem estratificada (COCHRAN, 1977) sobre as quadras, em um primeiro nível. Neste,

classificou-se os bairros das Zonas leste e Oeste do município por classe de renda em 4 estratos, segundo informações obtidos junto ao IBGE, (2010). Os critérios utilizados para a estratificação encontram-se no quadro 3 e a estratificação dos bairros por renda com desvio padrão e peso de cada estrato observa-se no quadro 4.

Figura 6. Mapa utilizado no sorteio de quadras, João Pessoa/PB



Fonte: Prefeitura Municipal de João Pessoa-PB/ (foto do bairro de uma das regiões estudada).

Quadro 3. Critérios para estratificação final da amostra

CRITÉRIOS PARA ESTRATIFICAÇÃO (4 ESTRATOS)	ESTRATIFICAÇÃO FINAL (4 ESTRATOS)
Até 2,5 salários mínimos*	Estrato1: bairros de até 2,5 salários mínimos
Até 5 salários mínimos	Estrato2: bairros de 2,5 até 5 salários mínimos
Até 10 salários mínimos	Estrato 3: bairros de 5 até 10 salários mínimos

Maior que 10 salários mínimos	Estrato 4: bairros com mais de 10 salários mínimos
-------------------------------	--

Fonte: II DISANDNT/JP, 05/2015-03/2016. *O valor do salário mínimo foi de R\$510,00, de acordo com o Ministério do Trabalho e Emprego (2010).

Após a estratificação calculou-se o tamanho da amostra com base no cálculo proposto por COCHRAN (1953), para amostras estratificadas, ou seja, o n de quadras representativas por zona utilizando a fórmula abaixo:

$$n = \frac{(\sum_{h=1}^H W_h \sigma_h)^2}{e^2}$$

- $e = B/z$ é a margem de erro aceita, sendo B o erro máximo desejado.
- H é o número de camadas que dividimos a amostra e h é um índice que se refere à um estrato concreto.
- σ_h é o desvio padrão da variável-objeto em cada estrato h.
- W_h é o peso que o estrato tem na amostra (tamanho do estrato a respeito do total da amostra). Se falamos sobre amostra estratificada proporcional, cada W_h é igual a proporção que esta camada representa na população. Se falamos da amostra estratificada ótima, cada W_h se calcula em função da dispersão dentro de cada camada.

Após a obtenção do tamanho da amostra foi calculado o peso de cada estrato, denotado pelo símbolo W_h e distribui a amostra proporcionalmente, conforme quadro 4, onde obteve-se o n de quadras por zona de acordo com seu estrato. Para obter o peso de cada estrato utilizou-se a seguinte fórmula (SILVA et al., 2009):

$$W_h = \frac{Nh}{N}$$

Assim, pode-se calcular a amostra por zona (quadro 5):

$$nh = wh n$$

Quadro 4. Estratificação dos bairros por renda com desvio padrão

Zona	Estrato	Quadras Totais ¹	Bairros	Sh	Wh
LESTE	2	177	2	101.1163	0.0196165
LESTE	3	402	5	14.7309	0.0445528
LESTE	4	1083	9	83.1941	0.1200266
OESTE	1	569	4	92.3594	0.0630611
OESTE	2	577	3	145.5690	0.0639477
OESTE	3	153	1	0.0000	0.0169567

¹ De acordo com o IBGE (2010). Fonte: II DISANDNT/JP, 05/2015-03/2016. Abreviações: Sh: desvio – padrão/ Wh: peso de cada estrato.

Quadro 5. Cálculo da estimativa do tamanho da amostra, por zona

Zona	Quadras Totais	Bairros	Sh	Wh	Número de quadras por Zona
LESTE	177	2	101.1163	0.0196	7
LESTE	402	5	14.7309	0.0445	14
LESTE	1083	9	83.1941	0.1200	38
OESTE	569	4	92.3594	0.0630	20
OESTE	577	3	145.5690	0.0639	20
OESTE	153	1	0.0000	0.01695	6

Fonte: II DISANDNT/JP, 05/2015-03/2016. Abreviações: Sh: desvio – padrão/ Wh: peso de cada estrato.

Como observa-se no quadro 4, na zona leste nenhum bairro se enquadrava no estrato 1 e na zona oeste nenhum bairro se enquadrava no estrato 4.

Assim, o total de bairros que foram visitados correspondentes às zonas leste e oeste do município de João Pessoa foi de 24, totalizando 2961 quadras, com uma estimativa de visitas em 105 quadras (Quadro 5). Após definido o número de quadras a serem amostradas para cada bairro (Quadro 6), realizou-se o sorteio das mesmas, para tanto fez-se necessário o mapa do município com as quadras numeradas, gerando números aleatórios com distribuição uniforme, utilizando um gerador de números pseudoaleatórios, no *software* Core R Development Team (2006) para o sorteio.

A quadra sorteada serviu de referência para a seleção dos domicílios a serem visitados, ou seja, todos os domicílios das quadras sorteadas foram visitados.

Quadro 6. Amostra de quadras por bairro, número de quadras sorteadas por bairro e zonas visitadas

BAIRRO	ESTRATO	NÚMERO DE QUADRAS SORTEADAS	ZONA
PONTA DO SEIXAS	4	1	LESTE
PENHA	2	1	LESTE
AERoclUBE	4	4	LESTE
BESSA	3	6	LESTE
JD. OCEANIA	4	12	LESTE
PORTAL DO SOL	4	2	LESTE
TAMBAÚ	4	2	LESTE
TAMBAUZINHO	4	2	LESTE
CABO BRANCO	4	4	LESTE
ALTIPLANO	3	2	LESTE
MANAIRA	4	9	LESTE
MIRAMAR	4	4	LESTE
SÃO JOSE + BRISAMAR+ JOÃO AGRIPINO	3	6	LESTE
CASTELO BRANCO	2	4	LESTE
TRINCHEIRAS	2	3	OESTE
ALTO DO MATHEUS	1	5	OESTE
OITIZEIRO	1	10	OESTE
VARJÃO	1	2	OESTE
CRISTO REDENTOR	2	10	OESTE
CRUZ DAS ARMAS	2	7	OESTE
JAGUARIBE	3	6	OESTE
ILHA DO BISPO	1	3	OESTE

Fonte: II DISANDNT/JP, 05/2015-03/2016.

O número de quadras, observado no Quadro 5, foi arredondado de forma que a soma das quadras de cada estrato não fosse inferior ao obtido anteriormente (105 quadras), de modo a preservar a significância adotada de 0,05. Observa-se também que alguns bairros estão juntos, pois foi seguida a divisão utilizada nos mapas da Prefeitura do Município de João Pessoa. Após conclusão do procedimento de campo foram computados os números de quadras visitadas e o número de domicílios visitados, conforme figura 7 e 8.

Figura 7. Diagrama dos cálculos para definição da amostra da Zona leste do município de João Pessoa

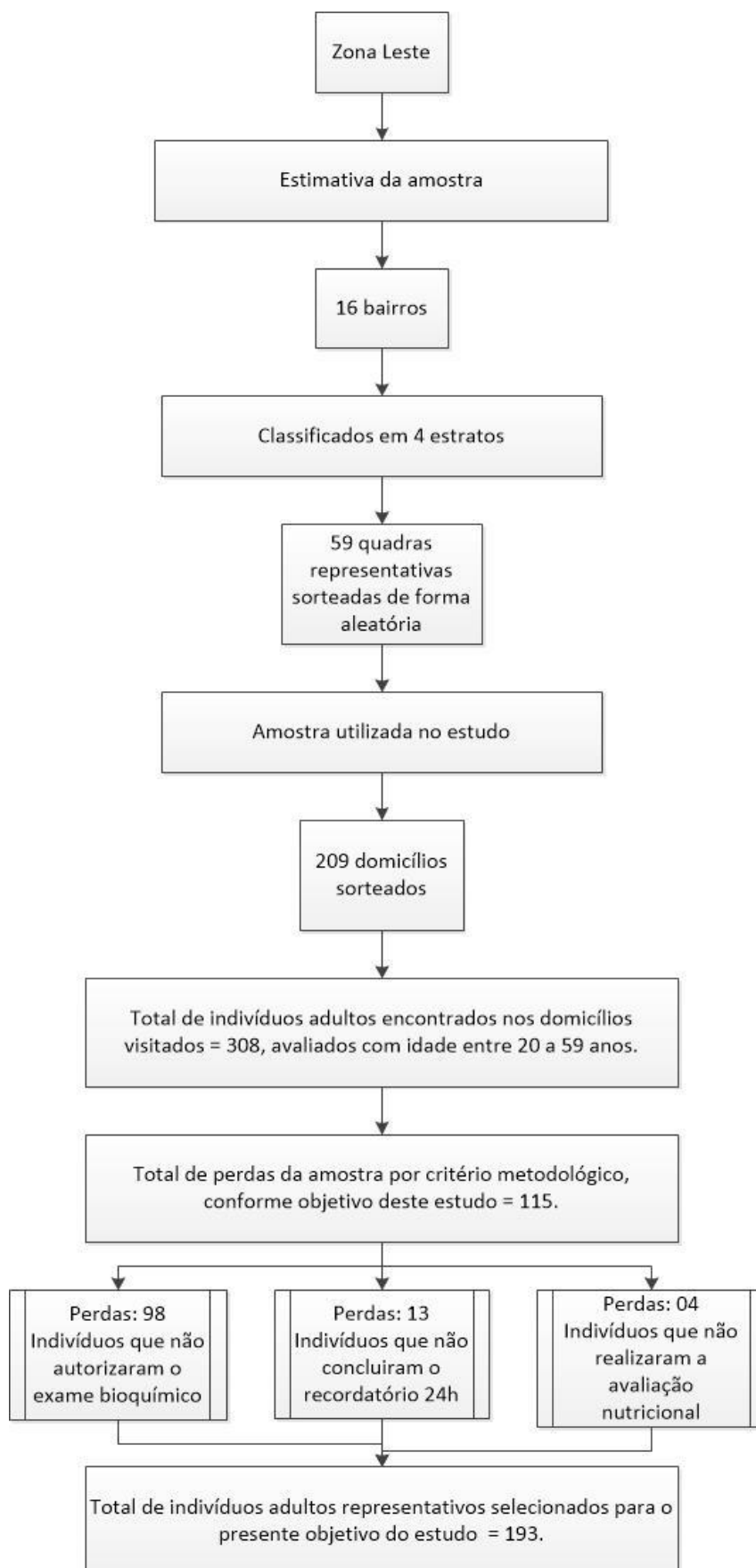
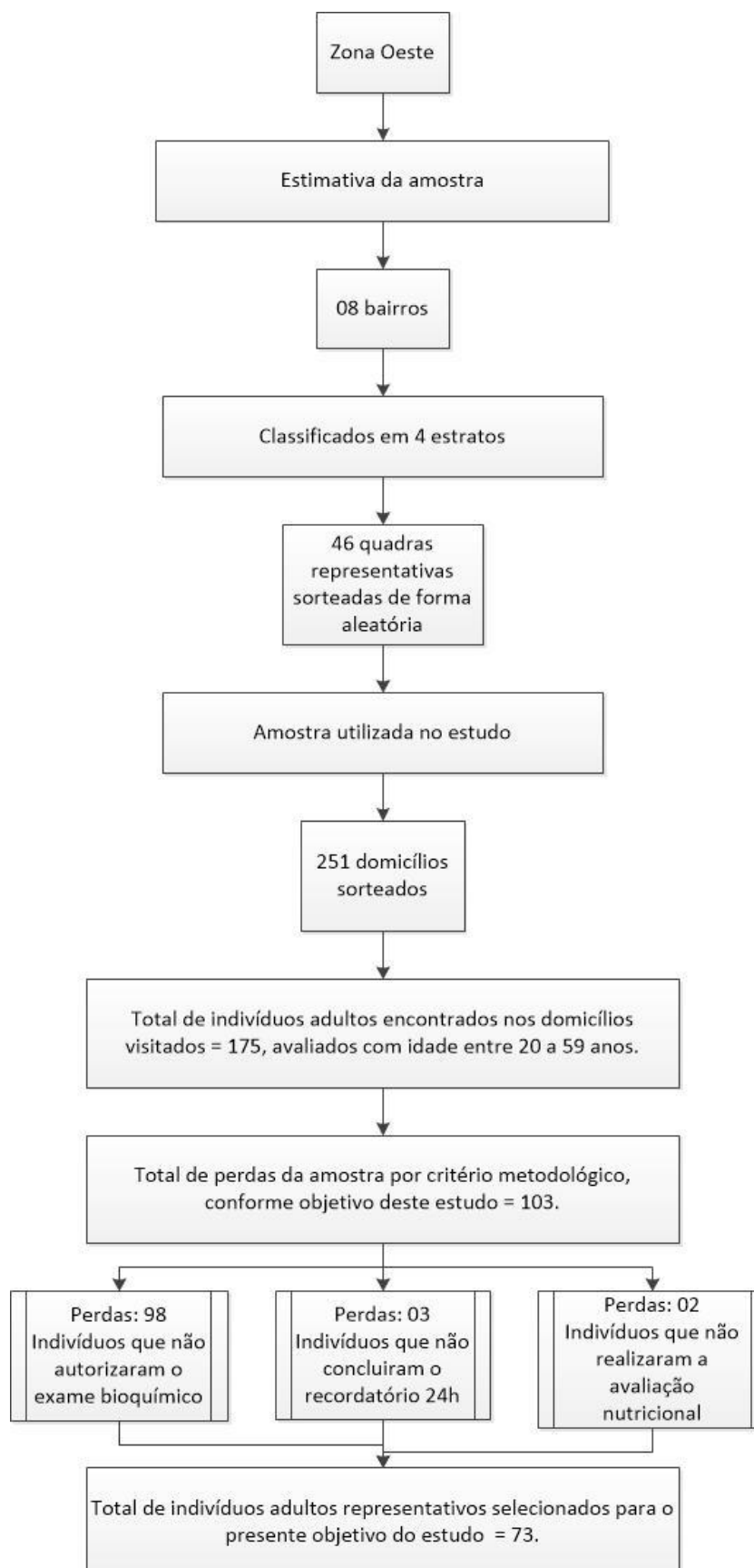


Figura 8. Diagrama dos cálculos para definição da amostra da Zona oeste do município de João Pessoa



3.2. DESENHOS METODOLÓGICOS:

Essa tese é composta por dois desenhos metodológicos:

Desenho 1:

A casuística que foi utilizada neste desenho metodológico respeitou o protocolo amostral do II DISANDNT/JP, descrito anteriormente.

3.2.1. População e Amostra

Dada que a população de adultos nas zonas leste e oeste da cidade de João Pessoa é superior a 10.000, conforme dados do Censo Demográfico do IBGE em 2010, e a fração amostral é menor que 5%, não é necessário o fator de correção de população finita. Assim, a definição da amostra mínima necessária para que os estimadores dos parâmetros populacionais tenha um nível de confiabilidade de 95% (que equivale a um valor crítico tabela, $Z_{\alpha/2}$ de 1,96) foi feita utilizando o seguinte procedimento de cálculo (BOLFARINE; BUSSAB, 2005):

$$n^* = \frac{\hat{\sigma}^2 Z_{\alpha/2}^2}{E^2}$$

Logo:

$$n^* = \frac{2.601,93^2 \times 1,96^2}{332^2} \approx 236$$

em que: n^* é o menor tamanho que pode ter uma amostra para que a estimativa apresente ao nível de 95% de confiança um desvio igual ou inferior ao erro tolerado (E); o erro máximo (E) admitido é de 15% do valor médio da renda dos adultos das zonas leste e oeste obtidos pelo “Primeiro ciclo de diagnósticos e intervenção da situação alimentar, nutricional e das doenças não transmissíveis mais prevalentes da população do município de João Pessoa/PB - I DISANDNT/JP”(07/2008-01/2010); $\hat{\sigma}$ = desvio-padrão do valor da renda dos adultos das zonas leste e oeste da cidade obtido no I DISANDNT/JP.

Considerando que a média da renda dos indivíduos adultos das zonas leste e oeste foram obtidas dos dados do “Primeiro ciclo de diagnósticos e intervenção da

situação alimentar, nutricional e das doenças não transmissíveis mais prevalentes da população do município de João Pessoa/PB”(07/2008-01/2010), foi de R\$ 2.213,26, o desvio padrão de R\$ 2.601,93 e margem de erro de R\$ 3320,00 na renda, a amostra mínima de adultos em João Pessoa nas zonas leste e oeste estatisticamente representativa com o nível de confiança de 95% seria de 236 adultos.

3.2.1.1.Critérios de inclusão

- Indivíduos de faixas etárias entre 20 – 59 anos;
- Indivíduos de diferentes condições socioeconômicas;
- Indivíduos usuários ou não de medicamentos;

3.2.1.2.Critérios de exclusão

- Indivíduos com distúrbios neuropsiquiátricos;
- Indivíduos usuários de suplemento de polivitamínicos, minerais, anorexígenos e anabolizantes;
- Gestantes e lactentes.

3.3. COLETA DE DADOS

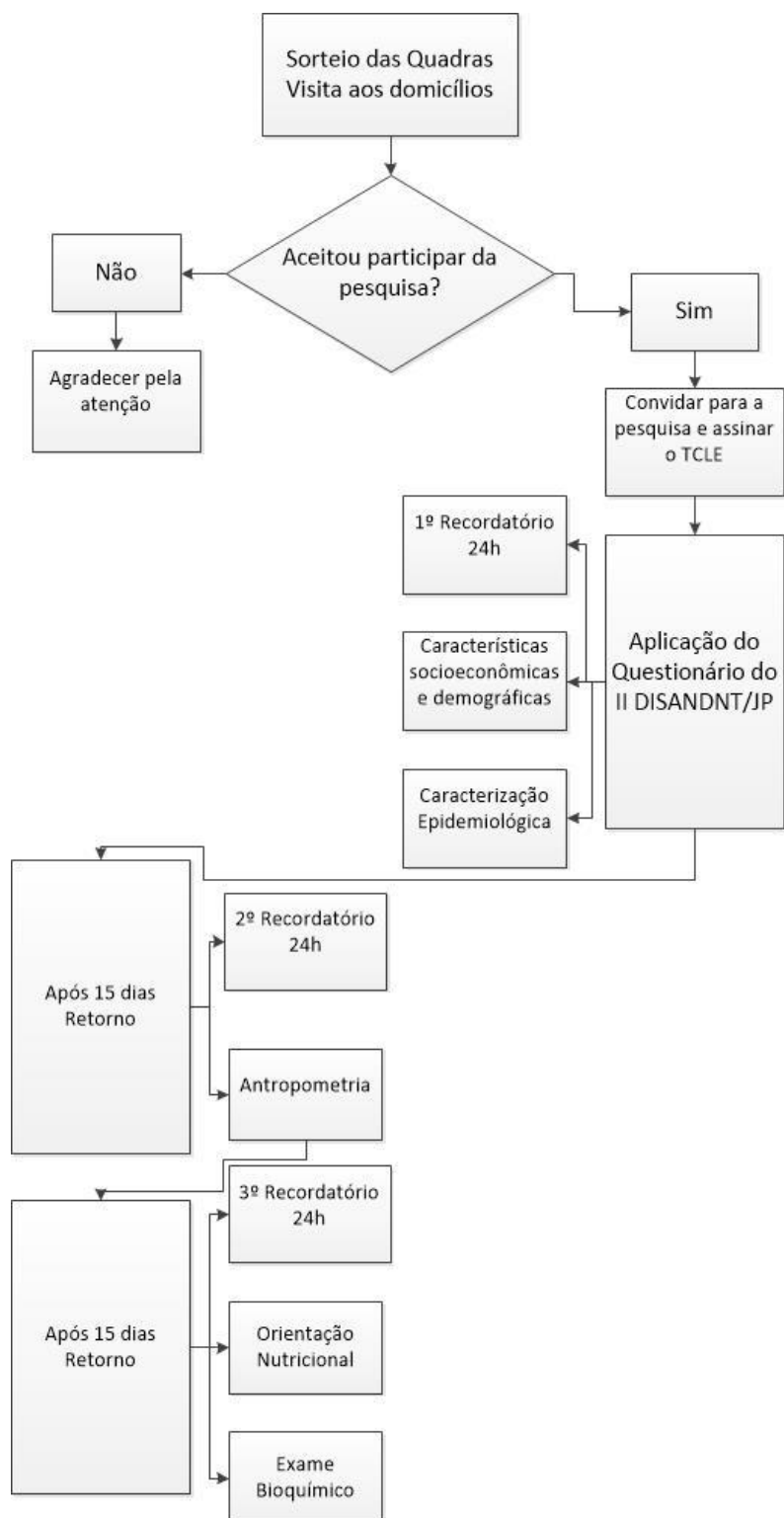
As visitas domiciliares e a aplicação dos questionários da pesquisa foram realizadas por equipes de pesquisadores graduandos dos Cursos de Nutrição, mestrandos e doutorandos do Programa de Pós Graduação em Ciências da Nutrição (PPGCN) da UFPB, devidamente treinados previamente ao início da coleta de dados após realização do estudo piloto e seguindo o protocolo descrito na figura 9.

As equipes treinadas, após reconhecerem a quadra sorteada, foram instruídas a selecionar todos os domicílios da quadra. As quadras que não apresentaram residências, as residências em que os responsáveis não aceitaram em participar da pesquisa e a quantidade de indivíduos que não aceitaram participar nas residências sorteadas foram computadas e resorteadas aleatoriamente posteriormente, de modo a minimizar perdas.

Em cada residência sorteada todos os indivíduos, adultos na faixa etária entre 20 – 59 anos, foram convidados a participar da pesquisa por meio de aplicação dos

questionários de caracterização socioeconômica e demográfica, caracterização epidemiológica, avaliação nutricional e do consumo alimentar, avaliação bioquímica e marcas epigenéticas.

Figura 9. Fluxograma da coleta de dados



3.4. AVALIAÇÃO NUTRICIONAL

As medições de peso e altura foram realizadas em triplicado, e utilizou-se a média dos três valores. A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda os seguintes pontos de índice de massa corporal de corte para classificar o estado de peso em adultos de 20 a 59 anos de idade: $<18,5$ kg / m² (baixo peso), 18,5-24,9 kg / m² (peso normal), 25.0- 29,9 kg / m² (excesso de peso), 30.0-39.9 kg / m² (obesidade), e ≥ 40 kg / m² (extremamente obesas) (WHO, 2000).

O índice de massa corporal (IMC) foi calculado como peso corporal (kg) dividido pelo quadrado da altura do corpo (metros) sendo universalmente utilizado para determinar a prevalência de estados com baixo peso, peso normal, sobrepeso e obesidade em todas as faixas etárias .

Os indicadores utilizados para determinar o estado de obesidade abdominal foram circunferência da cintura e relação cintura / quadril (RCQ). A Associação Americana do Coração recomenda pontos de corte da circunferência da cintura para determinação da obesidade abdominal como ≥ 102 cm em homens e ≥ 88 cm em mulheres (GRUNDY et al., 2005). E para a OMS o estado de obesidade abdominal pode ser identificado como um RCQ de $> 0,90$ em homens e $> 0,85$ em mulheres (WHO, 1999)(ANEXO E).

A Relação Cintura Altura é estabelecida pela divisão do valor da circunferência da cintura pela altura, ambos em centímetros e tem como referência o ponto de corte de 0,50, sendo esse o valor mais indicado para ambos os sexos e todas as idades (PITANGA; LESSA, 2006).

3.5. AVALIAÇÃO DO CONSUMO ALIMENTAR

Um dos métodos de inquérito de consumo alimentar é o recordatório 24 horas (ANEXO D). Este método foi utilizado pela primeira vez por Wiehl, em 1960, e consiste em quantificar todo o consumo de alimentos nas 24 horas anteriores a entrevista ou durante o dia anterior (FERRO-LUZZI, 2002). Por tratar-se de um método que descreve uma grande variedade de alimentos, o R24h é utilizado quando se deseja comparar a média de ingestão de nutrientes de diferentes populações.

O recordatório foi aplicado, três vezes, no intervalo de quinze dias e um dia do final de semana foi contemplado.

Para preenchimento do R24h, os indivíduos referiram dados que incluíam: hora, identificação do alimento ou bebidas consumidas, as características detalhadas dos alimentos como o tipo, ingredientes que compõem as preparações, marca, forma de preparo e identificação da quantidade consumida, de acordo com o tamanho da porção e medidas caseiras.

Com o auxílio de um álbum de desenhos de alimentos com medidas caseiras nas três dimensões (pequena, média, grande e extragrande), desenhados com base no peso real do consumo médio de alimentos validados para esta população, com o objetivo de quantificar de forma mais eficaz o tamanho das porções consumidas, minimizando prováveis deficiências de memória dos indivíduos entrevistados (LIMA et al., 2008; ASCIUTTI et al., 2005).

Os alimentos do R24h foram transcritos e padronizados em um documento auxiliar. Todos os alimentos foram convertidos em gramas com auxílio do álbum de porções média em tamanho real que foi baseado no programa Dietsys para estudo de base populacional (ASCIUTTI et al., 2005). As preparações dos alimentos foram desmembradas segundo seus ingredientes e quantidades. Os alimentos foram avaliados e convertidos a calorias e nutriente pelo software de Nutrição, Dietwin, este software conta com aproximadamente 5230 alimentos e receitas cadastrados de acordo com a tabela TACO 4ª versão e a tabela DIETWIN, que é uma compilação de várias tabelas, como IBGE, USDA, CENEXA, Alemã, Repertório Geral dos Alimentos, Fichas técnicas de receita.

3.5.1. Estimativa do Consumo Habitual

Para estimar o consumo habitual e corrigir a variância intrapessoal, vários métodos estatísticos estão disponíveis, porém para que se possa estimar a variabilidade do consumo diário de nutriente são necessários no mínimo dois recordatórios. Nesse estudo, foi utilizado, o Método de múltiplas fontes (Multiple Source Method - MSM), on line, disponível no site (<https://msm.dife.de/tps/msm/>). O MSM é uma técnica estatística proposta pela European Prospective Investigation into câncer and Nutrition (EPIC) (MSM, 2012).

3.6. ANÁLISE BIOQUÍMICA

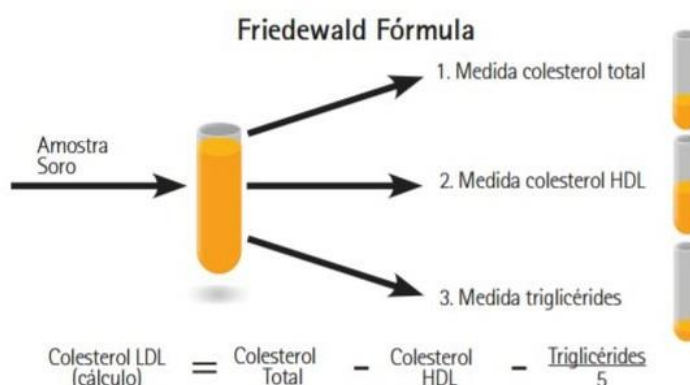
A coleta de sangue foi realizada no terceiro dia de visita no domicílio dos indivíduos e foram realizadas ligações para agendar o dia e horário do exame e orientar quanto à realização de jejum de 12 horas antes da coleta de sangue. Uma segunda ligação foi realizada um dia antes da coleta para confirmar sobre a coleta de sangue e reforçar as orientações (uso de medicamentos, alergias, jejum de 12 horas, realização de atividade física vigorosa) sobre a preparação para realização do exame. A coleta do sangue foi realizada por enfermeira com plena experiência em coleta sanguínea.

Para a realização da coleta de sangue foram utilizados tubos a vácuo (dois tubos de 4 ml cada), sendo um para análise de soro (tubo com ativador de coágulo), e outro tubo para análise de plasma (com anticoagulante EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético). O sangue era coletado na veia braquial e o garrote posicionado na linha média do braço.

3.6.1. Perfil Lipídico

Para a avaliação do perfil lipídico foi utilizado os kits para a dosagem de Colesterol Total, da marca Labtest® do Brasil pelo método enzimático - Trinder, Colesterol HDL, da marca Labtest® do Brasil pelo método de Precipitação, Triglicerídeos da marca Labtest® do Brasil pelo método enzimático - Trinder, e o valor do LDL foi de acordo com o cálculo proposto por Friedewald et al., (1972), conforme figura 10. E foi realizado no Laboratório de Estudos do Treinamento Físico aplicado ao desempenho e a saúde, do Departamento de Educação Física da Universidade Federal da Paraíba.

Figura 10. Cálculo para estimativa do nível plasmático do Colesterol - LDL



Fonte: Google imagens.

3.6.2. Malondealdeído (MDA)

A atividade oxidante foi quantificada por meio da reação do ácido tiobarbitúrico (TBARS) com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos, conforme método descrito por Ohkawa, Ohishi e Yagi (1979). Para isso, 250 µl do plasma foi incubado em banho maria a 37° C por 60 minutos. Em seguida, a amostra foi precipitada com ácido perclórico 35% e centrifugada a 14000 rpm por 20 minutos à 4°C. O sobrenadante foi transferido para novos microtubos onde foi adicionado 400µl de ácido tiobarbitúrico a 0,6% e incubado à 100° C por 60 minutos. Após resfriamento, o material foi lido em espectrofotômetro ultravioleta (Biospectro, modelo SP 22, Brasil) a um comprimento de onda de 532nm. Sendo estas análises realizadas no Laboratório de Estudos do Treinamento Físico aplicado ao desempenho e a saúde, do Departamento de Educação Física da Universidade Federal da Paraíba.

3.6.3. Capacidade de Antioxidante Total – CAT

A avaliação da capacidade antioxidante total foi feita por meio de DPPH (1,25 mg diluído em 100ml de etanol e mantido sob proteção de luz). Para análise, 100 ul de plasma foram adicionados a 3,9 ml de solução DPPH, agitado em vórtex, colocado em repouso por 30 minutos e em seguida centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos a 20° C. O sobrenadante foi usado para leitura em espectrofotômetro em 515 nm de comprimento de onda, usando água destilada como branco. O resultado é expresso em percentual de atividade antioxidante. Sendo estas análises realizadas no Laboratório de Estudos do Treinamento Físico aplicado ao desempenho e a saúde, do Departamento de Educação Física da Universidade Federal da Paraíba.

3.6.4. Homocisteína

A dosagem da concentração de homocisteína, foi realizada no Laboratório Clínico Roseane Dore, a partir do método de Kuo et al., (1997) para aplicação em cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC – *high performance liquid chromatography*) com detecção fluorimétrica e eluição isocrática .

Esse método consiste na separação do plasma através do uso de anticoagulante EDTA na coleta de sangue e posterior centrifugação. O plasma é tratado com agente redutor tris-carboxietilfosfina (TCEP) para separação da homocisteína em duas moléculas de Hcy e daquelas ligadas a proteínas plasmáticas, permitindo a quantificação da Hcy total. Após a interrupção da reação e precipitação das proteínas com ácido tri-cloro acético (TCA), centrifuga-se novamente para separação das proteínas. O sobrenadante é transferido para outro recipiente para reagir com o agente 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulfonato (SBD-F), específico para marcação fluorescente do átomo de enxofre. Após incubação, o produto é injetado em um HPLC utilizando coluna de fase reversa, ocorrendo a detecção em cerca de 7 minutos. A detecção da fluorescência dos compostos separados é feita com detector ajustado para excitação 385nm e emissão 515nm (KUO et al., 1997).

3.6.5. Ácido Fólico

As análises do ácido fólico foram realizadas no Laboratório Clínico Roseane Dore, pelo método de Quimioluminescencia. Considerando o valor de referência > que 3.10 ng/mL e sensibilidade analítica de 0.5 ng/mL.

3.7. ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO

A análise do gene *ADRB3* foi realizada no Laboratório de Genética Molecular Humana do Departamento de Biologia Molecular – CCEN – Centro de Ciências Exatas e da Natureza/UFPB.

3.7.1. Obtenção da amostra e Isolamento DNA genômico

Com o auxílio de um *Vacutainer® com EDTA*, 5mL de sangue total foi obtido. Após a coleta, o sangue foi centrifugado por 10 min a 300rpm para obter a papa leucocitária. A extração do DNA genômico de leucócitos foi realizada utilizando-se TRIZOL LS (Life Technologies) de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA genômico foi quantificado por espectrofotômetro Nanodrop® (Thermo Scientific) e estocados à -20° até as análises.

3.7.2. Análise de metilação de DNA em sítios específicos

A análise de metilação para o gene *ADRB3* foi realizada utilizando o método de PCR Específica para Metilação (Methylation Specific PCR - MSP), cujo princípio está em transformar citosina não metilada em uracila sem provocar alteração em citosina metilada (HERMAN et al., 1996). Para tanto, o DNA foi modificado pelo bissulfito de sódio a partir do kit Cells-to-CpG™ Bisulfite Conversion (Life Technologies) de acordo com as recomendações do fabricante. As diferenças nas seqüências de DNA após tratamento do DNA foram detectadas pela técnica da PCR utilizando GoTaq® G2 Hot Start Green Master Mix (Promega) e primers específicos para seqüências metiladas e não metiladas como previamente descrito (GEMMA et al., 2009, KHAZAMIPOUR et al., 2009, HINRICHSSEN et al., 2014) (Tabela 01).

Após a amplificação, 10µl das amostras de PCR foram aplicados e a eletroforese realizada em gel de poliacrilamida a 6%, seguido de coloração por Gel Red (Biotium). Como controle positivo, DNA totalmente metilado e totalmente desmetilado (Cells-to-CpG™ Methylated & Unmethylated DNA Control Kit, Life Technologies) foram modificados como anteriormente citado e amplificados por PCR, como controle das reações com os primers para a condição metilada e não metilada respectivamente.

Tabela 1. Sequência de primers e condições das reações de MSP

Gene	Primer (3'-5')	Amplicom (bp)	Temperatura de anelamento (°C)	Ciclos
ADRB3	F5' GTAGGAGAAGCGTTTGAATTC	143	0	40
MET	3'			
	R-5' TTTTAAACGACGTCTCG 3'			
ADRB3	F- 5'			40
NÃO	GAGGTAGGAGAAGTGTTTGAATT	141		
MET	T 3'			
	R-5'			

TTTTTTTAAAACAACATCTCACT 3'

* F-Forward, R-Reverse, M-metilado, N-não metilado, MSP- PCR específica para Metilação.

3.8. DESENHO METODOLÓGICO 2:

Para o segundo desenho metodológico de intervenção, seguiremos as seguintes etapas descritas abaixo:

3.8.1. Questões Éticas

Previamente o projeto sobre o estudo intervencional, foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal de Paraíba (UFPB), segundo as normas éticas para pesquisa envolvendo seres humanos, constantes da Resolução 466, de 12 de dezembro de 2012 do Conselho Nacional da Saúde/Comissão Nacional de Ética em Pesquisa. De acordo com o protocolo n^o 0478/2015, CAAE: 48703115.0.0000.5188 (APÊNDICE B).

A presente pesquisa foi também submetida e cadastrada no Clinical Trials, sob o número NCT 02846025.

Após a identificação dos indivíduos adultos que apresentaram hipermetilação no gene *ADRB3*, os pesquisadores apresentaram-se aos indivíduos, relatando o objetivo do estudo e solicitarão a participação dos mesmos na pesquisa, sendo assim, respeitadas as diretrizes éticas que regem as pesquisas com seres humanos, portanto, para que fosse válida a participação dos indivíduos residentes nos domicílio selecionados esses deram o seu consentimento mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE C).

3.9. POPULAÇÃO E AMOSTRA

O estudo referente ao segundo desenho metodológico, é de caráter clínico e intervencional e trata de uma sub amostra originada do estudo referente ao primeiro desenho metodológico, incluindo os indivíduos que apresentarem hipermetilação no gene *ADRB3*.

3.9.1. Cálculo Amostral

O cálculo para a amostra foi com base no artigo publicado na área de Eipenética (SWITZENY et al., 2012) portanto, considerou para o presente estudo um $n = 40$ indivíduos, sendo adultos do sexo feminino, classificados com sobrepeso e obesidade.

3.9.2. Critérios de Inclusão

- Indivíduos adultos, com idade entre 20 e 59 anos;
- Indivíduos que possuam hipermetilação no gene *ADRB3*;
- Estado cognitivo preservado.

3.9.3. Critérios de Exclusão

- Indivíduos etilistas ou tabagistas;
- Tomar medicamentos conhecidos por interferir com o metabolismo do ácido fólico (nos últimos 3 meses);
- Indivíduos que fazem uso de suplementos, em geral , de óleo de peixe ou outro ácidos graxos;
- Gestantes ou planejando engravida durante o período do estudo.

3.10. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Após avaliação dos critérios de elegibilidade da amostra, aquelas que concordaram em participar da pesquisa receberam informações sobre o objetivo do estudo, instruções sobre as coleta dos exames de sangue e, concordando, assinaram o TCLE (APÊNDICE C).

Os indivíduos foram orientados a ter peso estável, hábitos alimentares e os níveis de atividade física constantes (SWITZENY et al., 2012), três meses antes do início da intervenção e receberam um plano dietético individual, de acordo com a dieta AHA calculados pelo sistema de equivalentes (COSTA, 2013) (ANEXO H e I) e a recomendação dos macronutrientes padronizado a todos de acordo com o recomendado pelo American Heart Association – AHA (2010): Carboidratos 45 – 65% (recomendado 55%), Proteína 10 – 35% (recomendado 15%), Gordura Total 25 – 35% (recomendado 30%) uma semana antes do início do estudo, para serem incluídos. Os indivíduos que pretendiam mudar os hábitos alimentares, a frequência de atividade física ou peso corporal dentro do período de estudo não foram autorizados a participar (SWITZENY et al., 2012). Todas as terapias médicas dos indivíduos continuaram inalteradas ao longo do estudo.

Na segunda semana do estudo, cada indivíduo foi alocado em três grupos através de randomização utilizando o Software STATA versão 14.0 para Windows e iniciaram o plano dietético individual com foco para os vegetais e leguminosas com ação antioxidante e ricos em ácido fólico, sendo ainda convidados a consumir alimentos fortificados com ácido fólico e alimentos naturalmente ricos em folato para alcançar uma ingestão habitual de folato ≥ 400 μg , esta quantidade foi para o grupo de intervenção 1 e 2.

Quanto a intervenção, os participantes dos 03 grupos receberam aconselhamento pelo nutricionista, responsável pela presente pesquisa e todo o material impresso de forma gratuita incluindo os alimentos pré-embalados e cápsulas de óleo de avelã. As sessões de aconselhamento com o nutricionista foram oferecidas diariamente nas residências durante todo o período da intervenção, exceto para o grupo 4, onde o acompanhamento foi semanal, para manutenção dos hábitos alimentares.

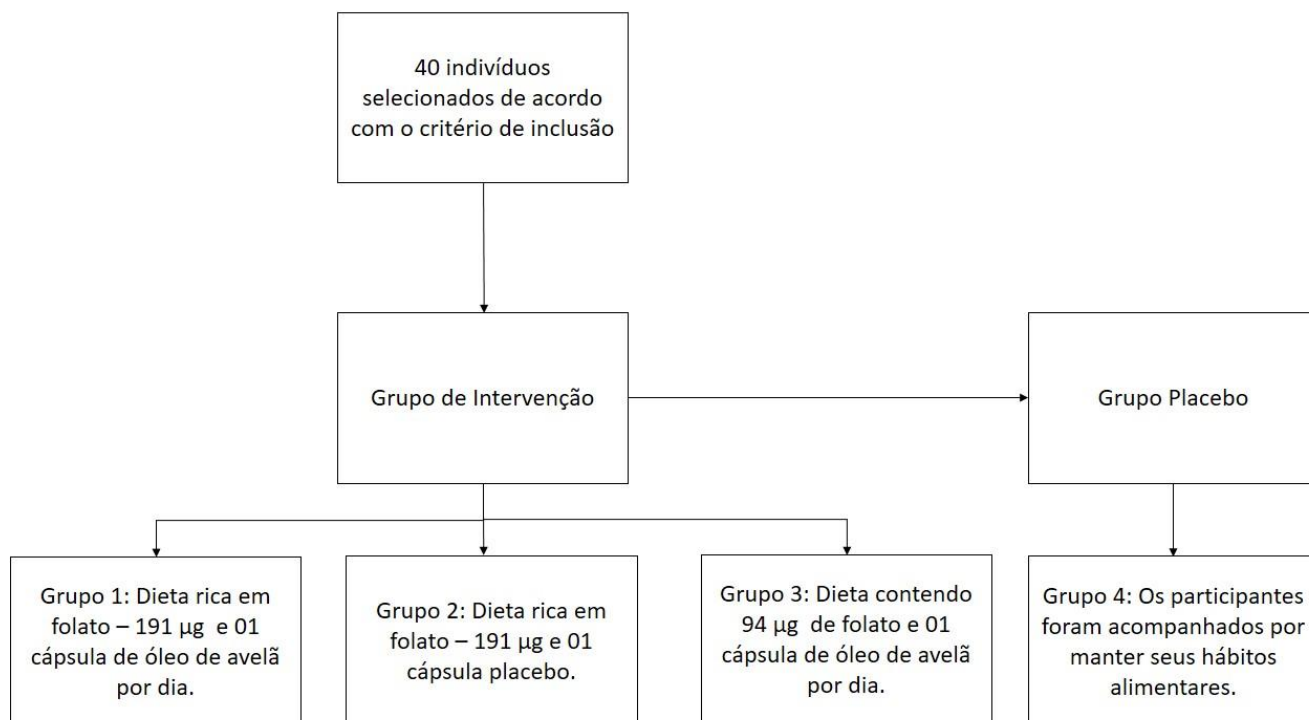
Grupo 1 = neste grupo, os indivíduos receberam, durante o período de 08 semanas diariamente, a intervenção dietética diária com, 300 g de vegetais ricos em folato - 191 μg e adicionalmente receberam 01 cápsula contendo 25 mg óleo de avelã por dia.

Grupo 2 = neste grupo, os indivíduos receberam, durante o período de 08 semanas diariamente, a intervenção dietética diária com, 300 g de vegetais ricos em folato - 191 μg e 01 cápsula placebo.

Grupo 3 = neste grupo, os indivíduos receberam, durante o período de 08 semanas diariamente, com 300 g de vegetais contendo 94 μg de folato e 01 cápsula contendo 25 mg óleo de avelã por dia.

Grupo 4 = neste grupo, os indivíduos receberam, durante o período de 08 semanas, visitas semanais para manterem seus hábitos alimentares.

Figura 11. Fluxograma dos grupos de intervenção.



Fonte: Própria

3.10.1. Elaboração dos Vegetais

Os vegetais foram entregues de forma individualizada, diariamente nos domicílios, no período de 08 semanas, correspondentes a 60 dias, referente a quantidade necessária de acordo com a dieta AHA, a composição de vegetais e leguminosas, foi distribuída conforme a tabela 2 e 3 descritas abaixo:

Tabela 2. Dieta consumida pelo Grupo 1 e 2 contendo 300g de vegetais e leguminosas ricos em folato.

Alimento	Quantidade (g)	Folato (µg)
Semana 1 e 5		
Lentilha cozida escorrida	110	149,3
Milho doce cozido escorrido	60	13,8
Cenoura Crua	55	10,54
Abobrinha cozida, inclui pele	75	18,2
TOTAL	300	191,8

Semana 2 e 6		
Brócolis cozido, escorrido	100	108
Soja madura cozida	100	54
Alface, folha verde	50	19
Ervilha cozida	50	9,5
TOTAL	300	190,5
Semana 3 e 7		
Lentilha cozida escorrida	100	135,75
Acelga	60	8,4
Abóbora cozida escorrida	90	8,1
Beterraba cozida	50	40
TOTAL	300	192,25
Semana 4 e 8		
Beterraba cozida, escorrida	100	80
Soja madura cozida	100	54
Couve Flor cozido escorrido, sem sal	75	30,75
Brócolis cozido, escorrido	25	27
TOTAL	300	191,75

Tabela 3. Dieta consumida pelo Grupo 3 contendo folato, 300g de vegetais e leguminosas.

Alimento	Quantidade (g)	Folato (µg)
Semana 1 e 5		
Tomate, verde	75	6,75
Beterraba, cozida, escorrida	50	40
Alface, folhas verdes	25	9,50
Couve flor cozido escorrido, sem sal	75	30,75
Pepino com casca	75	5,25
TOTAL	300	94,75
Semana 2 e 6		
Abóbora, cozidos, escorridos, sem sal	125	11,25
Brócolis cozido, escorrido	50	54
Alface, folha verde	25	9,5

Milho doce cozido escorrido	75	11,04
Couve flor cozido escorrido, sem sal	25	10,25
TOTAL	300	96,04
Semana 3 e 7		
Acelga, crua	25	3,5
Pepino com casca	75	5,25
Soja madura cozida	150	81
Tomate, verde	50	4,5
TOTAL	300	94,5
Semana 4 e 8		
Cenoura crua ralada	60	11,5
Ervilha cozida	75	14,25
Alface, folha verde	50	19
Abobrinha cozida, inclui pele	75	18,2
Beterraba, cozida, escorrida	40	32
TOTAL	300	94,95

3.10.2. Cápsula de óleo de avelã

Os indivíduos, do grupo 1 e 3, receberam ainda diariamente, no período de 08 semanas, 01 cápsula com 25g de óleo de avelã.

As cápsulas do suplemento foram manipulados na Farmácia Herva LTDA (CNPJ 70109475/0001-04) em João Pessoa/PB, sendo fornecido o certificado de análise de controle de qualidade. A composição da capsula que foi ofertada encontra-se na tabela 4 abaixo:

Tabela 4. Composição em ácidos graxos do óleo de avelã.

Ácidos graxos 25g	Avelã
Saturados	2.06
Palmítico	1.39
Esteárico	0.62
Monoinsaturado	20.15
Oleico	20.13
Poliinsaturados	2.64
Linoléico	2.60
Linolênico	0.035

Fonte: Freitas;Naves, 2010.

Após, o término das 08 semanas, teve início a terceira etapa do estudo, onde constou da análise da ingestão dietética do recordatório alimentar de 24h e coleta sanguínea para realização dos testes bioquímicos e metilação do DNA.

3.11. ANÁLISE DO NÍVEL DE METILAÇÃO

O sangue foi escolhido para a análise, pois é um tecido metabolicamente ativo, com um papel importante nas consequências inflamatórias e vasculares adversas da adiposidade e é amplamente utilizado para fins de diagnóstico clínico (WAHL et al.,2017).

3.11.1. Obtenção da amostra e Extração de DNA a partir do sangue

Com o auxílio de um *Vacutainer® com EDTA*, 5mL de sangue total foi obtido. Após a coleta, o sangue foi centrifugado por 10 min a 300rpm para obter a papa leucocitária. A extração do DNA genômico de leucócitos foi realizada utilizando-se TRIS-HCl 1.5M pH8.8 (Biorad Réf 161-0798) de acordo com as recomendações do fabricante.

O DNA genômico foi quantificado QubitTM por fluorescência (THERMO FISHER), onde os dados de DNA são quantificados com mais precisão e a análise da pureza (razão entre 260/280) foi realizado por espectrofotômetro no Nanodrop[®] (Thermo Scientific) e estocados à -20°.

3.11.2. Desenho dos Primer

Para avaliar os níveis de metilação do DNA na região promotora, o desenho do primer para os genes *ADRB3*, *Lep* e *POMC* foi realizado pelo BLAST e o Software MethPrimer (APÊNDICE D) o qual foi desenvolvido especificamente para a PCR baseada em conversão de bissulfito. O MethPrimer aceita uma sequência de DNA como entrada, executa uma conversão digital de bissulfito da sequência de entrada e, em seguida, seleciona primers na sequência convertida. Os resultados da seleção de primers são entregues por meio de um navegador da Web em visualizações de texto e gráficos. (LI; DAHIYA, 2002). Os primer utilizados estão no (APÊNDICE E,F e G)

3.11.3. Conversão do DNA pelo bisssulfito

As amostras foram submetidas a conversão do DNA pelo bissulfito. As reações de conversão foram realizadas com o kit de bissulfito Epitect (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. As amstras de DNA diluídas em RNase-freewater (20µl), solução de bissulfito (85 µl) e DNA Protect Buffer (35 µl) foram mantidas em termociclador por aproximadamente 5 horas , alternando-se as temperaturas entre 95°C (desnaturação) e 60°C (incubação). Após este período, foi realizada a purificação das amostras. Para tanto, foram adicionados aos tubos 560 µl de solução recém – preparada contendo *Buffer BL* e *Carrier RNA*, que foi transferida para uma coluna e, em seguida, para um tubo coletor Epitect (Qiagen) após centrifugação. O filtrado foi descartado e á coluna foi adicionado 500 µl de Buffer BW (wash buffer) para nova centrifugação.

Este processo foi repetido alternando-se o tampão, uma lavagem com 500µl de Buffer BD (desulfonation buffer) e duas com 500µl de *Buffer BW*. A seguir , a coluna foi transferida para um novo tubo coletor e, posteriormente, foram adicionados 20 µl de *Buffer EB* ao centro da membrana. Para finalizar, a coluna foi centrifugada por 1 minuto a 12000 rpm para eluição do DNA purificado.

3.11.4. Níveis de Metilação

A amplificação do PCR e as análises do HRM (high resolution melting), foram realizadas sequencialmente no aparelho Applied Biosystems 7500 Fast System. a PCR foi realizada em um volume total de 20 µl contendo: 1x Buffer, 4mM Mg+2, 200µM de cada

dNTPs (Qiagen), 250 nM de cada primer , 5µM SYTO dye® (INVITROGEN), 1U HotstarTaq DNA Polymerase (Qiagen) e 1µl de DNA modificado com bissulfito. The PCR program consisted of an initial enzymatic activation at 95 °C for 10 min, followed by 50 cycles of 45 s at 95 °C, 45 s at 60 °C and 45 s at 72 °C and a final extension at 72 °C for 10 min. O DNA genômico com bissulfito foi amplificado com as sequencias dos primers no APÊNDICE D.

4 REFERÊNCIAS

AFMAN, L.A.; MULLER, M. Human nutrigenomics of gene regulation by dietary fatty acids. **Progress in Lipid Research** , v.51, p.63–70,2012.

ANWAY, M.D.; LEATHERS, C.; SKINNER, M.K. Endocrine disruptor vinclozolin induced epigenetic transgenerational adult onset disease. **Endocrinology**, v.147, p. 5515-5523, 2006.

ARTS, M.T.; ACKMAN, R.G.; HOLUB, B.J. Essential fatty acids in aquatic ecosystems: a crucial link between diet and human health and evolution. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.58,p. 122–137,2001.

ASCIUTTI, L. S. R.; RIVERA, M. A. A.; COSTA, M. J. C.; IMPERIANO, E.; ARRUDA, M. S.; BANDEIRA, M. G.; ARRUDA, N. S. **Manual de porções média em tamanho real baseado no programa dietsys para estudo de base populacional**. UFPB, 2005.

ASLIBEKYAN, S.; WIENER, H.W.; HAVEL, P.J.; STANHOPE, K.L.; O'BRIEN, D.M.; HOPKINS, S.E.; ABSHER, D.M.; TIWARI, H.K.; BOYER, B.B. DNA methylation patterns are associated with n–3 fatty acid intake in Yupik people. **The Journal of Nutrition**, v.144,p. 425-430, 2014.

ATTWOOD, J. T.; YUNG, R. L.; RICHARDSON, B. C. DNA methylation and the regulation of gene transcription. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 59, p. 241-257, 2002.

BALLARD, M.S.; SUN, M. Vitamin A, folate, and choline as a possible preventive intervention to fetal alcohol syndrome. **Medical Hypotheses**, v.78, p.489–493,2012.

BARRES, R.; OSLER, M.E.; YAN, J. Non-CpG methylation of the PGC-1alpha promoter through DNMT3B controls mitochondrial density. **Cell Metabolism**, v.10, p.189–198, 2009.

BARROS, S.P.; OFFENBACHER, S. Epigenetics: connecting environment and genotype to phenotype and disease. **Journal of Dental Research**,v.88, p. 400-408,2009.

BAYARSAIHAN D. Epigenetic mechanisms in inflammation. **Journal of Dental Research**, v. 90,n.1,p.9-17,2011.

BERNI CANANI, R.; DI COSTANZO, M. Epigenetic mechanisms elicited by nutrition in early life. **Nutrition**, v.24, p. 198–205,2011.

BHUPATHIRAJU, S.; N.; HU, F, B. Epidemiology of obesity and diabetes and their cardiovascular complications. **Circulation Research**, v. 118,p. 1723–1735, 2016.

BIESEK, S.; ALVES, L.A.; GUERRA, I. **Estratégias de nutrição e suplementação no esporte**. São Paulo: Editora Manole, p. 49-88,2005.

BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes e Development**, v. 16, p.6–21, 2002.

BISHOP, K.S.; FERGUSON, L.R. The Interaction between Epigenetics, Nutrition and the Development of Cancer. **Nutrients**, v. 7,n.2,p. 922 – 947,2015.

BLAUW, L.L.; NOORDAM, R.; TROMPET, S.; BERBE´E, J.F.P.; ROSENDAAL, F.R.; VAN HEEMST, D.; VAN DIJK, K.W.; MOOKKANAMORI, D.O.; MUTSERT, R.;

RENSEN, P.C.N. Genetic variation in the obesity gene FTO is not associated with decreased fat oxidation: The NEO study. **International Journal of Obesity**, v. 19, p. 1-26, 2017

BOBETSIS, Y.A.; BARROS, S.P.; LIN, D.M.; WEIDMAN, J.R.; DOLINOY, D.C.; JIRTLE, R.L. Bacterial infection promotes DNA hypermethylation. **Journal of Dental Research**, v. 86, p.169-174, 2007.

BOBETSIS, Y.A.; BARROS, S.P.; LIN, D.M.; ARCE, R.M.; OFFENBACHER, S. Altered gene expression in murine placentas in an infection-induced intrauterine growth restriction model: a microarray analysis. **Journal of Reproductive Immunology**, v.85, p. 140-148, 2010.

BOEKHOLDT, S. M.; KASTELEIN, J. J. P. C-reactive protein and cardiovascular risk: more fuel to the fire. **Lancet**, v. 37 p. 95-96, 2010.

BOLFARINE H, BUSSAB, W.O. Elementos de amostragem. São Paulo: **Edgard Blucher**; 2005. 269p.

BONAA, K.H.; NJOLSTAD, I.; UELAND, P.M.; SCHIRMER, H.; TVERDAL, A.; STEIGEN, T.; WANG, H.; NORDREHAUG, J.E.; ARNESEN, E.; RASMUSSEN, K. Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction. **The New England Journal of Medicine: Research & Review**, v. 13, n. 354, p.1578–1588, 2006.

BOTTIGLIERI, T. Folate, vitamin B12, and neuropsychiatric disorders. **Nutrition Reviews**, v. 54, p. 382–390, 1996.

BRATTSTROM, L.; WILCKEN, D. E. Homocysteine and cardiovascular disease: cause or effect?. **American Journal Clinical Nutrition**, v.72, n. 2, p. 315–323, 2000.

BRETTFELD, C.; ENGLERT, S.; AUMUELLER, E.; HASLBERGER, A.G. Genetic and epigenetic interactions in adaptive thermogenesis pathways in association with obesity

from a Public Health Genomics perspective. **Italian Journal of Public Health**, v.9,n.4,p.1-18, 2012.

BRONS, C.; JACOBSEN, S.; NILSSON, E. Deoxyribonucleic acid methylation and gene expression of *PPGCRA1* in human muscle is influenced by high-fat overfeeding in a birth-weight-dependent. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.95,n.6,p. 3048-3056,2010.

BRUFAU, G.; BOATELLA, J.; RAFECAS, M. Nuts, source of energy and macronutrients. **British Journal Nutrition**, v.96,p.24-28,2010.

BUJANDA, L.; HIJONA, E.; LARZABAL, M.; BERAZA, M.; ALDAZABAL, P.; GARCÍA-URKIA, N.; SARASQUETA, C.; COSME, A.; IRASTORZA, B.; GONZÁLEZ, A. Resveratrol inhibits nonalcoholic fatty liver disease in rats. **BMC Gastroenterology**, v.8, n.40,p. 1 – 8, 2008.

BURDGE, G.C.; LILLYCROP, K.A. Nutrition, epigenetics, and developmental plasticity: implications for understanding human disease. **Annual Review of Nutrition**, v.30, p. 315-339,2010.

CALVANESE, V.; HORRILLO, A.; HMADCHA, A. Cancer genes hypermethylated in human embryonic stem cells. **PLoS One**, v.3, n.9, p. 1-12, 2008.

CHAJÈS, V.; BIESSY, C.; FERRARI, P.; ROMIEU, I.; FREISLING, H.; HUYBRECHTS, I.; SCALBERT, A.; BUENO DE MESQUITA, B.; ROMAGUERA, D.; GUNTER, M.J.; VINEIS, P.; HANSEN, C.P.; JAKOBSEN, M.U.; CLAVEL-CHAPELON, F.; FAGHERAZZI, G.; BOUTRON-RUAULT, M-C.; KATZKE, V.; NEAMAT-ALLAH, J.; BOEING, H.; BACHLECHNER, U.; TRICHOPOULOU, A.; NASKA, A.; ORFANOS, P.; PALA, V.; MASALA, G.; MATTIELLO, A.; SKEIE, G.; WEIDERPASS, E.; AGUDO, A.; HUERTA, J.M.. Plasma elaidic acid level as biomarker of industrial trans fatty acids and risk of weight change: report from the EPIC study. **PLoS One**, v.10, p. 1-11,2015.

CHATURVEDI, A.K.; MOORE, S.C.; HILDESHEIM, A. Invited commentary: circulating inflammation markers and cancer risk—implications for epidemiologic studies. **American Journal of Epidemiology**, v.177, p.14–19, 2013.

CHING - YANG, T.; CHEN, Y.J.; CHANG, S.; CHEN, C.; CHANG, P.; SHAO – CHUN LU. Malondialdehyde mediates oxidized LDL – induced coronary toxicity through the Akt – FGF2 pathway via DNA methylation. **Journal of Biomedical Science**, v.21, n.1, p. 1-11, 2014.

CHMURZYNSKA, A.; MLODZIK, M.A. Genetics of fat intake in the determination of body mass. **Nutrition Research Reviews**, v.30, n.1, p. 106-117, 2017.

CHOI, K.M.; LEE, Y.S.; SIN, D.M.; LEE, S.; LEE, M.K.; LEE, Y.M.; HONG, J.T.; YUN, Y.P.; YOO, H.S. Sulforaphane inhibits mitotic clonal expansion during adipogenesis through cell cycle arrest. **Obesity** (Silver Spring), v.20, p.1365–1371, 2012.

CHOI, S.W.; FRISO, S. Epigenetics: a new bridge between nutrition and health. **Advances Nutrition**. v. 1, p. 1-16, 2010.

CHRISTENSEN, B.C.; HOUSEMAN, E.A.; MARSIT, C.J. Aging and environmental exposures alter tissue-specific DNA methylation dependent upon CpG island context. **PLoS Genetics**, v5, n.8, p.1-13, 2009.

CLAYCOMBE, K.J.; BRISSETTE, C.A.; GHRIB, O. Epigenetics of Inflammation, Maternal Infection, and Nutrition. **Journal of Nutrition**, v.145, n.5, p. 1109-1115, 2015.

COCHRAN, W. G. **Sampling Techniques**. 3rd ed New York: Walter A. Shewhart, p.448, 1977.

COLLARES, R.V.; JR, W.S.; TIRAPELLI, D.P.C.; SANTOS, J.S. The Expression of *LEP*, *LEPR*, *IGF1* and *IL10* in Obesity and the Relationship with microRNAs. **Plos One**, v.9, n.4, p.1-6, 2014.

COOPER, A.J.; FOROUHI, N.G.; YE, Z.; BUIJSSE, B.; ARRIOLA, L.; BALKAU, B.; BARRICARTE, A.; BEULENS, J.W.; BOEING, H.; BÜCHNER, F.L.; DAHM, C.C.; DE LAUZON-GUILLAIN, B.; FAGHERAZZI, G.; FRANKS, P.W.; GONZALEZ, C.; GRIONI, S.; KAAKS, R.; KEY, T.J.; MASALA, G.; NAVARRO, C.; NILSSON, P.; OVERVAD, K.; PANICO, S.; RAMÓN QUIRÓS, J.; ROLANDSSON, O.; ROSWALL, N.; SACERDOTE, C.; SÁNCHEZ, M.J.; SLIMANI, N.; SLUIJS, I. Fruit and vegetable intake and type 2 diabetes: EPIC-Interact prospective study and meta-analysis. **European Journal Clinical Nutrition**, v. 66, n. 10, p. 1082–1092, 2012.

CORBIN, L.J.; TIMPSON, N.J. Body Mass Index: Has Epidemiology Started to Break Down Causal Contributions to Health and Disease?. **Obesity Journal**, v.24,n.8, p. 1630-1638, 2016.

CORNELSEN, L.; GREEN, R.; DANGOUR, A.; SMITH, R. Why fat taxes won't make us thin. **Journal of Public Health**, v. 37, p. 18–23, 2015.

COSTA, M.; J.; C. Nutrição clínica: uso do sistema de equivalentes na prática dietoterápica. 2 ed. João Pessoa: Editora da UFPB. 2013.

CRIDER, K.S.; YANG, T.P.; BERRY, R.J.; BAILEY, L.B. Folate and DNA Methylation: A Review of Molecular Mechanisms and the Evidence for Folate's Role. **Advances Nutrition**, v. 3,n.1, p.21-38, 2012.

Department of Agriculture **Nutrient Data Base**. Disponível em: http://www.nal.usda.gov/fnic/cgi-bin/nut_search.pl (Accessado em 12 Ago 2015).

DESPRES, J.P. Abdominal obesity and cardiovascular disease: is inflammation the missing link?. **Canadian Journal of Cardiology**, v.28,n.6,p.642-652, 2012.

DIAS, M.M.; SOUZA, F.R.; TAKADA, L.; FEITOSA, F.L.; COSTA, R.B.; DIAZ, I.D.; CARDOSO, D.F.; TONUSSI, R.L.; BALDI, F.; ALBUQUERQUE, L.G.; OLIVEIRA, H.N. Study of lipid metabolism-related genes as candidate genes of sexual precocity in Nellore Cattle. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n.1, p. 234 – 243, 2015.

DO AMARAL, C. L.; MILAGRO, F. I.; CURI, R; MARTÍNEZ, J. A. DNA methylation pattern in overweight women under an energy-restricted diet supplemented with fish oil. **Biomed Research International**, v. 2014, p. 1-10, 2014.

DOBBS, R. **How the world could better fight obesity** (McKinsey Global Institute, 2014). Acessado em [12 ago 2017], disponível em: <http://www.mckinsey.com/industries/healthcare-systems-and-services/our-insights/how-the-world-could-better-fight-obesity>.

DOLINOY, D.C.; WEIDMAN, J.R.; WATERLAND, R.A.; JIRTLE, R.L. Maternal genistein alters coat color and protects Avy mouse offspring from obesity by modifying the fetal epigenome. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, p.567–572,2006.

DREHER, M.L.; MAHER, C.V.; KEARNEY, P. The traditional and emerging role of nuts in healthful diets. **Nutrition Reviews**, v.54, p.241-245, 1996.

ESPOSITO, K.; KASTORINI, C.M.; PANAGIOTAKOS, D.B.; GIUGLIANO, D. Mediterranean diet and weight loss: meta-analysis of randomized controlled trials. **Metabolic Syndrome and Related Disorders**, v.9, n.1, p.1-12, 2011.

ESTEGHAMATI, A.; NOSHAD, S.; KHALILZADEH O.; MORTEZA, A.; NAZERI, A.; MEYSAMIE, A.; ESTEGHAMATI, A.; NAKHJAVANI, M. Contribution of serum leptin to metabolic syndrome in obese and nonobese subjects. **Archives of Medical Research**, v. 42, p. 244–251, 2011.

FAN, C.; LIU, X.; SHEN, W.; DECKELBAUM, R.J.; QI, K. The regulation of leptin, leptin receptor and pro-opiomelanocortin expression by n-3 PUFAs in diet-induced obese mice is not related to the methylation of their promoters. **Nutrition Metabolism (Lond)**, v.8,n.31, p. 1-9, 2011.

FAO - Food and Agriculture Organization. **Fats and Fatty Acids in Human Nutrition**. Rome, Italy: **Publishing Policy and Support Branch, Office of Knowledge Exchange, Research and Extension**, FAO, 2010.

FDA – Food and Drug Administration. FDA Takes Step to Remove Artificial Trans Fats from Processed Foods, 2015. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/NewsEvents/ConstituentUpdates/ucm449145.html>

FRANKS, P.W.; LING, C. Epigenetics and obesity: the devil is in the details. **BMC Medicine**, v.21, n.8, p.8-88, 2010.

FERRO-LUZZI, A. Individual food intake survey methods. In: Proceedings of International Scientific Symposium on Measurement and Assessment of Food Deprivation and Undernutrition, Rome, Italy. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, p.101-125, 2002.

FINDEISEN, H.M.; KAHLES, F.K.; BRUEMMER, D. Epigenetic regulation of vascular smooth muscle cell function in atherosclerosis. **Current Atherosclerosis Reports**, v.15, p. 319, 2013.

FINKELSTEIN, J. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. **European Journal of Pediatrics**, v.2, p.40 – 44, 1998.

FISCHLE, W.; WANG, Y.; ALLIS, C.D. Histone and chromatin cross talk. **Current Opinion in Cell Biology**, v.15, p.172–183, 2003.

FONTANA, L.; PARTRIDGE, L.; LONGO, V.D. Extending healthy life span—from yeast to humans. **Science**, v. 328, p. 321–326, 2010.

FRAGA, C. G.; OTEIZA, P. I.; GALLEANO, M. In vitro measurements and interpretation of total antioxidant capacity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1840, n. 2, p. 931-934, 2013.

FRAYLING, T.M.; TIMPSON, N.J.; WEEDON, M.N.; ZEGGINI, E.; FREATHY, R.M.; LINDGREN, C.M.; PERRY, J.R.; ELLIOTT, K.S.; LANGO, H.; RAYNER, N.W.; SHIELDS, B.; HARRIES, L.W.; BARRETT, J.C.; ELLARD, S.; GROVES, C.J.; KNIGHT, B.; PATCH, A.M.; NESS, A.R.; EBRAHIM, S.; LAWLOR, D.A.; RING, S.M.; BEN-SHLOMO, Y.; JARVELIN, M.R.; SOVIO, U.; BENNETT, A.J.; MELZER, D.; FERRUCCI, L.; LOOS, R.J.; BARROSO, I.; WAREHAM, N.J.; KARPE, F.; OWEN,

K.R.; CARDON, L.R.; WALKER, M.; HITMAN, G.A.; PALMER, C.N.; DONEY, A.S.; MORRIS, A.D.; SMITH, G.D.; HATTERSLEY, A.T.; MC CARTHY, M.I. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. **Science**, v. 316, p. 889–894, 2007.

FRIEDEWALD, W.T.; LEVY, R.I.; FREDRICKSON, D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, v.18, p.499-502, 1972.

GAO, Z.; YIN, J.; ZHANG, J.; WARD, R.E.; MARTIN, R.J.; LEFEVRE, M.; CEFALU, W.T.; YE, J. Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. **Diabetes**, v. 58, p.1509–1517, 2009.

GEMMA, C.; SOOKOIAN, S.; ALVARIÑAS, J.; GARCÍA, S.I.; QUINTANAL.; KANEVSKY, D.; GONZÁLEZ, C.D.; PIROLA, C.J. Maternal pregestational BMI is associated with methylation of the *PPARGC1A* promoter in newborns. **Obesity** (Silver Spring), v.17, n.5, p.1032-1039, 2009.

GILBERT, E.R.; LIU, D. Epigenetics: the missing link to understanding beta-cell dysfunction in the pathogenesis of type 2 diabetes. **Epigenetics**, v. 7, p.841–852, 2012.

GODIC, A.; POLJŠAK, B.; ADAMIC, M.; DAHMANE, R. The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.2014, p. 1-6, 2014.

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

GORMSEN, L.C.; NIELSEN, C.; JESSEN, N.; JORGENSEN, J.O.; MOLLER, N. Time-course effects of physiological free fatty acid surges on insulin sensitivity in humans. **Acta physiologica**, v. 201, p. 349-356, 2011.

GRUNDY, S.M.; CLEEMAN, J.I.; DANIELE, S.R. Diagnosis and management of the metabolic syndrome. **Circulation**, v. 112, p. 285 – 290, 2005.

GUAY, S.P.; BRISSON, D.; LAMARCHE, B.; BIRON, S.; LESCELLEUR, O.; BIERTHO, L.; MARCEAU, S.; VOHL, M.C.; GAUDET, B.; BOUCHARD, L. ADRB3 gene promoter DNA methylation in blood and visceral adipose tissue is associated with metabolic disturbances in men. **Epigenomics**, v.6,n.1, p. 33 – 43, 2014.

GUERRERIO, A.L.; COLVIN, R.M.; SCHWARTZ, A.K.; MOLLESTON, J.P.; MURRAY, K.F.; DIEHL, A.; MOHAN, P.; SCHWIMMER, J.B.; LAVINE, J.E.; TORBENSON, M.S. Choline intake in a large cohort of patients with nonalcoholic fatty liver disease. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.95,p.892–900, 2012.

HALES, C.N.; BARKER, D.J. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. **International Journal of Epidemiology**, v.42, p.1215–1222,2013.

HANLEY, B.; DIJANE, J.; FEWTRELL, M.; GRYNBERG, A.; HUMMEL, S.; JUNIEN, C.; KOLETZKO, B.; LEWIS, S.; RENZ, H.; SYMONDS, M.; GROS, M.; HARTHOORN, L.; MACE, K.; SAMUELS, F.; VAN DER BEEK, E.M. Metabolic imprinting, programming and epigenetics a review of present priorities and future opportunities. **British Journal of Nutrition**, v.104, p.1–25, 2010.

HEARD,E., MARTENSSEN,R.A. Transgenerational epigenetic inheritance: myths and mechanisms. **Cell**, v.157,n.1,p.95-109,2014.

HEIJMANS, B.T.; TOBI, E.W.; STEIN, A.D.; PUTTER, H.; BLAUW, G.J.; SUSSER, E.S.; SLAGBOOM, E.; LUMEY, L.H. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, p.17046–17049, 2008.

HENRIKSEN, E.J.; DIAMOND-STANIC, M.K.; MARCHIONNE, E.M. Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes. **Free Radical Biology & Medicine**, v.51,n.1,p. 993-999,2011.

HERBETH, B.; SIEST, G.; HENNY, J. High-sensitivity C-reactive protein (CRP) reference intervals in the elderly. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v.39, p.1169–1170, 2001.

HERMAN, J.G.; GRAFF, J.R.; MYÖHÄNEN, S.; NELKIN, B.D.; BAYLIN, S.B. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG Islands. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.93,n.18,p. 9821-9826,1996.

HERMAN, J.G.; BAYLIN, S.B. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. **The New England Journal of Medicine: Research & Review**, v. 349,p. 2042-2054,2003.

HERMANN, A.; GOWHER, H.; JELTSCH, A. Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 61, p. 2571-2587,2004.

HERMSDORFF, H.H.M.; ZULET, M.A.; PUCHAU, B.; MARTÍNEZ, J.A. Fruit and vegetable consumption and proinflammatory gene expression from peripheral blood mononuclear cells in young adults: a translational study. **Nutrition Metabolism** (Lond), v. 7,n.42, 2010.

HERMSDORFF, H.H.; MANSEGO, M.L.; CAMPIÓN, J. TNF-alpha promoter methylation in peripheral white blood cells: Relationship with circulating TNF α , truncal fat and n-6 PUFA intake in young women. **Cytokine**, v.64, p. 65–271, 2013.

HEYMSFIELD, S.; B.;EBBELING,C.B.;PIETROBELLI,A.;STRAUSS,B.J.;SILVA,A.M.; LUDWI,D.S. Multi-component molecular level body composition reference methods: evolving concepts and future directions. **Obesity Reviews**,v. 16,p. 282–294, p. 1-13, 2015.

HINRICHSSEN, I.; KEMP, M.; PEVELING-OBERHAG, J.; PASSMANN, S.; PLOTZ, G.; ZEUZEM, S.; BRIEGER, A. Promoter methylation of MLH1, PMS2, MSH2 and p16 is a phenomenon of advanced-stage HCCs. **PLoS One**, v.9,n.1,p.1-9, 2014.

HIRAHARA,K.;POHOLEK,A.; VAHEDIETAL, G. “Mechanisms under lying helper T cell plasticity: implications for immune-mediated disease”. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.131,n. 5, p.1276–1287,2013.

HOFFMAN, D.; MARION, D.; CORNATZER, W.; DUERRE, J. S-Adenosylmethionine and S-adenosylhomocystein metabolism in isolated rat liver. Effects of L-methionine, L-homocystein, and adenosine. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 255, p.10822-10827, 1980.

HJORT,L.;JORGENSEN,S.W.;GILLBERG,L.;HALL,E.;BRONS,C.;FRYSTIK,J.;VAAG, A.A.;LING,C. 36 h fasting of young men influences adipose tissue DNA methylation of LEP and ADIPOQ in a birth weight-dependent manne. **Clinical Epigenetics**, v.9,n.40,p.1-12,2017.

HOLLENBECK, C.B. An introduction to the nutrition and metabolism of choline. **Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry**, v.12,p. 100 - 113, 2012.

HOLLIDAY, R. Epigenetics: a historical overview. **Epigenetics**, v. 1, n. 2, p. 76-80, 2006.

HOLLOWAY, G.P.; BONEN, A.; SPRIET, L.L. Regulation of skeletal muscle mitochondrial fatty acid metabolism in lean and obese individuals. **American Journal of Clinical Nutrittion**, v. 89, p. 455-462, 2009.

HOOPER, L.; SUMMERBELL, C.D.; THOMPSON, R.; SILLS, D.; ROBERTS, F.G.; MOORE, H.J.; SMITH, G.D. Reduced or modified dietary fat for preventing cardiovascular disease. **São Paulo Medical Journal**, v.134, p. 182 - 183 ,2016.

HOUDE, A.A.; LEGARE, C.; BIRON, S.; LESCELLEUR, O.; BIERTHO, L.; MARCEAU, S.;TCHERNOF, A.; VOHL, M.C.; HIVERT, M.F.; BOUCHARD, L. Leptin and adiponectin DNA methylation levels in adipose tissues and blood cells are associated with BMI, waist girth and LDL-cholesterol levels in severely obese men and women. **BMC Medical Genetics**, v.16,n.29, p. 1-10,2015.

HUANG, T.; ZHENG, J.; CHEN, Y.; YANG,B.; WAHLQVIST, M.L.;LI, D. High consumption of omega-3 polyunsaturated fatty acids decrease plasma homocysteine: a meta analysis of randomized, placebo-controlled trials, **Nutrition**, v.27,p.863–867,2011.

IBGE.INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA . **Contagem da população 2010**. Rio de Janeiro: Ministério do Planejamento, 2010.

INGROSSO, D.; PERNA, A. Epigenetics in hyperhomocysteinemic states. A special focus on uremia. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1790, n.9, p. 892 – 899, 2009.

JABLONKA, E.; LAMB, M.J. The changing concept of epigenetics. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.981, p. 82–96, 2002.

JACOBSEN, S.C.; BRONS,C.; BORK-JENSEN, J.;RIBEL-MADSEN,R.; YANG,B.; LARA,E.; HALL,E.; CALVANESE,V.; NILSSON,E.;JORGENSEN,S.W.; MANDRUP,S.; LING,C.; FERNANDEZ, A.F.; FRAGA, M.F.; POULSEN, P.; VAAG, A. Effects of short-term high fat overfeeding on genome-wide DNA methylation in the skeletal muscle of healthy young men. **Diabetologia**, v.55, p. 3341–3349, 2012.

JANESICK,A.; BLUMBERG,B. Obesogens, stem cells and the developmental programming of obesity. **International Journal of Andrology**, v.35,n.3,p.437-448,2012.

JAVED, A.;JUMEAN,M.;MURAD,M.H.;OKORODUDU,D.;KUMAR,S.;SOMERS,V.K.; SOCHOR,O.; LOPEZ-JIMENEZ,F. Diagnostic performance of body mass index to identify obesity as defined by body adiposity in children and adolescents: a systematic review and meta-analysis. **Pediatric Obesity**, v. 10,p. 234–244, 2015.

JENNINGS, E. Folic acid as a cancer-preventing agent. **Medicine Hypotheses.**, v.45,p. 297–303, 1995.

JIANG, M.; ZHANG, Y.; LIU, M.; LAN, M.S.; FEI, J.; FAN, W.; GAO, X.; LU, D. Hyper- methylation of hepatic glucokinase and L-type pyruvate kinase pro- moters in high-fat diet-induced obese rats. **Endocrinology**, v.152, p.1284– 1289, 2011.

JIMENEZ-CHILLARON, J. C., DIAZ, R., MARTINEZ, D., PENTINAT, T., RAMON-KRAUEL, M. The role of nutrition on epigenetic modifications and their implications on health. **Biochimie**, v. 94, p.2242–2263, 2012.

JONES, P.A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. **Nature Reviews Genetics**, v.13, p.484–492, 2012.

KAC, G.; SICHIERI, R.; GIGANTE, D. P. **Epidemiologia Nutricional**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz/ Editora Atheneu, 2007. 580p.

KALHAN, S.C., MARCZEWSKI, S.E. Methionine, homocysteine, one carbon metabolism and fetal growth. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v.13, p.109 – 119, 2012.

KAPTOGE, S.; DI ANGELANTONIO, E.; LOWE, G.; PEPYS, M.B.; THOMPSON, S.G.C-reactive protein concentration and risk of coronary heart disease, stroke, and mortality: an individual participant meta-analysis. **Lancet**, v. 375, n.4, p.132–140, 2010.

KARBEK, B.; ÖZBEK, M.; BOZKURT, N.C.; GINIS, Z.; GÜNGÜNES, A.; ÜNSAL, I.Ö.; CAKAL, E.; DELIBASI, T. Heart-type fatty acid binding protein (H-FABP): relationship with arterial intima-media thickness and role as diagnostic marker for atherosclerosis in patients with impaired glucose metabolism. **Cardiovascular Diabetology**, v.10, p.37, 2011.

KATAYAMA, Y.; TAKAHASHI, M.; KUWAYAMA, H. *Helicobacter pylori* causes runx3 gene methylation and its loss of expression in gastric epithelial cells, which is mediated by nitric oxide produced by macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.388, p.496-500, 2009.

KASS, S.U.; LANDSBERGER, N.; WOLFFE, A.P. DNA methylation directs a time-dependent repression of transcription initiation. **Current biology**, v.73, n.3, p. 157–165, 1997.

KAUL, S.; ZADEH, A.A.; SHAH, P.K. Homocysteine Hypothesis for Atherothrombotic Cardiovascular Disease: Not Validated. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 48, p.914-923, 2006.

KAUWELL, G. P. Epigenetics: what it is and how it can affect dietetics practice. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 108, n. 6, p.1056-1059, 2008.

KHAZAMIPOUR, N.; NORUZINIA, M.; FATEHMANESH, P.; KEYHANEE, M.; PUJOL, P. MTHFR promoter hypermethylation in testicular biopsies of patients with non-obstructive azoospermia: the role of epigenetics in male infertility. **Human Reproduction**, v.24, n.9, p.2361-2364, 2009.

KHOUBNASABJAFARI, M.; ANSARIN, K.; JOUYBAN, A. Salivary malondialdehyde as an oxidative stress biomarker in oral and systemic diseases. **Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects**, v. 10, n. 2, p. 71-75, 2016.

KHVOROVA A, REYNOLDS A, JAYASENA SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. **Cell**, v.115, p. 209–216, 2003.

KIM, S.; LEE, U.J.; KIM, M.N. MicroRNA miR-199a* regulates the MET proto-oncogene and the downstream extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2). **The Journal of Biological Chemistry**, v.283, p. 18158–18166, 2008.

KIM, G.H.; RYAN,J.J.; ARCHER, S.L. The Role of Redox Signaling in Epigenetics and Cardiovascular Disease. **Antioxidants e Redox Signaling**, v. 18, n.5, p. 1920 – 1936, 2013.

KINOSHITA, M.; KAYAMA, H.; KUSU, T.; YAMAGUCHI, T.; KUNISAWA, J.; KIYONO, H.; SAKAGUCHI, S.; TAKEDA, K. Dietary folic acid promotes survival of Foxp3⁺ regulatory T cells in the colon. **The Journal of Immunology**,v.189,p.2869–2878,2012.

KIZHAKEKUTTU, T.J.; WIDLANSKY, M.E. Natural antioxidants and hypertension: promise and challenges. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 28,n.4,p. 20-32,2010.

KOLB, A.F.; PETRIE, L. Folate deficiency enhances the inflammatory response of macrophages. **Molecular Immunology**, v. 54, p. 164–172, 2013.

KOZA, R.A.; NIKONOVA, L.; HOGAN, J.; RIM, J.S.; MENDOZA, T.; FAULK, C.; SKAF, J.; KOZAK, L.P. Changes in gene expression foreshadow diet-induced obesity in genetically identical mice. **PLoS Genetics**, v. 2, p. 1–12, 2006.

KRISHNA, S.M.; DEAR, A.; CRAIG, J.M.; NORMAN, P.E.; GOLLEDGE, J. The potential role of homocysteine mediated DNA methylation and associated epigenetic changes in abdominal aortic aneurysm formation. **Atherosclerosis**, v. 228, n. 2, p. 295–305, 2013.

KUO, K.; CALE, S.; McDOWELL, I. Standardization (External and Internal) of HPLC Assay for Plasma Homocysteine. **Clinical Chemistry**, v. 43, n. 9, p. 1–9, 1997.

KURYLOWICZ, A.; JONAS, M.; LISIK, W.; JONAS, M.; WICIK, Z.A.; WIERZBICKI, Z.; CHMURA, A.; PUZIANOWSKA-KUZNICKA, M. Obesity is associated with a decrease in expression but not with the hypermethylation of thermogenesis – related genes in adipose tissues. **Journal of Translational Medicine**, v. 13, n. 31, p. 1–10, 2015.

KÜHNEN, P.; HANDKE, D.; WATERLAND, R.A.; HENNIG, B.J.; SILVER, M.; FULFORD, A.J.; DOMINGUEZ-SALAS, P.; MOORE, S.E.; PRENTICE, A.M.; SPRANGER, J.; HINNEY, A.; HEBEBRAND, J.; HEPPNER, F.L.; WALZER, L.; GRÖTZINGER, C.; GROMOLL, J.; WIEGAND, S.; GRÜTERS, A.; KRUDE, H. Interindividual Variation in DNA Methylation at a Putative POMC Metastable Epiallele Is Associated with Obesity. **Cell Metabolism**, v. 24, n. 3, p. 502–509, 2016.

LANDETE, J.M. Dietary intake of natural antioxidants: vitamins and polyphenols. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, n. 7, p. 706–721, 2013.

LEIBOWITZ, K.L.; MOORE, R.H.; AHIMA, R.S.; STUNKARD, A.J.; STALLINGS, V.A.; BERKOWITZ, R.I.; CHITTAMS, J.L.; FAITH, M.S.; STETTLER, N. Maternal

obesity associated with inflammation in their children. **World Journal of Pediatrics**, v. 8,p. 76-79, 2012.

LEMAITRE, R.N.; KING, I.B.; MOZAFFARIAN, D.; SOTOODEHNIA, N.; REA, T.D.; KULLER, L.H.; TRACY, R.P.; SISCOVICK, D.S. Plasma phospholipid trans fatty acids, fatal ischemic heart disease, and sudden cardiac death in older adults: the Cardiovascular Health Study. **Circulation**, v. 114, p.209–215, 2006.

LENTZ, S. R. Mechanisms of homocysteine-induced atherothrombosis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.3, n.8, p. 1646–1654, 2005.

LEVIAN, C.; RUIZ, E.; YANG, X. The Pathogenesis of Obesity from a Genomic and Systems Biology Perspective. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 87,n.2,p.113-126,2014.

LEWIS, B.P.; BURGE, C.B.; BARTEL, D.P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. **Cell**, v.120,n.1,p. 15–20,2005.

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

LICHTENSTEIN,A.H.; APPEL,L.J.; BRANDS, M. “Diet and lifestyle recommendations revision 2006: a scientific statement from the American heart association nutrition committee”. **Circulation**, v. 114, n. 1, p. 82–96, 2006.

LICINIO, J.; CAGLAYAN, S.; OZATA, M.; YILDIZ, B.O.; DE MIRANDA, P.B.; O'KIRWAN, F.; WHITBY, R.; LIANG, L.; COHEN, P.; BHASIN, S.; KRAUSS, R.M.; VELDHUIS, J.D.; WAGNER, A.J.; DEPAOLI, A.M.; MCCANN, S.M.; WONG, M.L. Phenotypic effects of leptin replacement on morbid obesity, diabetes mellitus, hypogonadism, and behavior in leptin-deficient adults. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n.13, p. 4531–4536, 2004.

LICINIO, J.; MILANE, M.; THAKUR, S.; WHELAN, F.; YILDIZ, B.O.; DELIBASI, T.; DE MIRANDA, P.B.; OZATA, M.; BOLU, E.; DEPAOLI, A.; WONG, M.L. Effects of leptin on intake of specific micro- and macronutrients in a woman with leptin gene deficiency studied off and on leptin at stable body weight. **Appetite**, v.49, n.3, p. 594 – 599, 2007.

LILLYCROP, K. A.; HOILE, S. P.; GRENFELL, L; BURDGE, G. C. DNA methylation, ageing and the influence of early life nutrition. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 73, n. 3, p. 413-421, 2014.

LIMA, F. E. L.; LATORRE, M. R. D. O.; COSTA, M. J. C.; FISBERG, R. M. Diet and cancer in Northeast Brazil: evaluation of eating habits and food group consumption in relation to breast cancer. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 4, p. 820-828, 2008.

LOCHE, E.; OZANNE, S. E. Early nutrition, epigenetics, and cardiovascular disease. **Current Opinion in Lipidology**, v 27, p. 449–458, 2016.

LOCKE, A.E.; KAHALI, B.; BERNDT, S.I.; JUSTICE, A.E.; PERS, T.H.; DAY, F.R. Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. **Nature**, v. 518, p. 197–206, 2015.

LOMBA, A. ; MILAGRO, F.I.; GARCÍA-DÍAZ, D.F. Obesity induced by a pair-fed high fat sucrose diet: methylation and expression pattern of genes related to energy homeostasis. **Lipids Health Disease**, v.9,n.60, p. 1-10, 2010.

LOPES-VIRELLA ,M.F.; HUNT, K.J.; BAKER, N.L.; VIRELLA, G.; MORITZ, T. The levels of MDA-LDL in circulating immune complexes predict myocardial infarction in the VADT study. **Atherosclerosis**, v. 224, p.526–531,2012.

LOPOMO, A.; BURGIO, E.; MIGLIORE. Epigenetics of Obesity. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v.140, p.151-184,2016.

LUND, G.; ZAINA, S. Atherosclerosis: an epigenetic balancing act that goes wrong. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 13, p.208–214, 2011.

MANCO, M. Metabolic syndrome in childhood from impaired carbohydrate metabolism to nonalcoholic fatty liver disease. **Journal American College Nutrition**, v.30,p. 295-298, 2011.

MANORE, M.; THOMPSON, J. Sport nutrition for health and performance. **Champaign: Human Kinetics Publishers**, p. 61 – 103, 2000.

MARCO, A.; KISLIOUK, T.; TABACHNIK, T.; MEIRI, N.; WELLER, A. Overweight and CpG methylation of the *Pomc* promoter in offspring of high-fat-diet-fed dams are not “reprogrammed” by regular chow diet in rats. **The Faseb Journal**, v. 28, n. 9, p. 4148 – 4157, 2014.

MARTINEZ, J.A.; FERMÍN, I.M.; CLAYCOMBE, J.K.; SCHALINSKE, K.L. Epigenetics in Adipose Tissue, Obesity, Weight Loss, and Diabetes. **Advances in nutrition**, v.5,p.71-81,2014.

MASON, J. C.; LIBBY, P. Cardiovascular disease in patients with chronic inflammation: mechanisms under lying premature cardiovascular events in rheumatologic conditions. **European Heart Journal**, v.36,n.8, p.482 – 489, 2015.

MATHERS, J.C. Session 2: Personalised nutrition. Epigenomics: a basis for understanding individual differences?. **Proceedings of The Nutrition Society**, v.67, p.390–394, 2008.

MAUGGHAN, R.; GLEESON, M.; GREENHAFF, P.L. **Bioquímica do exercício e do treinamento**. São Paulo: Editora Manole, p.89 – 115, 2000.

MCALLISTER,E.J.; DHURANDHAR,N.V.; KEITH,S.W.; ARONNE,L.J.; BARGER,J.; BASKIN,M.; BENCA,R.; BIGGIO,J.; BOGGIANO,M.M.;EISENMANN,J.C.;ELOBEI D,M.; FONTAINE,K.R.;GLUCKMAN,P.; HANLON,E.C.;KATZMARZYK,P.; PIETRO BELLI,A.; REDDEN,D.T.; RUDEN,D.M.; WANG,C.; WATERLAD,R.A.; WRIGHT,S. M.; ALLISON,DD.B. Ten putative contributors to the obesity epidemic. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 49, p.868–913,2009.

MCKAY, J.A.; GROOM, A.; POTTER, C. Genetic and non- genetic influences during pregnancy on infant global and site-specific DNA methylation: role for folate gene variants and vitamin B (12). **PLoS One**, v.7,n.3, p. 1-9, 2012.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, p. 428–435, 2008.

MEI, W.; RONG, Y.; JINMING, L.; YONGJUN, L.; HUI, Z. Effect of homocysteine interventions on the risk of cardio-cerebrovascular events: a meta-analysis of randomized controlled trials. **International journal of clinical practice**, v.64,n. 2, p. 208–215, 2010.

MICHA, R.; MOZAFFARIAN, D. Trans fatty acids: effects on metabolic syndrome, heart disease and diabetes. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 5, p. 335–344, 2009.

MICHA, R.; KING, I.B.; LEMAITRE, R.N.; RIMM, E.B.; SACKS, F.; SONG, X.; SISCOVICK, D.S.; MOZAFFARIAN, D. Food sources of individual plasma phospholipid trans fatty acid isomers: the Cardiovascular Health Study. **American Journal Clinical Nutrition** , v. 91, p.883–893, 2010.

MILAGRO, F.I.; CAMPIÓN, J.; GARCÍA-DÍAZ, D.F.; GOYENECHEA, E.; PATERNAIN, L.; MARTÍNEZ, J.A. High fat diet-induced obesity modifies the methylation pattern of leptin promoter in rats. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 65, p. 1-9, 2009.

MILAGRO, F.I.; GÓMEZ-ABELLÁN, P.; CAMPIÓN, J. CLOCK, PER2 and BMAL1 DNA methylation: association with obesity and metabolic syndrome characteristics and monounsaturated fat intake. **Chronobiology International Journal**, v. 29, p.1–15, 2012.

MILAGRO, F. I.; MORENO-ALIAGA, M. J.; MARTINEZ, J. A. FTO obesity variant and adipocyte browning in humans. **The New England Journal of Medicine**, v. 374,p. 190–191, 2016.

MONTAGUE, C. T.; FAROOQI, I. S.; WHITEHEAD, J. P, SOOS, M. A.; RAU, H.; WAREHAM, N. J.; SEWTER, C.P.; DIGBY, J.E.; MOHAMMED,S.N.; HURST, J.A.;

CHEETHAM, C.H.; EARLEY, A.R.; BARNETT, A.H.; PRINS, J.B.; O'RAHILLY, S. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. **Nature**, v. 378, p. 903 – 908, 1997.

MOZAFFARIAN, D.; RIMM, E.B.; KING, I.B.; LAWLER, R.L.; MCDONALD, G.B.; LEVY, W.C. trans Fatty acids and systemic inflammation in heart failure. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 80, p.1521– 1525,2004.

MSM – The Multiple Source Method. **Departament of Epidemiology of the German Institute of Human Nutrition Potsdam – Rehbrücke** [acesso em 17 nov 2014]. Disponível em <https://msm.dife.de/tps/msm/>.

MUTCH, D.M.; WAHLI, W.; WILLIAMSON, G. Nutrigenomics and nutrigenetics: the emerging faces of nutrition. **The Faseb Journal**, v.19, p. 1602–1616, 2005.

NAGOYA DECLARATION, The 8th asia-oceania conference on obesity. **AOCO**, 2015. Disponível em: <http://www.jasso.or.jp/data/data/pdf/nagoya2015.pdf>. Acesso em: 08/07/2017.

NEMETH, A.; LANGST, G. Chromatin higher order structure: opening up chromatin for transcription. **Briefings in Functional Genomics**, v. 2,p. 334–343, 2004.

NORDESTGAARD, B.G.; ADOURIAN, A.S.;FREIBERG, J. J.; GUO, Y.;MUNTENDAM, P.; FALK, E. Risk factors for near-term myocardial infarction in apparently healthy men and women.. **Clinical Chemistry**, v. 56, p. 559-567, 2010.

NÚÑEZ-CÓRDOBA, J.M.; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, M.A. Antioxidant vitamins and cardiovascular disease. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, n.14, p. 1861–1869, 2011.

ODA, E. ; KAWAI, R. Comparison between high-sensitivity c-reactive protein (hs-crp) and white blood cell count (WBC) as an inflammatory component of metabolic syndrome in japanese. **Internal Medicine**, v. 49, p. 117-124, 2010.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95,n.2, p.351-358, 1979.

OLIVER,E.;MCGILLICUDDY,F.;PHILLIPS,C;TOOMEY,S.;ROCHE, H.M. Postgraduate Symposium: the role of inflammation and macrophage accumulation in the development of obesity-induced type 2 diabetes mellitus and the possible therapeutic effects of long-chain n-6 PUFA. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 69, n. 2, p. 232-243, 2010.

ONG, C.T., CORCES, V.G. Enhancer function: new insights into the regulation of tissue-specific gene expression. **Nature Reviews Genetics**, v.12, n.4, p.283-293, 2011.

ORDOVAS,J.M. Genetic influences on blood lipids and cardiovascular disease risk: tools for primary prevention. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 89,n.5,1509 – 1517,2009.

ORDOVÁS, J.M.; SMITH, C.E. Epigenetics and cardiovascular disease. **Nature Reviews Cardiology**, v.7, n. 9, p. 510-519, 2010.

ORDOVAS, J.M.; ROBERTSON, R.; CLEIRIGH, E.N. Gene-gene and gene-environment interactions defining lipid-related traits. **Current Opinion in Lipidology**, v.22, p.129-136, 2011.

PARDINA, E.; FERRER, R.; BAENA-FUSTEQUERAS, J.A, LECUBE, A.; FORT, J.M.; VARGAS, V.; CATALÁN, R.; PEINADO-ONSURBE, J. The relationship between IGF-1 and CRP, NO, leptin, and adiponectin during weight loss in the morbidly obese. **Obesity Surgery**, v. 20, n. 5, p. 623-632,2010.

PEREZ-MARTINEZ, P.; MORENO-CONDE, M.; CRUZ-TENO, C.; RUANO, J.; FUENTES, F. Dietary fat differentially influences regulatory endothelial function during the postprandial state in patients with metabolic syndrome: from the LIPGENE study. **Atherosclerosis**, v. 209, p.533-538, 2010.

PFEIFFER, C.M.; HUFF, D.L.; GUNTER, E.W. Rapid and accurate HPLC assay for plasma total Homocysteine and Cysteine in a clinical laboratory setting. **Clinical Chemistry**, v. 49,n.2, p.290-292, 1999.

PFEIFFER, L.; WAHL, S.; PILLING, L.; CREISCHL, E.; SANDLING, J.K.; KUNZE, S.; HOLDT, L.M.; KRETSCHMER, A.; SCHRAMM, K.; ADAMSKI, J.; KLOPP, N.; ILLIG, T.; HEDMAN, Å.K.; RODEN, M.; HERNANDEZ, D.G.; SINGLETON, A.B.; THASLER, W.E.; GRALLERT, H.; GIEGER, C.; HERDER, C.; TEUPSER, D.; MEISINGER, C.; SPECTOR, T.D.; KRONENBERG, F.; PROKISCH, H.; MELZER, D.; PETERS, A.; DELOUKAS, P.; FERRUCCI, L.; WALDENBERGER, M. DNA Methylation of Lipid-Related Genes Affects Blood Lipid Levels. **Circulation: Cardiovascular Genetics**,v.8,n.2, p.334 – 342, 2015.

PHEIFFER, C.; DIAS, S.; MULLER, C.; LOUW, J. Decreased global DNA methylation in the white blood cells of high fat diet fed vervet monkeys (*Chlorocebus aethiops*). **Journal of Physiology and Biochemistry**, v.70, n.3,p.725-733,2014.

PERFILYEV,A.; DAHLMAN,I.; GILLBERG,L.;, ROSQVIST,F.; IGGMAN,D.; VOLKOV,P.; NILSSON,E.; RISERUS, U.; LING,C. Impact of polyunsaturated and saturated fat overfeeding on the DNA-methylation pattern in human adipose tissue: a randomized controlled trial. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.8,p.1-10,2017.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55-74, 2015.

PITANGA, F. J. G; LESSA, I. Razão cintura-estatura como discriminador do risco coronariano de adultos. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.5, n.23, p. 157-161, 2006.

PRESCOTT S., SAFFERY R. The role of epigenetic dysregulation in the epidemic of allergic disease. **Clinical Epigenetics**, v.2,n.2, p.223–232, 2011.

PROGRIBNY, I.P.; SHPYLEVA, S.I.; MUSKHELISHVILI, L.; BAGNYUKOVA, T.V.; JAMES, S.J.; BELAND, F.A. Role of DNA damage and alterations in cytosine DNA methylation in rat liver carcinogenesis induced by a methyl-deficient diet. **Mutation research**, v.669, p.56-62, 2009.

PUGLIESE, S.C.; POTH, J. M.; FINI, M. A.; OLSCHESKI, A.; EL KASMI, K.C.; STENMARK, K.R. The role of inflammation in hypoxic pulmonary hypertension: from cellular mechanisms to clinical phenotype. **The American Journal of Physiology—Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 308, n. 3, p. 229– 252, 2015.

RAINS, J.L.; JAIN, S.K. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 50, n.5, p.567–575, 2011.

RANI, A. J.; MYTHILI, S. V. Study on Total Antioxidant Status in Relation to Oxidative Stress in Type 2 Diabetes Mellitus. **Journal of Clinical Diagnostic and Research**, v. 8, n. 3, p. 108–110, 2014.

RAVELLI, G. P.; STEIN, Z. A.; SUSSER, M. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. **The New England Journal of Medicine**, v. 295, p.349–353, 1976.

RODRIGUEZ, A.; GRIFFITHS-JONES, S.; ASHURST, J.L.; BRADLEY, A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. **Genome Research**, v.14, n.10, p.1902–1910, 2004.

ROS, E.; MATAIX, J. Fatty acid composition of nuts. Implications for cardiovascular health. **British Journal Nutrition**, v.96, p.29-35, 2006.

SAHAKYAN, K.R.; SOMERS, V.K.; RODRIGUEZ-ESCUDERO, J.P.; HODGE, D.O.; CARTER, R.E.; SOCHOR, O.; COUTINHO, T.; JENSEN, M.D.; ROGER, V.L.; SINGH, P.; LOPEZ-JIMENEZ, F. Normal-weight central obesity: implications for total and cardiovascular mortality. **Annals of Internal Medicine**, v. 163, p.827–835, 2015.

SANDERS, T.A.; FILIPPOU, A.; BERRY, S.E.; BAUMGARTNER, S.; MENSIK, R.P. Palmitic acid lipid metabolism. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 94, p.1433-1441, 2011.

SANDOVICI, I.; SMITH, N.H.; NITERT, M.D.; ACKERS-JOHNSON, M.; URIBE-LEWIS, S. Maternal diet and aging alter the epigenetic control of a promoter-enhancer interaction at the Hnf4a gene in rat pancreatic islets. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, p. 5449–5454, 2011.

SASAKI, A.; DE VEGA, W.; SIVANATHAN, S.; ST-CYR, S.; MCGOWAN, P.O. Maternal high-fat diet alters anxiety behavior and glucocorticoid signaling in adolescent offspring. **Neuroscience**, v. 272, p. 92–101, 2014.

SCHEEN, A.J.; JUNIEN, C. Epigenetics, interface between environment and genes: role in complex diseases. **Revue Medicale de Liege**, v.67, p. 50–257, 2012.

SCHUBELER, D. Function and information content of DNA methylation. **Nature**, v.517,n.7534,p.321-326, 2015.

SCHWENK, R.W.; VOGEL, H.; SCHURMANN, A. Genetic and epigenetic control of metabolic health. **Molecular Metabolism**, v. 2,n.4,p.337-347,2013.

SCHWENK, R.W.; JONAS, W.; ERNST, S.B.; KAMMEL, A.; JÄHNERT, M.; SCHÜRMANN, A. Differences in Promoter Methylation accompany diet-dependent Alterations of Hepatic Scd1 Expression. **Hormone and Metabolic Research**, v.45, p. 786–794, 2013a.

SEABOLT, L.; A.; WELCH, E.; B.; SILVER, H.; J. Imaging methods for analyzing body composition in human obesity and cardiometabolic disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1353, p. 41–59, 2015.

SEBEDIO, J.L.; CHRISTIE, W.W. **The AOCS Lipid Library: metabolism of trans polyunsaturated fatty acids formed during frying** [Internet]. 2009 [updated 2009 May 12; cited 2015 May 18]. <http://lipidlibrary.aocs.org/frying/n-tpufa/index.htm>.

SELHUB, J. Homocysteine metabolism. **Annual Review of Nutrition**, v. 19, p.217-246, 1999.

SELLAYAH, D., CAGAMPANG, F. R.; COX, R. D. On the evolutionary origins of obesity: a new hypothesis. **Endocrinology**, v. 155, p.1573–1588, 2014.

SEYEDNASROLLAH, F.; MÄKELÄ, J.; PITKÄNEN, N.; JUONALA, M.; HUTRI-KÄHÖNEN, N.; LEHTIMÄKI, T.; VIKARI, J.; KELLY, T.; LI, C.; BAZZANO, L.; ELO, L.L.; RAITAKARI, O.T. Prediction of Adulthood Obesity Using Genetic and Childhood Clinical Risk Factors in the Cardiovascular Risk in Young Finns Study, **Circulation: Cardiovascular Genetics**, v.10,n.3, 2017.

SHAO, W.; YU, Z.; CHIANG, Y.; YANG, Y.; CHAI, T.; FOLTZ, W.; LU, H.; FANTUS, I.G.; JIN, T. Curcumin prevents high fat diet induced insulin resistance and obesity via attenuating lipogenesis in liver and inflammatory pathway in adipocytes. **PLoS ONE**, v.7,n.1, p. 1- 10, 2012.

SHEN, W.; WANG, C.; XIA, L.; FAN, C.; DONG, H.; DECKELBAUM, R. J.; QI, K. Epigenetic modification of the leptin promoter in diet-induced obese mice and the effects of N-3 polyunsaturated fatty acids. **Scientific Reports**, v. 4, p. 1 -8, 2014.

SHORTER, K.R.; FELDER, M.R.; VRANA, P.B. Consequences of dietary methyl donor supplements: Is more always better?. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v.15,p.14-20, 2015.

SIEGEL S. Estatística não paramétrica para as ciências do comportamento. **McGraw-Hill do Brasil**: São Paulo, 1977.

SILVA, A.H.A.; MORAES, R.M.; COSTA, M.J.C. **Plano amostral utilizando amostragem estratificada juntamente com amostragem sistemática para aplicação do Inquérito nutricional do município de João Pessoa, Paraíba**. Disponível em: http://www.de.ufpb.br/~ronei/AnaHerminia2009Escola_Amostragem2009.pdf . Acesso em 20 mar 2014.

SILVA, J. P.; LAMBERT, G.; BOOVEN, D. V.; WAHLESTDT, C. Epigenomic and metabolic responses of hypothalamic POMC neurons to gestational nicotine exposure in adult offspring. **Genome Medicine**, v. 8, n. 1, p. 93, 2016.

SIMOPOULOS, A.P. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.54, n.3, p.438-463, 1991.

SINCLAIR, K.D.; ALLEGRUCCI, C.; SINGH, R.; GARDNER, D.S.; SEBASTIAN, S.; BISPHAM, J.; THURSTON, A.; HUNTLEY, J.F.; REES, W.D.; MALONEY, C.A. DNA methylation, insulin resistance, and blood pressure in offspring determined by maternal periconceptional B vitamin and methionine status. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, p. 19351 – 19356, 2007.

SINGHAL, G.; JAEHNE, E.J.; CORRIGAN, F.; C.TOBEN, AND B.T.BAUNE. Inflammasomes in neuroinflammation and changes in brain function: a focused review. **Frontiers in Neuroscience**, v. 8, n.315, p. 1-13, 2014.

SLATKIN, M. Epigenetic inheritance and the missing heritability problem. **Genetics**, v.182, p.845–850, 2009.

Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose**. Arquivo Brasileiro de Cardiologia, v.109, n.2, p. 1-90, 2017.

SONG, Y.; PARK, M.J.; PAIK, H.Y.; JOUNG, H. Secular trends in dietary patterns and obesity-related risk factors in Korean adolescents aged 10–19 years. **International Journal of Obesity**, v. 34, p. 48–56, 2010.

SPROUL, D.; MEEHAN, R.R. Genomic insights into cancer-associated aberrant CpG island hypermethylation. **Briefings in Functional Genomics**, v.12, n.3, p.174-190, 2013.

SUN, J.; WANG, Y.; CUI, W.; LOU, Y.; SUN, G.; ZHANG, D.; MIAO, L. Role of Epigenetic Histone Modifications in Diabetic Kidney Disease Involving Renal Fibrosis. **Journal of Diabetes Research**, v.2017, p.1 – 11, 2017.

SWITZENY, O. J.; MÜLLNER, E.; WAGNER, K.; BRATH, H.; AUMÜLLER, E.; HASLBERGER, A. G. Vitamin and antioxidant rich diet increases MLH1 promoter DNA methylation in DMT2 subjects. **Clinical Epigenetics**, v. 4, n. 1, p. 19, 2012.

TAMAKOSHI, K.; TOYOSHIMA, H.; MATSUSHITA, K.; OKAMURA, T.; HAYAKAWA, T.; OKAYAMA, A.; UESHIMA, H. White blood cell count and risk of all-cause and cardiovascular mortality in nationwide sample of Japanese. **Circulation journal**, v. 71, p. 479-485, 2007.

TAMMEN, S.A.; FRISO, S.; CHOI, S.W. Epigenetics: the link between nature and nurture. **Molecular Aspects of Medicine**, v.34, p.753–764, 2012.

TIRAPEGUI, J. **Nutrição, metabolismo e suplementação na atividade física**. São Paulo: Editora Atheneu, p. 39 -49, 2005.

TOUVIER, M.; FEZEU, L.; AHLUWALIA, N.; JULIA, C.; CHARNAUX, N. Association between prediagnostic biomarkers of inflammation and endothelial function and cancer risk: a nested case-control study. **American Journal of Epidemiology**, v.177, n.6, p. 3–13, 2013.

TSIMIKAS, S.; MIYANOHARA, A.; HARTVIGSEN, K.; MERKI, E.; SHAW, P.X.; CHOU, M.Y.; PATTISON, J.; TORZEWSKI, M.; SOLLORS, J.; FRIEDMANN, T. Human oxidation-specific antibodies reduce foam cell formation and atherosclerosis progression. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 58, p.1715–1727, 2011.

TVRZICKA, E.; KREMMYDA, L-S.; STANKOVA, B.; ZAK, A. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease—a review. Part 1: classification, dietary sources and biological functions. **Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky**, v. 155, p. 117–130, 2011.

USDA - Department of Agriculture. **Report of the Dietary Guidelines Advisory Committee on the Dietary Guidelines for Americans: to the Secretary of Agriculture and the Secretary of Health and Human Services.** Washington, DC: USDA and US DHHS, 2010.

VAN MEER, G.; VOELKER, D.R.; FEIGENSON, G.W. Membrane lipids: where they are and how they behave. **Nature Reviews**, v. 9, p. 112 – 124, 2008.

VANVLIET-OSTAPTCHOUK,J.V.;SNIEDER,H.;LAGOU,V. Gene–Lifestyle Interactions in Obesity. **Current Nutrition Reports**, v.1,n.3,p.184-196,2012.

VAN WIJK, C.J.; WATKINS, R.J.; HAGEMAN, J.C.; SIJBEN, P.G.; KAMPHUIS, R.J.; WURTMAN, L.M.; BROERSEN. Combined dietary folate, vitamin B-12, and vitamin B-6 intake influences plasma docosahexaenoic acid concentration in rats. **Nutrition Metabolism**, v.9,p.49,2012.

VANNUCCHI,H.; MONTEIRO, T.H. Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes Ácido Fólico. **International Life Sciences Institute do Brasil**, v.10, p. 1- 24, 2010.

VEL SZIC, K.S.; DECLERCK,K.; VIDA KOVI,M.;BERGHE, W.V. From inflammaging to healthy aging by dietary lifestyle choices: is epigenetics the key to personalized nutrition?. **Clinical Epigenetics**, v. 7,p.33, 2015.

VENDEL,N.L; KROGAGER, T.P.; YOUNG, C.; FERRERI, C.; CHATGILIALOGLU, C.; NØRREGAARD, J. O.; ENGHILD, J.J. Effects of elaidic acid on lipid metabolism in HepG2 cells, investigated by an integrated approach of lipidomics, transcriptomics and proteomics. **PLoS One**, v.8, p. 1-17,2013.

VOISIN, S.; ALMÉN, S.M.; MOSCHONIS,G.; CHROUSOS, G.P.; MANIOS, M.; SCHIÖTH, H.B. Dietary fat quality impacts genome-wide DNA methylation patterns in a cross-sectional study of Greek preadolescents. **European Journal of Human Genetics**, v. 23, p. 654–662, 2015.

WALD, D. S.; BESTWICK, J. P. C-reactive protein measurement and cardiovascular disease. **Lancet**, v. 375, n. 9720, p. 1077-1078, 2010.

WANG, S.C.; OELZEB, S. Age-specific epigenetic drift in late onset Alzheimer's disease. **PLoS ONE**, v.3, n.7, p. 1-12, 2008.

WANG, Y.; LUK, A.O. Independent predictive roles of eotaxin Ala23Thr, paraoxonase 2 Ser311Cys and beta-adrenergic receptor Trp64Arg polymorphisms on cardiac disease in Type 2 Diabetes—an 8-year prospective cohort analysis of 1297 patients. **Diabetic Medicine**, v.27,p.376-383, 2010.

WANG, Z.; NAKAYAMA, T. Inflammation, a link between obesity and cardiovascular disease. **Mediators of Inflammation**,v.2010, p.1-17, 2010.

WANG, Z.; YAO, T.; PINI, M.; ZHOU, Z.; FANTUZZI, G.; SONG, Z. Betaine improved adipose tissue function in mice fed a high-fat diet: a mechanism for hepatoprotective effect of betaine in nonalcoholic fatty liver disease. **American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology**, v.298,p.634–642, 2010

WASSON, G.R.; MCGLYNN, A.P.; MCNULTY, H.; O'REILLY, S.L.; MCKELVEY-MARTIN. V.J.; MCKERR, G.; STRAIN, J.J.; SCOTT, J.; DOWNES, C.S. Global DNA and p53 region-specific hypomethylation in human colonic cells is induced by folate depletion and reversed by folate supplementation. **Journal of Nutrition**, v.136, p.1-6, 2006.

WHAYNE T.F. The Effect of Nutrition and Exercise on Epigenetics and the Development of Cardiovascular Disease. In: Maulik N., Karagiannis T. (eds) Molecular mechanisms and physiology of disease. **Springer**, p.175-193,2014.

WELCH, A.A.; MACGREGOR, A.J.; MINIHANE, A.M.; SKINNER, J.; VALDES, A. A.; SPECTOR, T.D.; CASSIDY, A. Dietary Fat and Fatty Acid Profile Are Associated with Indices of Skeletal Muscle Mass in Women Aged 18–79 Years. **The Journal of Nutrition**, v. 144, p. 327 - 334, 2014.

WIDIKER, S.; KARST, S.; WAGENER, A.; BROCKMANN, G.A. High-fat diet leads to a decreased methylation of the Mc4r gene in the obese BFMI and the lean B6 mouse lines. **Journal of Applied Genetics**, v. 51, p.93–197,2010.

WINDHOLZ, J.; KOVACS, P.; SCHLICHE, M.; FRANKE, C.; MAHAJAN, A.; MORRIS, A.P.; LEMKE, J.R.; KLAMMT, J.; KIESS. W.; SCHÖNEBERG, T.; PFÄFFLE, R.; KÖRNER, A. Copy number variations in "classical" obesity candidate genes are not frequently associated with severe early-onset obesity in children. **Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism**, v.30,n.5,p.507-515,2017.

WHO - World Health Organization. **Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications**. Report of a WHO consultation. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1999.

WHO - World Health Organization. **Obesity and overweight. Media Cent. Fact sheet N 311** (2013). Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>, acessado em abril 2014.

WHO - World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. **Technical Report Series**, v. 894, p. 11 – 253, 2000.

WIDMER, R.J.; FLAMMER, A.J.; LERMAN, L.O.; LERMAN, A. The Mediterranean Diet, its components and Cardiovascular Disease. **The American Journal of Medicine**, v. 128, n.3, p 229 – 238, 2015.

WILSON, A.G. Epigenetic regulation of gene expression in the inflammatory response and relevance to common diseases. **Journal of Periodontology**, v.79, p.1514–1519, 2008.

WINKLER, T. W. The influence of age and sex on genetic associations with adult body size and shape: a large-scale genome-wide interaction study. **PLoS Genetics**, v. 11, p.1-42, 2015.

WOTJALA,M.; PIROLA,L.; BALCERCZYK,A. Modulation of the vascular endothelium functioning by dietary components, the role of epigenetics. **Biofactors**, v. 43,n.1,p.5-16,2017.

World Health Organization. **Obesity and overweight.** WHO <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> (2015).

XUE, Y.; WANG, H.; DU, M.; ZHU, M.J. Maternal obesity induces gut inflammation and impairs gut epithelial barrier function in nonobese diabetic mice. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 25, p.758–764, 2014.

YASHODHARA, B.M.; UMAKANTH,S.;PAPPACHAN,J.M.; BHAT, S.K.; KAMATH, R.; CHOO,B.H. Omega-3 fatty acids: a comprehensive review of their role in health and disease. **Postgraduate Medical Journal**, v. 85, n. 1000, p. 84–90, 2009.

YODER, J.A.; SOMAN, N.S.; VERDINE, G.L.; BESTOR, T.H. DNA (cytosine-5)-methyltransferases in mouse cells and tissues. Studies with a mechanism-based probe. **Journal of Molecular Biology**, v. 270, p.385–95, 1997.

YUN, J.M.; JIALAL, I.; DEVARAJ, S. Effects of epigallocatechin gallate on regulatory T cell number and function in obese v. lean volunteers. **British Journal of Nutrition**, v. 1103, p. 1771 – 1777,2010.

ZECHNER, R.; ZIMMERMANN, R.; EICHMANN, T.O. FAT SIGNALS--lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. **Cell Metabolism**, v. 15,p.279–291,2012.

ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEI, M.; BARONE, M.; LEOPOLD, L.; FRIEDMAN, J. M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, p. 425 – 432, 1994.

ZHANG, F.F.; MORABIA, A.; CARROLL, J.; GONZALEZ, K.; FULDA, K.; KAUR, M.; VISHWANATHA, J.K.; SANTELLA, R.M.; CARDARELLI, R. Dietary patterns are associated with levels of global genomic DNA methylation in a cancer free population. **Journal of Nutrition**, v. 141, p.1165–1171, 2011.

ZHENG, J.; XIAO, X.; ZHANG, Q.; YU, M. DNA methylation: the pivotal interaction between early-life nutrition and glucose metabolism in later life. **British Journal of Nutrition**, v. 112, n. 11, p. 1850-7, 2014.

ZHOU, S.; ZHANG, Z.; XU, G. Notable epigenetic role of hyperhomocysteinemia in atherogenesis. **Lipids in Health and Disease**, v. 13, n.134, p. 1-10, 2014.

APÊNDICE

APÊNDICE A – CERTIDÃO DO COMITÉ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

CERTIDÃO

Certifico que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba – CEP/CCS aprovou por unanimidade na 12ª Reunião realizada no dia 10/12/2013, o Projeto de pesquisa intitulado: **“II CICLO DE DIAGNÓSTICO E INTERVENÇÃO DA SITUAÇÃO ALIMENTAR, NUTRICIONAL E DAS DOENÇAS NÃO TRANSMISSÍVEIS MAIS PREVALENTES DA POPULAÇÃO DO MUNICÍPIO DE JOÃO PESSOA/PB”** da pesquisadora Maria José de Carvalho Costa. Prot. Nº 0559/13. CAAE: 20883813.0.0000.5188.

Outrossim, informo que a autorização para posterior publicação fica condicionada à apresentação do resumo do estudo proposto à apreciação do Comitê.


Drª Eliane Marques de Sousa
Coordenadora do CEP/CCSUF/PB
Mat. SIAPE: 0332618

APÊNDICE B – CERTIDÃO DO COMITÉ DE ÉTICA

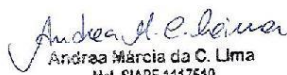


UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

CERTIDÃO

Certifico que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba – CEP/CCS aprovou por unanimidade na 9ª Reunião realizada no dia 22/10/2015, o Projeto de pesquisa intitulado: **“EFEITO DA DIETA RICA EM ANTIOXIDANTES E ÓLEO DE NOZ NO PERFIL DE METILAÇÃO DO DNA EM GENES RELACIONADOS AO METABOLISMO DE LIPÍDEOS E PROCESSO INFLAMATÓRIO”**, da pesquisadora Raquel Patrícia Ataíde Lima. Prot. nº 0478/15. CAAE: 48703115.0.0000.5188.

Outrossim, informo que a autorização para posterior publicação fica condicionada à apresentação do resumo do estudo proposto à apreciação do Comitê.


Andraa Márcia da C. Lima
Mat. SIAPE 1117610
Secretária do CEP-CCS-UFPB

APÊNDICE C - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências da Saúde
Núcleo Interdisciplinar de Estudos em Saúde e Nutrição



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Tendo em vista o desenvolvimento do estudo sob o título “ Segundo ciclo sobre o diagnóstico e intervenção da situação alimentar, nutricional, serviços de saúde e de doenças não-transmissíveis mais prevalentes da população do município de João Pessoa/PB”, a ser realizado com a população do município de João Pessoa/PB, vimos por meio deste, solicitar sua colaboração na participação deste estudo.

Trata-se de um estudo populacional que irá analisar informações familiares sobre condições socioeconômicas, consumo alimentar, doenças mais prevalentes, qualidade dos alimentos consumidos e higiene dentária. Participarão do estudo, crianças menores de 2 anos de idade, crianças, adolescentes, adultos, mulheres gestantes e idosos. Para obtenção de dados e informações serão aplicados, por uma visitadora devidamente capacitada, questionários por meio de visitas domiciliares, a serem agendadas conforme sua autorização e conveniência.

Nesse sentido, solicitamos sua participação e/ou autorização à participação de crianças e idosos de sua família, para a realização de:

- ☐ Responder informações socioeconômicas e consumo alimentar;
- ☐ Submeter-se, e a seus familiares (adulto) à tomada de medidas de peso, altura, circunferência e dobras cutâneas, para avaliação nutricional
- ☐ Coleta de sangue, de adultos para análise bioquímica de Hemograma Completo, Vitamina B12, Ácido Fólico, Perfil Lipídico. Homocisteína, Malondialdeído, metilação do DNA.

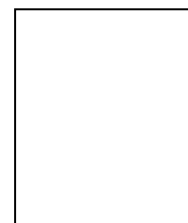
Destacamos neste termo que:

- Sua participação se dará de forma voluntária, sem prejuízo de qualquer natureza, seja para sua pessoa ou de seus familiares, que por acaso venham a acessar os serviços de saúde;
- Poderá, a qualquer momento, não mais participar do estudo, seja durante o fornecimento dos dados ou mesmo depois de já registrados nos questionários;
- Receberá todas as informações necessárias ao total esclarecimento sobre a natureza e procedimentos desenvolvidos no estudo, particularmente àqueles que dizem respeito à sua participação direta e/ou de seus familiares.

Esclarecemos ainda que, durante todo o desenvolvimento do estudo, seguiremos o que determina a Resolução 466 de 12 de dezembro de 2012 do Conselho Nacional de Saúde que trata sobre ética em pesquisa envolvendo seres humanos. Por esta razão, pedimos que, após esclarecido e de livre vontade, assine este termo, uma vez que concorda em colaborar voluntariamente neste estudo, e que não tem nenhuma dúvida sobre sua participação.

Participante ou responsável: _____

Profª. Dra. Maria José Carvalho Costa
Responsável pela Pesquisa



Impressão dactiloscópica (polegar direito)

Contato:

UFPB/NIESN. Campus Universitário. Centro de Ciência da Saúde.

Castelo Branco s/n. CEP: 58.059-900. João Pessoa/PB. E-mail: mjc.costa@terra.com.br. Fone: (083) 3235-5333 – 3216-7417.

APÊNDICE D – SOFTWARE METHPRIMER

The Li Lab

Peking Union Medical College Hospital (PUMCH), Chinese Academy of Medical Sciences

Home	Research	Publications	Tools & Databases	Protocols	People	Contact Us
------	----------	--------------	-------------------	-----------	--------	------------

MethPrimer

NEW! [Invitation to test MethPrimer 2.0](#)

Paste an ORIGINAL source sequence . Try this Sample sequence You don't need to modify your sequence (e.g. convert 'C' to 'T') before pasting.					
☒	Pick primers for bisulfite sequencing PCR or restriction PCR .				
☒	Pick MSP primers.				
☐	Use CpG island prediction for primer selection?	Window 100 ▼	Shift 1 ▼	Obs/Exp 0.6 ▼	GC% 50 ▼
Submit Reset					

APÊNDICE E – SEQUÊNCIA DO PRIMER *ADRB3**ADRB3*

Forward - 5' TAGGTGATTGTTGGGAGATTTTTTTT 3'

Reverse – 5'CCCCTAACAACCCACTAATATTAAC 3'

Temperatura de anelamento : 64°C

APÊNDICE F – SEQUÊNCIA DO PRIMER *Lep*

Lep

Forward - 5' TGGAGAAGTTGATGTTTTGTTTTAA3'

Reverse – 5' ACCAAAAACCCCTACTCTAAAAATC 3'

Temperatura de anelamento : 59°C

APÊNDICE G – SEQUÊNCIA DO PRIMER *Pomc*

Pomc

Forward - 5' AGGAGGGGTTTATTATAATTTTGTTT 3'

Reverse – 5' ACTAACTACTCTCCAAACACCAACC 3'

Temperatura de anelamento : 59.8°C

ANEXOS

ANEXO A – IDENTIFICAÇÃO DA ZONA E BAIRRO

**SEGUNDO CICLO SOBRE DIAGNÓSTICO E INTERVENÇÃO DA SITUAÇÃO ALIMENTAR, NUTRICIONAL,
SERVIÇOS DE SAÚDE E DE DOENÇAS NÃO TRANSMISSÍVEIS MAIS PREVALENTES DA POPULAÇÃO DO MUNICÍPIO DE**

JOÃO PESSOA/PB

INSTITUIÇÕES EXECUTORAS:

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO

NÚCLEO INTERDISCIPLINAR DE ESTUDOS EM SAÚDE E NUTRIÇÃO

SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE - PB

PREFEITURA MUNICIPAL DE JOÃO PESSOA - PB

SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE

COORDENAÇÃO:

Profa. Dra. Maria José de Carvalho Costa

Prof. Dr. Roberto Teixeira Lima

EQUIPE DE PESQUISADORES:

Prof.^a Dr.^a Silvia Franchescinni

Prof.^a Dr. Alcides da Silva Diniz

Prof.^a Dr.^a Darlene Camati Persuhn

Prof.^a Dr.^a Flávia Emília Leite de Lim

Prof.^a Dr Alexandre Silva

Prof. Dr. João Andrade da Silva

Prof.^a Dr.^a Luiza Sônia Rios Asciti

Prof.^a Dr.^a Maria Amélia Amado Rivera

Prof.^a Dr.^a Maria Conceição Rodrigues Gonçalves

Prof.^a Dr.^a Mônica Maria Osório de Cerqueira

Prof. Dr. Roberto Teixeira Lima

Prof. Dr. Ronei Marcos Moraes

Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio

Prof.^a Dr.^a Rosália Gouveia Filizola

Prof. Dr. Robson Cavalcante Veras

Prof. Msc. Aléssio Tony Cavalcanti de Almeida

Prof. Dr. Ignácio Tavares de Araújo Júnior

Msc. Raquel Patrícia Ataíde Lima

INSTITUIÇÕES FINANCIADORAS:

CONSELHO NACIONAL DE PESQUISA/CNPq

MINISTÉRIO DA SAÚDE

FUNDAÇÃO DE APOIO À PESQUISA DO ESTADO DA PARAÍBA/FAPESQ-PB

João Pessoa/2014-2015

Informações confidenciais. Garantido o sigilo pessoal.

Caso nº _____ Zona: _____

Data da entrevista: ____/____/____

Nome do Agente Comunitário de Saúde (ACS): _____

Responsável pelas informações: _____

Endereço da família: Rua: _____ n° _____

Bairro: _____ Fone: _____ Res.: () Apt.: ().

EQUIPE RESPONSÁVEL: _____

ANEXO B – CARACTERIZAÇÃO SOCIOECONÔMICA E DEMOGRÁFICA

1. CARACTERIZAÇÃO SÓCIO-ECONÔMICA E DEMOGRÁFICA DAS FAMÍLIAS:

(Composição e caracterização da **família ou grupo de convivência** no momento da pesquisa)

Caso Nº: _____

Nº	Nome	Grau de Parentesco (*)	Data de nascimento	Idade	Sexo 1 - M 2 - F	Escolaridade (anos completos)	Renda familiar (em R\$)	Quem recebe renda (marcar com X)	Bens de consumo da família	Observações adicionais
1	Responsável / Respondente								☐ Aparelho de som/rádio ☐ Aparelho de televisão ☐ Videocassete ☐ DVD ☐ Microcomputador de mesa ☐ Microcomputador portátil ☐ Automóvel ☐ Geladeira ☐ Freezer ☐ Máquina de lavar roupa ☐ Máquina de lavar louça ☐ Aspirador de pó ☐ Forno de microondas	Legenda da escolaridade: 1= Ensino básico incompleto 2= Ensino básico completo 3= Ensino fundamental incompleto 4= Ensino fundamental completo 5= Ensino médio incompleto 6= Ensino médio completo 7= Ensino superior incompleto 8= Ensino superior completo
2										
3										
4										
5										
6										
7										
8										
9										
10										
11										
12									☐ Telefone celular ☐ Telefone fixo ☐ Máquina fotográfica digital ☐ Aparelho de ar-condicionado Outros: ☐ _____ ☐ _____ ☐ _____	

(*) Grau de parentesco dos membros da família em relação ao responsável/respondente.

ANEXO C – CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA

2. CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DAS FAMÍLIAS:

(Composição e caracterização da **família ampliada** no momento da pesquisa)

Caso N°: _____

N°	Situação ou morbidade referida	Consumo de medicamentos, suplementos ou chás	Mortalidade por causa (*)			Fuma Sim/Não	N° de Cigarros p/dia	Atividade física (Sim/Não)	N° Vezes de ativ. p/semana	Tempo da ativ. (min.)	Idade Gestacional (em semanas)	Tipo de parto C/N (**)	Peso ao nascer (g) (**)
			Pai	Mãe	Irmão								
1	Responsável												
2													
3													
4													
5													
6													
7													
8													
9													
10													

Em situação de morbidade referida, descrever a principal, acrescentando **AQUI** as demais, por ordem de gravidade: _____ (*) Para os adultos da família .

(**) Para as crianças < de 2 anos de idade. (** *) C = cesário, N= normal. P.S.: Identificar com uma circunferência na numeração correspondente, o familiar encaminhado para intervenção, e preencher o formulário específico (pág.13).

ANEXO D - RECORDATÓRIO ALIMENTAR:

[] 1º [] 2º [] 3º

Caso Nº: _____

Nome: _____ nº _____

Refeições/Alimentos		Medida Caseira	Tamanho da porção	Valor em gramas/ml	Observações
Café da Manhã					Preencher as medidas mostrando o álbum de medidas caseiras.
					Para mensurar o valor de g/ml das medidas caseiras, considerar o valor da porção média do QFCA,
					Se for pequena, / 2
					Se for grande, + ½
Lanche					Se for extra-grande, X 2
					(p25 – p50 – p75 – p100)
Almoço					
					Descrever quantidades de alimentos por preparação: Papas, sopas, macarronada, feijoada, etc. E colocar neste recordatório, perguntado a responsável pela preparação, para quantas pessoas será dividida.
Lanche					
					Descrever neste recordatório se consome chá, caso sim, que tipo de chá, como também quantidade de água e horário.
Jantar					

					Descrever o tipo de cocção: - Fritura -Grelhado -Cozido - Assado
Lanche Noturno					
Preferências Alimentares:					
Aversões Alimentares:					

ANEXO E - AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA

ADULTO (Maiores de 20 anos até 59 anos): (Nº:___)

Peso atual:_____ (em kg)

Altura atual:_____ (em m)

Circunferência do braço:_____ (em cm)

Dobra cutânea tricipital:_____ (em cm)

Circunferência da cintura: _____(em cm) Circunferência do quadril:_____ (em cm).

ANEXO F - LISTA DO SISTEMA DE EQUIVALENTES ATUALIZADA E MODIFICADA PARA USO NO BRASIL

1 - EQUIVALENTES CEREAIS

Corresponde a 15 g de carboidratos, 3 g de Proteína, 0-1 g de lipídios e 80 calorias. Para crianças em idade pré-escolar uma porção corresponde a 75 kcal, aproximadamente 1 equivalente do adulto.

Abreviaturas:

Pães, cereais e grãos, vegetais ricos em amido, biscoitos (PCGVRAB)

Feijão, ervilha, lentilha (FEL)

Alimentos Amiláceos preparados com Gordura (APG)

PÃES

Cereal cozido integral*	½ xícara	≅15grs
Pão doce	¼ unidade	≅15 grs
Pão de cachorro quente ou Hamburgo	½ unidade	≅25grs
Pão francês, integral, centeio *	¼ unidade	≅15grs
Pão light	2/4 unidade 2 fatias	≅25grs
Torrada	2 fatias finas	≅25grs

CEREAIS E GRÃOS

Arroz cozido ou cevada	1/3 xícara	≅60 grs
Aveia*	2 c. de sopa rasa	≅20 grs
Cuscuz*	½ fatia pequena	≅60 grs
Cereal sem açúcar	¾ xícara	≅30 grs
Cereal com açúcar	½ xícara	≅15 grs

Granola , baixo teor de gordura	¼ xícara	≅20 grs
Farinha de mandioca	2 c. de sopa rasa	≅20 grs
Farinha de rosca	1 c. de sopa cheia	≅15 grs
Farinha de trigo	2 c. de sopa rasa	≅20 grs
Farelo de trigo, de cereais	½ xícara	≅30 grs
Gérmen de trigo *	3 c. de sopa rasa	≅30 grs
Tapioca	1 unidade pequena	≅20 grs

VEGETAIS RICOS EM AMIDO

Abóbora inverno	1 xícara	≅ 90 grs
Banana de São Tomé	1 unidade pequena	≅ 90 grs
Batata doce cozida	½ unidade pequena	≅70 grs
Batata inglesa cozida	1 unidade pequena	≅90 grs
Ervilhas verdes	½ xícara	≅50 grs
Espaguete cozido	1 porção pequena	≅50 grs
Inhame	½ fatia pequena	≅60 grs
Macaxeira	½ raiz pequena	≅60 grs
Maisena	2 c. de sopa cheia	≅20 grs
Milho verde*	1 média ou ½ espiga grande	≅60 grs
Farinha Láctea	1 c. de sopa cheia	≅15 grs
Neston	2 c. de sopa rasa	20grs

***Alimentos com 3 ou mais gramas de fibras por porção.**

“Leia também os estudos sobre o controle de colesterol no capítulo 1”

BISCOITOS E LANCHES

Crackers, farinha integral sem gordura	2 – 4 unidades	≅15 grs
Pipoca	1 saco pequeno ou ≅ 3 xícaras	≅ 15 grs
Pretzels		≅15 grs
Torradas dietéticas	4 unidades	≅15 grs
Palitos de centeio	4 unidades	

FEIJÕES, ERVILHAS E LENTILHAS

Para a criança em idade pré-escolar uma porção corresponde a ¼ da porção do adulto, entre ½ e 1 colher de sopa de feijão.

Feijoada simples ou qualquer tipo de feijão	½ concha pequena ou ½ xícara	≅50 grs
Feijão verde *	1 concha pequena	≅30 grs
Grão de bico	½ xícara	≅50 grs
Sopa de feijão	1 xícara	≅50 grs

ALIMENTOS AMILÁCEOS PREPARADOS COM GORDURA

Batata inglesa frita	1 unidade pequena	≅90 grs
Biscoitos doces	4 unidades	≅16 grs
Bolacha, trigo integral com gordura	4 – 6 unidades	≅30 grs
Bolachas: Cream Cracker	2 unidades	≅14 grs
Água sal-integral	2 unidades	≅14 grs
Bolo de trigo/milho	½ fatia pequena	≅20 grs
Broa de milho	1 unidade média	≅60 grs
Crackes amanteigado	2 unidades	≅16 grs
Macarronada	1 porção média ou ½ xícara	≅80 grs
Muffin	1 unidade pequena	≅45 grs

Purê de batata	½ xícara	≅40 grs
Panqueca (10 cm)	2 unidades	≅
Pipoca de Microondas	1 saco pequeno ou ≅ 3 xícaras	≅15 grs
Torradas integrais, adição de gordura	2 unidades	≅35 grs

“Leia também os estudos sobre o controle de colesterol em relação ao consumo de feijão no capítulo 1”

2 - EQUIVALENTE FRUTA

Corresponde a 15 g de carboidratos e 60 calorias. Para crianças em idade pré-escolar uma porção de fruta equivale a 35 kcal, aproximadamente 1/2 equivalente do adulto.

FRUTAS FRESCAS, CONGELADAS E ENLATADAS SEM AÇÚCAR

Acerola***	¾ de xícara	24 unidades	100g
Araçá	½ xícara	10 unidades	100g
Abacaxi enlatado***		1/3 xícara	45g
Abacaxi fresco ***		3/4 xícara	86g
Ameixas frescas		2 unidades	30g
Banana grande		½ unidade	120g
Cajá ***	3/4 de xícara	5 unidades grandes	86g
Caju *****		1 pequeno	≅90g
Cajarana		1 média	130g
Carambola		3 ½ unidades	207g
Seriguela ***		4 ½ unidades	42g
Cereja grande, fresca		12 unidades	≅100g
Cerejas enlatadas		½ xícara	100g

Damasco enlatado ●●***	½ xícara	≅25g
Damasco cru ●●***	4 unidades	≅25g
Figo, fresco	2 unidades	≅104g
Framboesas, frescas	¾ xícara	
Goiaba ●●***	1 média	≅135g
Jabuticaba	12 unidades	≅60g
Jaca	6 bagos médios	≅60g
Jambo ***	2 médios	≅150 g
Laranja pequena ●●	1 unidade	≅175g
Laranja baía ●●	½ unidade	≅140g
Maçã crua	1 unidade média	≅120g
Mamão papaia ●●***	1 fatia pequena	≅90g
Manga pequena ●●***	½ unidade	≅100g
Melancia	1 fatia média	≅200g
Melão, cubos ●●***	1 xícara	≅70g
Melão médio ●●***	1/8 unidade	≅30g
Morango fresco ●●	3 médios	≅50g
Pêra	½ grande	≅120g
Pêssego ●●***	1 médio	≅ 60g
Pêssego enlatado ●●*** ...	2 metades	≅90g

Pinha	1 pequena	≅140g
Romã	2 unidades	≅210g
Sapoti	1 pequeno	≅80g
Tangerina	2 unidades	≅155g
Uvas pequenas	15 unidades	≅45g
Kiwi grande •••***	1 unidade	≅105
FRUTAS SECAS		
Ameixa média	3 unidades	≅20g
Passas	2 c. de sopa	≅36g
SUCOS DE FRUTAS		
Abacaxi	2 fatias médias 1/3 xícara	≅75mL
Ameixa	1 unidade média 1/3 xícara	≅75mL
Laranja	1/2 xícara	≅110mL
Limão	1/3 xícara	≅75mL
Maracujá	1/2 xícara	≅110mL
Uva	1/3 xícara	≅75mL

* 3 ou mais gramas de fibras por porção

••• Boa fonte de vitamina C

*** Boa fonte de vitamina A

“Leia também os estudos sobre os flavonóides da uva, interação da vitamina C com o ferro e a lista do teor de potássio nos frutos do Nordeste, nos capítulos 1 e 5”

3 – EQUIVALENTE LEITE

Corresponde a 12 g de carboidratos, 8 g de proteínas, 0-8 g de lipídios e 90-150 kcal. Para crianças em idade pré-escolar uma porção de leite equivale a 120 kcal, ou seja, 1 equivalente de leite semi-desnatado do adulto.

LEITE DESNATADO 90 kcal (0-3 g de lipídios por porção)

Leite desnatado	1 xícara
Leite 0,5%	1 xícara
Leitelho, semidesnatado ou desnatado	1 xícara
Leite em pó desnatado	1 xícara
Iogurte natural, desnatado	½ xícara
Iogurte sabores, desnatado, adoçado com edulcorantes não nutritivos e frutose	1 xícarat

LEITE SEMIDESNATADO 120 kcal (5 g de lipídio por porção)

Leite 2%	1 xícara
Iogurte, natural, semidesnatado	¼ xícara
Leite fermentado	1 xícara
Leite de soja	1 xícara

LEITE INTEGRAL 150 kcal (8 g de lipídios por porção)

Leite evaporado desnatado	½ xícara
Leite integral	1 xícara
Leite evaporado integral	½ xícara
Leite de cabra	1 xícara
Kefir	1 xícara
Iogurte, natural, feito com leite integral	¾ xícara

“Ler também estudo sobre prébiótico e probióticos capítulo 1”

4 – DOCES SOBREMESAS E OUTROS CARBOIDRATOS

Cada substituição de carboidrato corresponde a 15 g, ou 1 cereal, ou 1 fruta ou 1 fruta + leite de 70 kcal. Para crianças em idade pré-escolar uma porção desse grupo corresponde a 55 kcal, aproximadamente a 1 colher de sopa rasa de açúcar.

ALIMENTO	QUANTIDADE	SUBSTITUIÇÃO
----------	------------	--------------

Açúcar	1 colher de sopa	1 carboidrato
Barra de granola	1 barra	1 carboidrato, 1 gordura
Barra de granola sem gordura	1 barra	1,5 carboidratos
Barra energética esportiva	1 barra (60grs)	2 carboidrato, 1 gordura
Bebida esportiva	1 copo (220ml)	2 carboidrato, 1 gordura
Batatas fritas em rodela	12-18 (30 grs)	1 carboidrato, 2 gorduras
Bolo com glacê	1/12 do bolo	2 carboidratos, 1 gordura
Bolo sem glacê	1/12 do bolo	1 carboidrato, 1 gordura
Sorvete instantâneo sem casquinho (frozen yogurt)	½ xícara	1 carboidrato, 1 gordura
Gelatina regular	½ xícara	1 carboidrato
Geleia ou gelatina regular	1 colher de sopa	1 carboidrato
Iogurte congelado, baixo teor de gordura, sem gordura	1/3 xícara	1 carboidrato, 0-1 gordura
Iogurte congelado sem gordura, sem adicionar açúcar	½ xícara	1 carboidrato
Iogurte de baixo teor de gordura com fruta	1 xícara	3 carboidratos, 0-1 gordura
Leite achocolatado integral	1 xícara	2 carboidratos, 1 gordura
Mel	1 colher de sopa	1 carboidrato
Molho de salada sem gordura	¼ de xícara	1 carboidrato
Papo de anjo sem glacê	1/12 do bolo	2 carboidratos
Pudim regular (feito c/ leite de baixo teor de gordura)	½ xícara	2 carboidratos
Pudim s/ açúcar (feito c/ leite de baixo teor de gordura)	½	1 carboidratos
Sonho	1 medio (45g)	1 carboidrato 2 gorduras
Rocambole doce ou dinamarquês	75 grs	2½ carboidratos, 2 gorduras
Sorvete	½ xícara	1 carboidrato, 2 gorduras
Sorvete leve	½ xícara	1 carboidrato, 1 gordura

Sorvete sem gordura e sem açúcar adicionado	½ xícara	1 carboidrato
Sorvete de frutas, picolé	½ xícara	2 carboidratos
Torta de frutas, duas massas	1/6 de torta	3 carboidratos, 2 gorduras
Wafers de baunilha	5 unidades	1 carboidrato, 2 gorduras

5 – EQUIVALENTE VEGETAIS

Uma porção corresponde a 5 g de carboidrato, 2 g de proteína e 25 calorias. Para crianças em idade pré-escolar uma porção de vegetais equivale a 8 kcal, ou seja, 1/3 do equivalente do adulto.

½ xícara de legumes cozidos ou suco de legumes

1 xícara de legumes crus

Acelga	Chuchu
Abobrinha, cozida	Endiva
Abóbora madura***	Espinafre cozido***
Alface***	Feijão (verde italiano)
Aipo	Folhas (mostarda, nabo)***
Alho poro	Maxixe
Agrião***	Nabo***
Alcachofra (½ médio)	Palmito
Aspargos	Pepino
Berinjela	Pimentas (verde)
Beterraba	Pimentão
Broto de feijão	Quiabo
Brócolis***	Rabanete
Cebola	Repolho (cozido)
Cenoura***	Ruibarbo

Cogumelos, cozidos	Tomate 1 – grande
Couve de Bruxelas	Tomate/suco vegetal***
Couve-flor	Vagem***

*** Boa fonte de vitamina A

“Leia também estudos sobre os oligossacarídeos, no capítulo 1”.

6 – EQUIVALENTE CARNE

CARNE MUITO MAGRA E SUBSTITUTOS

Uma porção corresponde a 7 g de proteína, 0-1 g de lipídios e 35 kcal.

Aves	Frango ou peru (carne branca sem pele)	≅ 30grs
Peixe	Bacalhau fresco ou cozido, atum fresco ou enlatado em água **	≅ 30grs
Queijo	Queijo sem gordura**	≅ 30grs
Ovo	Clara de ovo	2 unidades
Outros	Carnes processadas com 1 g ou menos de gordura	≅ 30grs

Contar como uma troca de carne muito magra e uma de amido

Grãos	Feijões, ervilhas, lentilhas secas (cozidas)	½ xícara
-------	--	----------

CARNES MAGRAS E SUBSTITUTOS

Uma porção corresponde a 7 g de proteína, 3 g de lipídios e 55 kcal.

Carne bovina	Magra com gordura removida (chã, alcatra, filé de lombo, lombinho, assado de costela ou alcatra, carne moída)	≅ 30grs
Carne de porco	Carne de porco magra, presunto fresco, presunto enlatado, file de costeleta e de lombo central	≅ 30grs

Cordeiro	Assado, perna e costela	≅ 30grs
Aves	Frango, peru (carne escura, sem pele), frango (carne branca com pele), pato ou ganso doméstico (bem removida a gordura, sem pele)	≅ 30grs
Peixe	Arenque (não cremoso ou defumado), cavala fresca ou congelada	≅ 30 grs
	Atum (fresco ou enlatado** em óleo, escoado)	≅ 30 grs
	Ostras	6 unidades
	Salmão (fresco ou enlatado** escoado), bagre	≅ 30 grs
	Sardinhas (enlatadas escoadas ou frescas)	2 médias
Queijo	Queijo tipo ricota de 4,5% de gordura	¼ xícara
	Parmesão ralado	2 colheres
	Queijos com 3g ou menos de gordura por 30grs	≅ 45grs
Outros	Fígado, coração (rico em colesterol), carnes processadas com 3g ou menos de gordura	≅ 30grs

CARNES DE TEOR MÉDIO DE GORDURA E SUBSTITUTOS

Uma porção corresponde a 7 g de proteína, 5 g de lipídios e 75 kcal. Para crianças em idade pré-escolar uma porção de equivale a 65 kcal, aproximadamente 1 equivalente do adulto.

Carne bovina	Carne bovina moída, bolo de carne, carne bovina salgada, costelas curtas, categorias de primeira de carne com a gordura removida, tal como costela de primeira	≅ 30grs
Carne de porco	Lombo de cima, costeleta	≅ 30grs
Cordeiro	Costela assada, moída	≅ 30grs
Aves	Carne escura de frango (com pele), peru moído ou frango moído, frango frito (com pele)	≅ 30grs

Peixe	Qualquer produto de peixe frito	≅ 30grs
Queijo	1 Mussarela, qualho comum	≅ 30grs
	Ricota	¼ xícara
Outros	Ovo (rico em colesterol, limitar a 3 por semana) ..	1
	Salsicha** com 5g ou menos de gordura por 30grs	≅ 30grs
	Leite de soja	1 xícara

CARNES DE ALTO TEOR DE GORDURA E SUBSTITUTOS

Uma porção corresponde a 7 g de proteína, 8 g de lipídios e 100 kcal.

Carne de porco	Ponta de costeleta de porco com pouca carne, carne de porco	≅ 30grs
	moída, lingüiça** de porco	
Queijo	Todos os queijos regulares, tal como reino, manteiga, etc.	≅ 30grs
Outros	Lingüiça**, salame**	≅ 30grs
	Cachorro quente** (peru ou frango)	1
	Bacon**	3 fatias
	Rim (rico em colesterol)	≅ 30grs
Contar como uma troca de carne de alto teor de gordura mais uma troca de gordura		
	Cachorro quente (carne bovina, de porco, ou combinação)	1 unidade
	Pasta de amendoim (contém gordura insaturada) .	2 colheres de sopa

** Alimentos com 400 mg ou mais de sódio por porção.

“Leia também os estudos sobre o ômega-3, queijo de cabra, ovos enriquecidos com ômega-3 carnes defumadas, no capítulo 1”.

7 – EQUIVALENTE GORDURA

Uma porção corresponde a 5 g de lipídios e 45 kcal. Para crianças em idade pré-escolar uma porção de

equivale a 37 kcal, aproximadamente 1 equivalente do adulto, que corresponde a aproximadamente 1 colher de chá rasa de gordura.

GORDURAS MONOINSATURADAS

Abacate	Unidade média	1/8
Óleo	Canola, azeite de oliva, amendoim	1 colher de chá
Azeitonas	Maduras (pretas)	8 grandes
	Verdes**, inchadas	10 grandes
Nozes	Amêndoas, castanha de caju	6 nozes
	Misturadas (50% amendoins)	6 nozes
	Amendoins	10 nozes
Pasta	Pasta de amendoim, macia ou pedaçada	2 colheres de chá
Sementes	Gergelim	1 colher de sopa

GORDURAS POLINSATURADAS

Margarina	Pote, tablete	1 colher de chá
	Baixo teor de gordura (30% a 50% de óleo vegetal)	1 colher de sopa
Maionese	Regular	1 colher de chá
	Teor de gordura reduzido	1 colher de sopa
Óleo	Milho, açafraão, de soja	1 colher de chá
Molho	Regular	1 colher de sopa
Salada**	Teor de gordura reduzido	2 colheres de sopa
Sementes	Abóbora e girassol	1 colher de sopa

GORDURAS SATURADAS

Bacon	Cozido	1 fatia
	Gordura	1 colher de chá
Manteiga	Tira	1 colher de chá
	Batida	2 colheres de chá

	Teor de gordura reduzido	1 colher de sopa
Miúdos de porco		
	Fervidos (15 gr)	2 colheres de sopa
Coco		2 colheres de sopa
Nata		2 colheres de sopa
Queijo cremoso	Regular	1 colher de sopa
	Teor de gordura reduzido	2 colheres de sopa
Banha ou toucinho		1 colher de chá

“Leia também os estudos sobre o Glúcerna e os ácidos graxos trans no capítulo 1”.

8 – ALIMENTOS LIVRES

BEBIDAS

Água gaseificada	Água tônica
Bouillon ou caldo de carne sem gordura	Chá/café (até 3 xícaras por dia)
Bouillon, baixo teor de sódio	Chocolate em pó, s/açúcar (1 c. sopa)
Bebidas carbonatadas (sem açúcar)	

SUBSTITUTOS DOCES

Bala, dura sem açúcar	Geléia sem açúcar (2 c. de chá)
Gelatina, sem açúcar	Panqueca, calda, s/açúcar (1-2 c. sopa)
Goma de mascar sem açúcar	Substitutos do açúcar (aspartame, sacarina, etc.)

CONDIMENTO

Catchup (1 c. de sopa)	Picles, azedo ou em conserva, sem açúcar
Mostarda	Molho de salada com baixo teor calórico (2 c. sopa)
Vinagre	

TEMPEROS

Alho	Molho inglês
------	--------------

Ervas	Molho de soja
Especiarias	Molho de pimenta ardida
Pimenta	

9 – LISTA DE ALIMENTOS DE COMBINAÇÃO

ALIMENTO	TAMANHO DA PORÇÃO	TROCAS POR PORÇÃO
“Nuggets” de frango	6	1 carboidrato, 2 carnes de teor médio de gordura, 1 gordura
Peito e asa de frango, empanados e fritos	1 de cada	1 carboidrato, 4 carnes de teor médio de gordura, 2 gorduras
Sanduíche de peixe/molho	1	3 carboidratos, 1 carne de teor médio de gordura, 3 gorduras
Batatas fritas, finas	20-25	2 carboidratos, 2 gorduras
Hambúrguer regular	1	2 carboidratos, 2 carnes de teor médio de gordura
Hambúrguer grande	1	2 carboidratos, 3 carnes de teor médio de gordura, 1 gordura
Cachorro quente com pãozinho	1	1 carboidrato, 1 carne de teor médio de gordura, 1 gordura
Pizza individual	1	5 carboidratos, 3 carnes de teor médio de gordura, 3 gorduras
Cone de sorvete	1 médio	2 carboidratos, 1 gordura
Pizza mussarela	1 fatia	2 carboidratos, 2 carnes de teor médio de gordura, 1 gordura

ANEXO G – FICHA DE EQUIVALENTES

FICHA DE EQUIVALENTES															Ficha de Análise Por Equivalentes														
Universidade Federal da Paraíba - Centro de Ciências da Saúde - Departamento de Nutrição																													
Nome:																													
Sexo		Idade	anos	Altura	m	IMC	Kg/m²	Atividade		Avaliação Nutricional			PT	Kg															
	Peso	70Kg	Vet		Kcal	TMB	Kcal	Peso para o cálculo	Kg				PTM	Kg															
Glicídeos	%	0.00g	0.00Kcal	Protídeos	%	0.00g	0.00 Kcal	Lípídeos	%	0.00g	0.00Kcal		PTm	Kg															
Equivalentes	Eq	Calorias	Glicídios		Protídeos		Lípídeos				Coolest	Na	Refeições																
			Totais	Mono	Polins	Satur	#DIV/0!%	#DIV/0!%	#DIV/0!%	#DIV/0!%			#DIV/0!%	#DIV/0!%	#DIV/0!%	#DIV/0!%													
	g/ml	Quant	1Eq	Cal	1Eq	grs	Cal	1Eq	grs	Cal	1Eq	grs	Cal	1Eq	mg	1Eq	mg	D	L	A	L	J	C						
																		Eq. Al	Eq. CH	Eq. Al	Eq. CH	Eq. Al	Eq. CH	Eq. Al	Eq. CH				
Leite Integral																													
Leite Desnatado																													
Vegetais																													
Frutas																													
Açúcar																													
Subtotal Glic																													
P/C/V .A/T																													
Feijão/E/L																													
Amil. C/Gordura																													
Subtotal Prot																													
Carne Magra																													
Peixe																													
Ovos (3 p/semana)																													
Subtotal Lip																													
Marg. s/sal																													
Mant. s/sal																													
Óleo + Poli*																													
Óleo + Mono**																													
Total																													
VET (Enc)																													
Adequação																													
*1 envelope 1 g (pô) = 5 a 6 gotas (poder adoçante = 2 col chá de açúcar)															**Utilizar apenas os "diet" ou "light" conforme seleção e indicação / com moderação														
Utilizar valores de insulina por:															U.I de Insulina														
Assinatura Nutricionista:															0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00														
© 2000. COSTA, M.J.C. et al. Dep. Nutrição - CCS - UFPB; informatizada por: OLIVEIRA, C.E.V; 2005)																													

ARTIGO 1

Analysis of the methylation of the *ADRB3* gene and its association with lipid profile, oxidative stress, and nutritional status in adults.

TITULO DA REVISTA: The International Journal of Applied and Basic Nutritional Sciences

ÁREA: MEDICINA II

QUALIS: A1

ISSN: 0899-9007

FATOR DE IMPACTO: 3,42

ARTICLE 1

*Article***Analysis of the methylation of the *ADRB3* gene and its association with lipid profile, oxidative stress, and nutritional status in adults.**

Raquel Patrícia Ataíde Lima ^{1*}, Marina Ramalho Ribeiro², n Cristhine Pordeus Luna¹, Rayner Anderson Ferreira do Nascimento³, Maria da Conceição Rodrigues Gonçalves⁴, Rodrigo Pinheiro de Toledo Vianna⁴, Ronei Marcos de Moraes⁵, Naila Francis Paulo de Oliveira⁶, Darlene Camati Persuhn⁶, Hubert Vidal⁷, Aléssio Tony Cavalcanti de Almeida⁸, Luciano Pirola⁷, Emmanuelle Fouilloux-Meugnier⁷, Alexandre Sérgio da Silva⁴, Marciane Magnani⁴ and Maria José de Carvalho Costa⁴

¹ PhD student in Nutrition Sciences, Graduate Program in Nutrition Sciences, Health Sciences Center (Centro de Ciências da Saúde, CCS), Federal University of Paraíba UFPB).

² Master's student in Nutrition Sciences, Graduate Program in Nutrition Sciences, CCS, UFPB.

³ Master's student in Molecular Biology, Graduate Program in Molecular and Human Biology, Natural Exact Sciences Center (Centro de Ciências Exatas da Natureza, CCEN), UFPB.

⁴ PhD, Professor in the Graduate Program in Nutrition Sciences, CCS, UFPB.

⁵ PhD, Professor in the Graduate Program in Health Decision Models, CCEN, UFPB.

⁶ PhD, Professor in the Graduate Program in Molecular and Human Biology, CCEN, UFPB.

⁷ PhD, Chercher at the University of Lyon, CARMEN Laboratory - Oullins, France.

⁸ PhD, Professor in the Department of Economics, Applied Social Sciences Center (Centro de Ciências Sociais Aplicadas, CCSA), UFPB.

* Author to whom correspondence should be addressed: E-Mail: raquelpatriciaal@hotmail.com; Tel./Fax: +55-83-3216-7417.

Abstract: Defects in DNA methylation have been shown to be associated to metabolic diseases such as obesity, dyslipidemia, and hypercholesterolemia. The objective of this study was to analyze the methylation profile of the *ADRB3* gene and correlate it with the lipid profile, regular lipid intake, and oxidative stress based on malondialdehyde (MDA) and total antioxidant capacity (TAC), homocysteine and folic acid levels, nutritional status, lifestyle, and socioeconomic variables in an adult population. **Methods:** This was a cross-sectional epidemiological study representative of the East and West regions of the municipality of João Pessoa, Paraíba state, Brazil, involving 265 adult individuals of both genders. Demographic, lifestyle, and socioeconomic questionnaires and a 24-h recall questionnaire were applied by trained interviewers at home, and nutritional and biochemical evaluation (DNA methylation, lipid profile, MDA, TAC, homocysteine and folic acid levels) was performed. **Results and Discussion:** DNA hypermethylation of the *ADRB3* gene was present in 50% of adults and was associated with a higher risk of being overweight (OR: 3.28; $p=0.008$) or obese (OR: 3.06; $p=0.017$), a higher waist-hip ratio in males (OR: 1.17; $p=0.000$), greater intake of trans fats (OR: 1.94; $p=0.032$), higher LDL (OR: 2.64; $p=0.003$) and triglycerides (OR: 1.81; $p=0.031$), and higher folic acid levels (OR: 1.85; $p=0.022$). **Conclusion:** These results suggest that epigenetic changes in the *ADRB3* gene locus may explain the development of obesity and non-communicable diseases associated with trans fat intake, altered lipid profile, and elevated folic acid. Because of its persistence, DNA methylation may have an impact in adults, in particular in association with the development of non-communicable diseases. . This study is the first population-based study of the *ADRB3* gene, and the data from this study support evaluation of *ADRB3* DNA methylation as an effective biomarker.

Keywords: epigenetics, DNA methylation, obesity, lipid, *ADRB3*

1. Introduction

Previous studies suggest that DNA methylation plays an important role in metabolic diseases such as obesity, dyslipidemia, and hypercholesterolemia (GUAY et al., 2012; GUAY et al., 2014). DNA methylation is the most well-known epigenetic modification, and it is performed by the enzyme family of DNA methyltransferases (DNMTs), which catalyze the transfer of a methyl group from S-adenosylmethionine (SAM) to the 5'-carbon of a cytosine that precedes guanine (CpG dinucleotide) (SCHUBELER, 2015). Methylation frequently occurs in gene promoter regions, which are often rich in CpG dinucleotides and are thus called CpG islands. DNA hypermethylation inhibits gene transcription by preventing the binding of transcription factors or by binding methyl-CpG-binding proteins (MBPs) (MINAROVITS et al., 2016).

Epigenetics involves hereditary changes in gene expression that do not involve changes in the DNA sequence; these changes are reversible and may be repetitively transferred to subsequent generations (MARTINEZ et al., 2014; HOLLIDAY, 2006). Thus, the three main characteristics of epigenetics are: (1) no changes in DNA sequence, (2) inheritability, and (3) plasticity and reversibility (ZHENG et al., 2014).

Unlike the genome, the epigenome can be modified, and thus some epigenetic risk markers have the potential to be removed. These modifications can be caused by medications, diet, or exposure to environmental factors (BISHOP; FERGUSON, 2015). These factors, when associated with oxidative stress and inflammation, tend to influence the DNA methylation profile or histone post-translational modifications (GILBERT; LIU, 2012). This specific knowledge may lead to the development of potential therapeutic targets for the prevention and treatment of non-communicable diseases.

Little is known about the influence of nutrient metabolism on epigenetic control. However, it is known that genes involved in metabolism can contribute to differences among individuals in regard to nutrient requirements and susceptibility to disease (MILAGRO et al., 2009). One of these genes is *ADRB3*, beta-3 adrenergic receptor, which has been associated with dyslipidemia (DIAS et al., 2015). *ADRB3* is located on chromosome 8 and contains a CpG island in its promoter region. *ADRB3* is expressed in the white and brown adipose tissues (Lonnqvist et al. 1995) and in peripheral lymphocytes (YU et al., 2007), and it is involved in lipolysis and thermogenesis regulation. Only two studies have evaluated its methylation profile in an obese population. The results are controversial, but one of the studies showed that *ADRB3* expression is lower in this population (GUAY et al., 2014, KURYLOWICZ et al., 2015). The decreased expression of this gene may lead to poor performance in lipolysis regulation in human brown and white adipose tissues that provide free fatty acids for

thermogenesis, i.e., there is indirect evidence from the studies conducted that *ADRB3* participates in the regulation of body weight in humans (KURYLOWICZ et al., 2015).

Studies evaluating the importance of the association of the DNA methylation profile with lifestyle (dietary habits, alcohol consumption, smoking, and physical activity), biochemical values, and nutritional status in adults should promote new research to support intervention strategies in the fight against non-communicable diseases (LILLYCROP et al., 2014; DO AMARAL et al., 2014).

In this context, we propose in this study— a population-based study of the *ADRB3* gene—to analyze the *ADRB3* methylation profile and its association with nutritional status, regular lipid intake, the lipid profile, and biochemical, lifestyle, and socioeconomic markers in adults of both genders.

2. Methods

2.1. Study Design

This is a cross-sectional epidemiological study linked to the project titled: “II Cycle of Diagnosis and Intervention of Food and Nutritional Status and the Most Prevalent Non-Communicable Diseases in the Population of the Municipality of João Pessoa/PB” (II Ciclo de Diagnóstico e Intervenção da Situação Alimentar, Nutricional e das Doenças não Transmissíveis mais Prevalentes da População do Município de João Pessoa/PB, II DISANDNT/PB). Data were collected between May 2015 and May 2016.

2.2. Ethical Issues

This study was submitted to and approved by the Research Ethics Committee of the Health Sciences Center (Centro de Ciências da Saúde, CCS) of the Federal University of Paraíba (Universidade Federal da Paraíba, UFPB) under protocol number 0559/2013 in accordance with the ethical standards for research involving human beings included in Resolution 466 of the December 12, 2012 meeting of the National Health Council/National Research Ethics Committee.

Upon the identification of households in the blocks drawn for all neighborhoods located in the East and West regions of the municipality of João Pessoa, the researchers introduced themselves to the residents, stating the objective of the study and inviting them to participate in the study, while following the ethical guidelines governing research on human beings. Participants provided consent by signing an informed consent form.

2.3 Sampling

To conduct this population-based study that was representative of the East and West regions of the municipality of João Pessoa, a sample that was representative of the adult group was calculated using information provided by the city hall, such as the city map, number of blocks per neighborhood, and data from the Brazilian Institute of Geography and Statistics (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, IBGE) (IBGE, 2010).

For the sample calculation, a single stratified sampling procedure was used. Given the heterogeneity of the variable “income” and the relationship between income, disease prevalence, and nutrition (KAC et al., 2007), a stratified sampling approach was used (COCHRAN, 1977) for the blocks at a first level. At this level, the neighborhoods of the East and West regions of the municipality were classified into four income strata according to information obtained from the IBGE (2010).

Therefore, all the 24 neighborhoods of the East and West regions of the municipality of João Pessoa were visited, totaling 2,961 blocks, with an estimate of visits for 105 blocks. After determining the number of blocks to be sampled in each neighborhood, a random drawing was performed. For this purpose, the city map with the numbered blocks was used, and random numbers with uniform distribution were generated using a pseudorandom number generator and the Core R Development Team (2006) software for selection. The diagram for the definition of the sample representative of the East and West regions of the municipality of João Pessoa/PB is shown in Figure 1.

This study had the following inclusion criteria: individuals aged 20–59 years; different socioeconomic conditions, and medication users and non-users. Exclusion criteria included the following: individuals with neuropsychiatric disorders; multivitamin, mineral, anorexigen, and anabolic supplement users; and pregnant and lactating women.

2.4 Data Collection

The household visits and application of the questionnaires were conducted by graduate students of the Nutrition Programs. These are Master’s and doctoral students in the Graduate Program in Nutrition Sciences (Programa de Pós Graduação em Ciências da Nutrição, PPGCN) at UFPB who were trained before initiating data collection after the pilot study was conducted.

The trained teams, upon recognition of the blocks selected, were instructed to select all the households in the block.

At each household selected, all the adult individuals aged 20–59 years were invited to participate in the study through the application of questionnaires for demographic, socioeconomic, and epidemiological characterization and nutritional and food intake assessment, and biochemical evaluation and *ADRB3* gene methylation profiling were performed with consent.

2.5 Nutritional Assessment

Weight and height measurements were taken in triplicate, and the average of the three values was used. The World Health Organization (WHO) recommends the following cutoffs of body mass index (BMI) to classify the nutritional status of adults between 20 and 59 years of age: $<18.5 \text{ kg/m}^2$ (underweight), $18.5\text{--}24.9 \text{ kg/m}^2$ (normal weight), $25.0\text{--}29.9 \text{ kg/m}^2$ (overweight), $30.0\text{--}39.9 \text{ kg/m}^2$ (obesity), and $\geq 40 \text{ kg/m}^2$ (morbidly obese) (WHO, 2000).

The indicators used to determine the abdominal obesity status were waist circumference and waist-hip ratio (WHR). The American Heart Association recommends cutoffs of waist circumference to determine the abdominal obesity status of $\geq 102 \text{ cm}$ in men and $\geq 88 \text{ cm}$ in women (GRUNDY et al., 2005). According to the WHO, abdominal obesity is defined as a WHR >0.90 in men and >0.85 in women (WHO, 1999).

2.6 Dietary Assessment

Food intake data were obtained through interviews conducted at the participant's house on two business days and one weekend day, using 24-h recall. More specifically, all the participants in the study were asked to describe the type and amount of food and drinks consumed the day before.

To improve accuracy in the description of the food products, common household measures (cups, spoons, etc.) were used, and a book with images of food depicted in four sizes (small, medium, large, and extra-large) were used to ascertain the most likely weight of the food products consumed. This procedure was adopted to effectively quantify the consumed portion sizes and to minimize potential memory biases of the individuals studied (LIMA et al., 2007; LIMA et al., 2008; ASCIUTTI et al., 2005)

At the end of each interview, the interviewers, who were nutritionists rigorously trained to minimize the interviewer's effects, reviewed the food intake data collected with the interviewee to clarify entries, portions, and potentially forgotten food products. The food data were converted into the respective macro and micronutrient values and analyzed using DietWin software version 2013.

For the assessment of nutrient intake, only complete 24-hour recalls with energy intake between 500 and 5,000 kcal/day were considered (PEREIRA et al., 2013; COSTA et al., 2008). Nutrient intake data were adjusted for inter and intra-individual variations using the Multiple Source Method (MSM) (MSM, 2012) available online (<https://msm.dife.de/tps/msm/>).

2.7 Individual Energy Intake Calculation

The calorie intake was calculated individually and for each gender, according to the formula proposed by OTTEN et al., (2006). For men, $EER = 662 - (9.53 \times \text{age (years)}) + PA \times [(15.91 \times \text{weight (kg)}) + (539.6 \times \text{height (m)})]$, and for women, $EER = 354 - (6.91 \times \text{age (years)}) + PA \times [(9.36 \times \text{weight (kg)}) + (726 \times \text{height (m)})]$, where EER is the Estimated Energy Requirements, and PA is the Physical Activity factor.

2.8 Biochemical Tests

Blood was collected on the third day of household visits, and the individuals were contacted to schedule the day and time for testing and to receive instructions in regard to the 12-hour fasting period before the blood draw. A second call was made one day before the draw to confirm the blood collection and emphasize the instructions (use of medication, allergies, 12-hour fasting, engagement in vigorous physical activity) in preparation for the test. The blood was collected by an experienced nurse.

Vacutainers® were used (two 4-mL tubes) for the blood collection. One was for serum analysis (tube with clot activator), and the other was for plasma analysis (with ethylenediaminetetraacetic acid [EDTA] anticoagulant). The blood was collected from the brachial vein, and the tourniquet was positioned along the arm's midline. The tubes were maintained inside a thermal box during blood collection, where they remained for a maximum of two hours.

Lipid profiling was performed using kits (Labtest® Brazil) to measure total cholesterol through the Trinder enzymatic method, high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) through the precipitation method, and triglycerides through the Trinder enzymatic method. Next, the values for plasma low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) were estimated by the equation proposed by Friedewald (1972), where $(LDL-C = \text{Total Cholesterol} - HDL-C - \text{Triglycerides}/5)$. Malondialdehyde (MDA) was quantified through the reaction of thiobarbituric acid (TBA) with hydroperoxide decomposition products, as described by Ohkawa, Ohishi, and Yagi (1979).

The total antioxidant capacity (TAC) was measured with DPPH (1.25 mg diluted in 100 mL of ethanol and protected from light). All tests were performed at the Research Laboratory of Physical

Training Applied to Performance and Health at the Department of Physical Education of the Federal University of Paraíba.

Homocysteine and folic acid concentrations were measured at the Roseane Dore Clinical Laboratory. Homocysteine was quantified with the method described by Pfeiffer et al., using high-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection and isocratic elution (PFEIFFER et al., 1999) with an analytical sensitivity of 1.74 $\mu\text{mol/L}$. Folic acid was analyzed with the chemiluminescence method, considering the reference value $>3.10 \text{ ng/mL}$ and an analytical sensitivity of 0.5 ng/mL .

2.9 DNA Methylation Profile

2.9.1 Sample Extraction and Isolation of Genomic DNA

With the help of a *Vacutainer*® containing EDTA, 5 mL of whole blood was obtained. Upon collection, the blood was centrifuged for 10 min at 300 rpm to obtain the leukocyte pellet. Genomic DNA was extracted from the leukocytes using TRIZOL LS (Life Technologies, California, USA) according to the manufacturer's recommendations. The genomic DNA was quantified with a Nanodrop® spectrophotometer (Thermo Scientific, California, USA) and stored at -20°C until further analysis.

2.9.2 DNA Methylation Analysis of the ADRB3 Gene Promoter

Methylation analysis was performed using methylation-specific PCR (MSP). The genomic DNA (800 ng) was modified with sodium bisulfite using the Cells-to-CpG™ Bisulfite Conversion Kit (Life Technologies) according to the manufacturer's specifications. The CpG sites studied are located in a CpG island in the promoter region spanning nucleotides -807 to -747, as confirmed by the Methyl Primer Express v.1.0 software (Applied Biosystems) from data deposited in GenBank. The differences in DNA sequences after treatment were detected by PCR using primers specific for methylated (F: 5'-GTAGGAGAAGCGTTTGAATTC-3', R: 5'-TTTTTTTAAAACGACGTCTCG-3') and unmethylated DNA (F: 5'-GAGGTAGGAGAAGTGTTTGAATTT-3', R: 5'-TTTTTTTAAAACAACATCTCACT-3') sequences, generating a 109-bp fragment (GenBank accession number DQ104441.1) (see Figure 2). Each MSP reaction included 100 ng of bisulfite-modified DNA, 1 μL (10 μM) of each primer and Go Taq Hot Start Green Master Mix 1x (Promega Corporations, Madison, WI, USA) in a 25- μL of final reaction volume. The conditions for fragment

amplification were as follows: 95°C x 5 min; 40 cycles of 95°C x 1 min, 60°C – methylation conditions / 55°C – non-methylation conditions – x 1 min, and 72°C x 7 min, and a final elongation at 72°C x 5 min. Following amplification, 10 µL of the PCR samples were loaded onto a 10% polyacrylamide gel for electrophoresis and stained with Gel Red (Biotium). Methylated and unmethylated DNA (Cells-toCpGTM Methylated & Unmethylated gDNA Control Kit, Life Technologies) was modified as previously described and amplified by PCR for use as positive controls (see Figure 2).

3. Statistical Analysis

To achieve the objectives proposed, an initial descriptive analysis of the characteristics of the sample represented by simple frequencies was performed using measures of central tendency and dispersion (mean, standard deviation, and median). The data were evaluated for normality using the Lilliefors test, a modification of the Kolmogorov-Smirnov test (SIEGEL, 1977). The statistical analysis was conducted with STATA 13 software. To calculate the nonlinear regression, the odds ratio was used, and the median of the continuous variables was used to identify the coefficient's signal and the existence of a significant association between the variables based on the following models:

Model 1

$ADRB3$ hypermethylation = β_0 + β_1 normal weight + β_2 overweight + β_3 obese + β_4 waist-hip ratio + β_5 alcohol consumption + β_6 physical activity + β_7 calories + β_8 total fat + β_9 saturated fat + β_{10} polyunsaturated fat + β_{11} monounsaturated fat + β_{12} cholesterol + β_{13} trans fat + β_{14} folate.

Model 2

$ADRB3$ hypermethylation = β_0 + β_1 total cholesterol + β_2 LDL + β_3 HDL + β_4 triglycerides + β_5 MDA + β_6 TAC + β_7 homocysteine + β_8 folic acid

All variables with P value <0.05 were included in the model and considered significant.

4. Results

Data on the general, anthropometric, food intake, and biochemical characteristics of the adult individuals are presented with the methylation status of *ADRB3* in Table 1. The total sample included predominantly women, and more than half of the adults were overweight and obese based on the BMI. Approximately 50% of the population studied presented hypermethylation of *ADRB3* (Table 1

Table 1. General characteristics of the adult individual.

			Mean	Standard deviation	Median	N	%
Demographic, Socioeconomic and Lifestyle Characteristics							
Gender	Male		-	-	-	79	30
	Female		-	-	-	186	70
Menopausal women (≥ 50 years) ^y						61	32.8
Age	20–59 years		40.3	14.3	39.5	265	100
Education level ¹	Complete elementary school		-	-	-	56	21.13
	≥ incomplete middle school		-	-	-	209	78.9
Household Income (\$) ²			1,458.43	1,595.5	820.51	265	100
Alcohol Consumption	Yes		-	-	-	42	15.8
	No		-	-	-	223	84.2
Smoker	Yes		-	-	-	21	8.0
	No		-	-	-	244	92.0
Physical Activity (150 min/week)	Yes					108	40.75
	No					157	59.24
	Days per week		4.5	1.4	4.5	108	48.0
	Duration of activity, min/week		403	220	360	108	40.75
Anthropometric Characteristics							
	Weight (kg)		72.11	16.74	71.6		100 %
	Height (m)		1.63	0.09	1.62		100 %
	BMI (kg/m ²)		27.08	5.88	26.71		100 %
	Waist (cm)		0.86	0.15	0.86		100 %
	Hip (cm)		1.02	1.02	12.3		100 %
Nutritional Classification*(kg/m ²)							
	Underweight/Normal weight		21.8	2.37	22.36	124	46.8
	Overweight		27.63	1.33	27.62	82	31
	Obese		34.63	4.95	32.81	59	22.2
Food Intake							
	Calories (kcal)		1678	390.6	1625		
	Total Fat (g)		54.92	18.44	50.58		
	Cholesterol (mg)		216.94	125.82	187.16		

	Saturated Fat (g)	16.99	6.51	16.58		
	Monounsaturated Fat (g)	14.39	5.33	13.39		
	Polyunsaturated Fat (g)	13.64	7.55	12.1		
	Oleic acid (g)	10.23	4.47	9.32		
	Omega-6 (g)	6.30	2.70	6.07		
	Omega-3 (g)	0.70	0.44	0.59		
	Trans Fat (g)	0.65	0.4	0.56		
	Folate (mcg)	130.0	22	144.0		
Biochemical Tests						
	Homocysteine (micromol/L)					
	Men (RV: 6.42 to 18.08)	11	9.8	6.6		
	Women (RV: 5.32 to 15.22)	10	8.5	5.95		
	Folic Acid (RV: >3.10 ng/mL)	13.5	5.1	12.5		
Lipid Profile (mg/dL)						
	Cholesterol (Desirable VR: <200)	184.2	42.5	178		
	LDL (Desirable RV: 100 - 129)	103.5	51.4	95		
	HDL (Desirable RV: >60)	41.2	10.6	40		
	Triglycerides (Desirable RV: <150)	140	87.7	111		
Oxidative Stress						
	TAC ³ (%) (RV: 0 – 100%)	41	14	42		
	MDA ⁴ (RV: 2.3 to 4.0 μmol/L)	2.7	0.7	2.7		
DNA METHYLATION						
ADRB3	Unmethylated	-	-	-	56	21.13
	Methylated	-	-	-	133	50.18
	Partially methylated	-	-	-	76	28.7
	Total				265	100

Note: [‡] According to the Ministry of Health (2008); ¹Completed elementary school corresponds to 9 years of school, and $\geq$ complete elementary school corresponds to more than 10 years of school; ²The income was based on the value of 3.90 BRL per USD *According to the WHO (1999); ³TAC – total antioxidant capacity; ⁴MDA – malondialdehyde; Abbreviations: RV – reference value; BMI – body mass index.

In Table 2, the nutritional status and the median values for regular energy, total fat, saturated fat, monounsaturated fat, polyunsaturated fat, cholesterol, and trans fat intake were analyzed for the hypermethylated individuals. The individuals who are overweight have a 228% higher chance of *ADRB3* hypermethylation (OR: 3.28), and obese individuals have a 206% higher chance of hypermethylation (OR: 3.06); men with a WHR >0.90 cm present a 17% higher chance of hypermethylation (OR: 1.17), and individuals with a trans fat intake above the median have a 94% (OR: 1.94) higher chance of hypermethylation. For folate intake, the OR was lower than 1 and was not considered a risk factor.

Table 2. Odds ratio (95% CI) for the association of nutritional status, lifestyle, and food intake according to *ADRB3* hypermethylation of adult individuals.

All the individuals (men and women)	Hypermethylated <i>ADRB3</i>	95% CI		
All the individuals	OR	P value	LL	UL
Normal weight (kg/m ²) ¹	1.45	0.397	0.6135	3.4311
Overweight (kg/m ²) ¹	3.28	0.008*	1.3668	7.8767
Obese (kg/m ²) ¹	3.06	0.017*	1.2246	7.6582
Waist-hip ratio (men) (cm/cm)	1.17	0.000*	0.0639	2.4535
Waist-hip ratio (women) (cm/cm)	1.18	0.568	0.5942	1.3168
Alcohol Consumption	0.16	0.641	0.5332	0.8660
Physical Activity	0.44	0.548	0.3548	0.6683
Calories (kcal)				
>median	1.32	0.364	0.7190	2.4564
Total Fat (g)				
>median	0.92	0.854	0.4088	2.0979
Saturated Fat (g)				
>median	1.77	0.170	0.7809	4.0479
Polyunsaturated Fat (g)				
>median	0.65	0.142	0.3672	1.1543
Monounsaturated Fat (g)				
>median	0.79	0.524	0.3854	1.6246
Cholesterol (mg)				
>median	1.60	0.113	0.8934	2.8944
Trans Fat (g)				
>median	1.94	0.032*	0.2658	2.0363
Folate (mcg)				
>median	0.56	0.132	0.2344	1.2345

¹ (WHO, 1999); Abbreviations: CI – confidence interval, LL – lower limit, UL – upper limit, OR – odds ratio. Note: Also conducted with omega-3 and omega-6 intake but without significant difference. *p< 0.05.

In Table 3, the median values of blood lipids, oxidative stress, homocysteine, and folic acid were also used, and an association with cholesterol values greater than the median was observed, which indicates that individuals with values above the median present a 127% higher chance of having *ADRB3* hypermethylation (OR: 2.27).

LDL above the median values represents a 164% higher chance of *ADRB3* hypermethylation, whereas individuals with triglyceride values above the median present a 81% (OR: 1.81) higher chance of hypermethylation, and individuals with folic acid values below the median present a 85% higher chance of hypermethylation.

Table 3. Odds ratio (95% CI) for the association of biochemical test results with *ADRB3* hypermethylation of the adult individuals.

All the individuals (men and women)	Hypermethylated <i>ADRB3</i>	95% CI		
All the individuals	OR	P value	LL	UL
Cholesterol (mg/dL)				
>median	2.27	0.010*	0.2357	2.8182
LDL (mg/dL)				
>median	2.64	0.003*	1.3959	4.9970
HDL (mg/dL)				
>median	0.62	0.101	0.3572	1.0960
Triglycerides (mg/dL)				
>median	1.81	0.031*	1.056	3.1099
MDA (μ mol/L)				
>median	1.02	0.938	0.6089	1.7109
TAC (%)				
>median	0.73	0.233	0.4383	1.2224
Homocysteine (μ mol/L)				
>median	0.82	0.484	0.4924	1.3985
Folic Acid (ng/mL)				
>median	0.53	0.022*	0.0926	2.1429

*p<0.05.

In Table 4, the prevalence of inadequate energy; total, saturated, monounsaturated, polyunsaturated, and trans fat; cholesterol, and folate intake is shown. The majority of the adults had a calorie intake below the recommended intake (80.6%), and total, monounsaturated, and polyunsaturated fat intakes were within the recommended range. With regard to saturated fat intake, the majority presented intake below the recommended value, and the same situation was observed for folate intake.

Table 4. Prevalence of inadequate intake of regular energy; total, saturated, monounsaturated, polyunsaturated, and trans fat; cholesterol; and folate.

Nutrient	Average regular intake	Recommended intake	>Recommended intake (%)	<Recommended intake (%)	Intake within the reference range
Calories					
Men	1834.78 kcal	2855 ^{1*}	03 (3.8)	70 (80.6)	06 (7.6)
Women	1611.46 kcal	2208 ^{1*}	14 (7.5)	145 (54.7)	27 (14.5)
Total Fat	54.92 g	25-35% ²	49 (18.5)	22 (8.3)	194 (73.2)
Saturated Fat	9%	<10% ²	97 (36.6)	168 (63.4)	-
Monounsaturated Fat	14.39%	<20% ²	-	-	265 (100)
Polyunsaturated Fat	13.64%	<10% ²	35 (13.2)	-	230 (86.8)
Folate ² (µg)	130	320 ³	34 (12.8)	200 (75.5)	31 (11.7)

¹ The recommendations were evaluated individually, according to the formula proposed by OTTEN et al., (2006); ²American Heart Association (2010); ³According with the Dietary Guidelines for Americans (2010); * Average recommended intake.

5. Discussion

The results of this study demonstrate that *ADRB3* gene methylation was present in half of the population studied; the majority of the population were women, were overweight and obese, had an average income of 1,458.43 USD, and completed middle school.

This methylation profile was associated with being overweight and obese for both genders and with a higher waist-hip ratio for men. In regard to regular nutrient intake, hypermethylation was only associated with a trans fat intake above the median, and when correlated with the lipid profile, there was a significant association with cholesterol, LDL, and triglyceride levels above the median, in addition to an association with folic acid values below the median.

Hypermethylation of the *ADRB3* gene promoter in blood cells and visceral fat tissue has previously been associated with the development of obesity and metabolic complications in men (GUAY et al., 2014). By contrast, a different study revealed that there is no association between obesity and *ADRB3* hypermethylation in the fat tissue of obese men (KURYLOWICZ et al., 2015), but it is not clear in that study which CpG site in the promoter was studied, and decreased *ADRB3* expression was observed in this population. It is known that the methylation profile can vary in different tissues (Thompson et al. 2010) and CpG sites (de Oliveira et al. 2015), and it can also vary for populations that differ in intrinsic factors such as age or gender (Bezerra et al. 2015, El-Maarri et

al. 2007) and extrinsic factors such as diet and smoking (Lillicrop et al. 2014, de Oliveira et al. 2015), which may explain the difference between the studies.

Also in regard to the associations found in this study among *ADRB3* DNA hypermethylation, an increased likelihood of being overweight and obese, and a higher waist-hip ratio for men, researchers suggest that the expression of the *ADRB3* gene, which codes for the β -adrenergic receptor, was significantly reduced in fat tissue in obese individuals (KURYLOWICZ et al., 2015). In regard to the waist-hip ratio, Guay et al. (2014) also found that *ADRB3* hypermethylation was associated with a higher waist-hip ratio in men with a diagnosis of hypercholesterolemia.

Further studies must be conducted because the waist-hip ratio better defines abdominal obesity; men have more visceral fat, and women have more subcutaneous fat due to the effects of sexual hormones, which play an important role in the regulation of body fat distribution (WELLS, 2007), although the molecular mechanisms involved remain obscure. Therefore, it would be worth investigating the association between genetics and sexual hormones (WEN et al., 2016).

Another relevant finding of this study was the correlation of hypermethylation with regular trans-fatty acid (TFA) intake, even with a median intake below the recommended allowance (COZZOLINO, 2013). There are no studies available for comparative purposes but it is thought that the intake of this type of fatty acids may be associated with the development and worsening of cardiovascular disease. For this reason, the first ban on the marketing of TFA-containing foods was approved by the Food and Drug Administration in 2015.

There was no association found between *ADRB3* methylation and total energy or nutrient intake, but the food ingested by the majority of the population studied was within the recommended range based on the calculation of the prevalence of inadequate consumed dietary components, noting that calorie requirements were calculated individually for the whole population based on the variables gender, age, physical activity, weight, and height (OTTEN et al., 2006). For other nutrients, the intake was lower or within the recommended range for more than 60% of the population.

However, regarding the individuals who perform physical activity, less than 50% classified as active based on the American College of Sports Medicine (ACSM, 2011), and the majority had a healthy lifestyle considering the other lifestyle variables.

A high prevalence of inadequate folate intake was observed, affecting 88% of the studied population, and no association between *ADRB3* hypermethylation and folate intake was observed. Other studies have focused on nutrients that influence the DNA methylation process, such as folate, vitamin B12, B6, choline, and betaine, because they are methyl donors (SINCLAIR et al., 2007; HOLLINGSWORTH et al., 2008; GERAGHTY et al., 2015).

The association of *ADRB3* hypermethylation with the blood lipid profile was also investigated, and a significant association of hypermethylated individuals presenting higher total cholesterol, LDL-C, and triglyceride levels was observed, but no association with HDL-C was seen. These findings are in agreement with studies conducted by Guay et al. (2014), who justify this association with the fact that the *ADRB3* gene is a potential candidate for dyslipidemia.

No significant association was found with homocysteine, but no homocysteine levels above the reference values were observed in this study, which may explain the absence of an association.

Folic acid intake was within the recommended values and showed an association with individuals with hypermethylated *ADRB3*, as found by Claycombe et al. (2015). Folic acid is a well-known methyl donor and thus has a relevant impact on the methylation profile (YARA et al., 2015).

Oxidative stress was also associated with *ADRB3* hypermethylation, but not to a level of significance. However, the levels of the oxidative stress indicators used in the present study, TAC and MDA, were within the reference range. In the literature, there are only reports of the induction of DNA methylation changes by the inflammatory process (HUANG et al., 2012; XIA et al., 2012).

Taken together, our data suggest that *ADRB3* hypermethylation may exacerbate the epidemics of metabolic disorders, contributing to the development of obesity and dyslipidemia and might contribute to the transmission of these changes to the next generation through transgenerational inheritance (EINSTEIN, 2010). With regard to the function of *ADRB3* in energy intake, the lipid profile, and folic acid levels, the study of epigenetic variation in this gene may contribute to a better understanding of the molecular basis of obesity and cardiovascular diseases.

6. Conclusions

In conclusion, in this analysis of DNA methylation of the *ADRB3* gene in a population-based study in both genders, the most relevant results obtained were the high prevalence and association between *ADRB3* DNA hypermethylation with overweight and obesity in both genders, a higher waist-hip ratio for men, higher trans fat intake, an altered lipid profile, and decreased folic acid intake.

Therefore, considering that DNA methylation may have an impact in adulthood because of its persistence, in particular in regard to the development of non-communicable diseases, data from this study may help in the use of DNA methylation as an effective biomarker. Moreover, the study of epigenetic changes may contribute to a better understanding of the frequently observed associations between lifestyle factors, genetics, and metabolic disorders. However, additional studies must be conducted to determine if the findings of this study are causal or correlative.

Author Contributions

Raquel Patrícia Ataíde Lima contributed to data management, statistical analysis, data interpretation, and the writing of the manuscript. Marina Ramalho Ribeiro and Rayner Anderson Ferreira Nascimento contributed to data acquisition and biochemical tests. Rafaela Cristine Pordeus Luna contributed to data management. Naila Fancis Paulo de Oliveira coordinated the DNA methylation analyses and was involved in the critical review of the manuscript. Maria da Conceição Rodrigues Gonçalves, Rodrigo Pinheiro de Toledo Vianna, Alcides da Silva Diniz, Marciane Magnani, and Hubert Vidal were involved in the development of the manuscript or in the critical review of relevant intellectual content. Alessio Tony Cavalcante Almeida and Ronei Marcos de Moraes contributed to study design and statistical analysis. Maria José de Carvalho Costa contributed to study design, statistical analysis, data interpretation, and writing the manuscript; she coordinated data collection and was involved in the development of the manuscript or in the critical review of relevant intellectual content. All authors read and approved the final manuscript.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

MARTINEZ, J.A.; FERMÍN, I.M.; CLAYCOMBE, J.K.; SCHALINSKE, K.L. Epigenetics in Adipose Tissue, Obesity, Weight Loss, and Diabetes. **Advances in nutrition**, v.5,p.71-81,2014.

HOLLIDAY, R. Epigenetics: a historical overview. **Epigenetics**, v. 1, n. 2, p. 76-80, 2006.

ZHENG, J.; XIAO, X.; ZHANG, Q.; YU, M. DNA methylation: the pivotal interaction between early-life nutrition and glucose metabolism in later life. **British Journal of Nutrition**, v. 112, n. 11, p. 1850-7, 2014.

BISHOP, K.S.; FERGUSON, L.R. The Interaction between Epigenetics, Nutrition and the Development of Cancer. **Nutrients**, v. 7,n.2,p. 922 – 947,2015.

GILBERT, E.R.; LIU, D. Epigenetics: the missing link to understanding beta-cell dysfunction in the pathogenesis of type 2 diabetes. **Epigenetics**, v. 7, p.841–852, 2012.

MILAGRO, F.I.; CAMPIÓN, J.; GARCÍA-DÍAZ, D.F.; GOYENECHEA, E.; PATERNAIN, L.; MARTÍNEZ, J.A. High fat diet-induced obesity modifies the methylation pattern of leptin promoter in rats. *Journal of Physiology and Biochemistry*, v. 65, p. 1-9, 2009.

DIAS, M.M.; SOUZA, F.R.; TAKADA, L.; FEITOSA, F.L.; COSTA, R.B.; DIAZ, I.D.; CARDOSO, D.F.; TONUSSI, R.L.; BALDI, F.; ALBUQUERQUE, L.G.; OLIVEIRA, H.N. Study of lipid metabolism-related genes as candidate genes of sexual precocity in Nellore Cattle. *Genetics and Molecular Research*, v. 14, n.1, p. 234 – 243, 2015.

GUAY, S.P.; BRISSON, D.; LAMARCHE, B.; BIRON, S.; LESCELLEUR, O.; BIERTHO, L.; MARCEAU, S.; VOHL, M.C.; GAUDET, B.; BOUCHARD, L. ADRB3 gene promoter DNA methylation in blood and visceral adipose tissue is associated with metabolic disturbances in men. *Epigenomics*, v.6,n.1, p. 33 – 43, 2014.

KURYLOWICZ, A.; JONAS, M.; LISIK, W.; JONAS, M.; WICIK, Z.A.; WIERZBICKI, Z.; CHMURA, A.; PUZIANOWSKA-KUZNICKA, M. Obesity is associated with a decrease in expression but not with the hypermethylation of thermogenesis – related genes in adipose tissues. *Journal of Translational Medicine*, v.13,n.31,p.1-10,2015.

LILLYCROP, K. A.; HOILE, S. P.; GRENFELL, L; BURDGE, G. C. DNA methylation, ageing and the influence of early life nutrition. *Proceedings of the Nutrition Society*, v. 73, n. 3, p. 413-421, 2014.

DO AMARAL, C. L.; MILAGRO, F. I.; CURI, R; MARTÍNEZ, J. A. DNA methylation pattern in overweight women under an energy-restricted diet supplemented with fish oil. *Biomed Research International*, v. 2014, p. 1-10, 2014.

COCHRAN, W. G. **Sampling Techniques**. 3rd ed New York: Walter A. Shewhart; 1977,448p.

KAC, G.; SICHIERI, R.; GIGANTE, D. P. *Epidemiologia Nutricional*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz/ Editora Atheneu, 2007. 580p.

BOLFARINE H, BUSSAB, W.O. Elementos de amostragem. São Paulo: **Edgard Blucher**; 2005. 269p.

WHO - World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. **Technical Report Series**, v. 894, p. 11 – 253, 2000.

WHO - World Health Organization. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. **Report of a WHO consultation**. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1999.

GRUNDY, S.M.; CLEEMAN, J.I.; DANIELE, S.R. Diagnosis and management of the metabolic syndrome. **Circulation**, v. 112, p. 285 – 290, 2005.

OTTEN, J.J.; HELLWIG, J.P.; MEYERS, L.D. Dietary reference intakes: the essential guide to nutrient requirements, Washington, D.C.: **National Academies Press**, p. 543, 2006.

FRIEDEWALD, W.T.; LEVY, R.I.; FREDRICKSON, D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, v.18, p.499-502, 1972.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n.2, p.351-358, 1979.

PFEIFFER, C.M.; HUFF, D.L.; GUNTER, E.W. Rapid and accurate HPLC assay for plasma total Homocysteine and Cysteine in a clinical laboratory setting. **Clinical Chemistry**, v. 49, n.2, p.290-292, 1999.

GEMMA, C.; SOOKOIAN, S.; ALVARIÑAS, J.; GARCÍA, S.I.; QUINTANAL.; KANEVSKY, D.; GONZÁLEZ, C.D.; PIROLA, C.J. Maternal pregestational BMI is associated with methylation of the *PPARGC1A* promoter in newborns. **Obesity** (Silver Spring), v.17, n.5, p.1032-1039, 2009.

KHAZAMIPOUR, N.; NORUZINIA, M.; FATEHMANESH, P.; KEYHANEE, M.; PUJOL, P. MTHFR promoter hypermethylation in testicular biopsies of patients with non-obstructive azoospermia: the role of epigenetics in male infertility. **Human Reproduction**, v.24, n.9, p.2361-2364, 2009.

HINRICHSSEN, I.; KEMP, M.; PEVELING-OBERHAG, J.; PASSMANN, S.; PLOTZ, G.; ZEUZEM, S.; BRIEGER, A. Promoter methylation of MLH1, PMS2, MSH2 and p16 is a phenomenon of advanced-stage HCCs. **PLoS One**, v.9,n.1,p.1-9, 2014.

SIEGEL S. *Estatística não paramétrica para as ciências do comportamento*. McGraw-Hill do Brasil: São Paulo, 1977.

ATTWOOD, J. T.; YUNG, R. L.; RICHARDSON, B. C. DNA methylation and the regulation of gene transcription. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 59, p. 241-257, 2002.

WANG, S.C.; OELZEB, S. Age-specific epigenetic drift tin late onset Alzheimer's disease. **PLoS ONE**, v.3, n.7, p. 1-12, 2008.

WEN, W.; KATO, N.; HWANG, J,Y. et al. Genome-wide association studies in East Asians identify new loci for waist-hip ratio and waist circumference. **Scientific Reports**, v. 20,n.6,2016.

WELLS, J. C. *Sexual dimorphism of body composition*. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 21, p. 415–430,2007.

COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. Ed. Manole, 2ª Edição. São Paulo, 2007.

FDA – Food and Drug Administration. FDA Takes Step to Remove Artificial *Trans* Fats from Processed Foods, 2015. Available from:
<http://www.fda.gov/Food/NewsEvents/ConstituentUpdates/ucm449145.html>

MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. Krause: Alimentos, nutrição e dietoterapia. 13ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 1227 p.

AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE (2011). Disponível em:
http://www.acsm.org/docs/fit-society-page/2011summerfspn_behaviorchange.pdf. Accessed on 03 jan 2016.

AMERICAN HEART ASSOCIATION (AHA), **Dietary Guidelines for American (2010)**. Disponível em: <https://www.heart.org/idc/groups/heartpublic> (Acesso em 01 abril de 2016).

SINCLAIR, K.; ALLEGRUCCI, C.; SINGH, R, et al. DNA methylation, insulin resistance, and blood pressure in offspring determined by maternal periconceptional B vitamin and methionine status. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, p.19351–19356, 2007.

HOLLINGSWORTH, J.; MARUOKA, S.; BOON, K, et al. In utero supplementation with methyl donors enhances allergic airway disease in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n.10, p. 3462 – 3469, 2008.

GERAGHTY, A.A.; LINDSAY¹, K.L.; ALBERDI, G.; MCAULIFFE, F.M.; GIBNEY, E.R. Nutrition During Pregnancy Impacts Offspring's Epigenetic Status—Evidence from Human and Animal Studies. **Nutrition and Metabolic Insights**, v.8, 2015.

CLAYCOMBE, K.J.; BRISSETE, C.A.; GHRIB, O. Epigenetics of Inflammation, Maternal Infection, and Nutrition. **Journal of Nutrition**, doi: 10.3945/jn.114.194639, 2015.

YARA, S.; LAVOIE,J.C.;LEVY,E. Oxidative stress and DNA methylation regulation in the metabolic syndrome. **Epigenomics**, v.7,n.2,p.283-300,2015.

HUANG, S.K.; SCRUGGS, A.M.; DONAGHY, J.; MCEACHIN, R.C.; FISHER, A.S.; RICHARDSON, B.C, et al. Prostaglandin E(2) increases fibroblast gene-specific and global DNA methylation via increased DNA methyltransferase expression. **FASEB Journal**, v. 26, n.9, p. 3703 – 3714, 2012.

XIA, D.; WANG, D.; KIM, S.H.; KATOH, H.; DUBOIS, R.N. Prostaglandin E2 promotes intestinal tumor growth via DNA methylation. **Nature Medicine**, v. 18, n.2, p. 224 – 226, 2012.

EINSTEIN, F.; THOMPSON, R.F.; BHAGAT, T.D. et al. Cytosine methylation dysregulation in neonates following intrauterine growth restriction. **PLoS ONE**, v. 5,n.1, 2010.

VANDEN BERGHE, W. Epigenetic impact of dietary polyphenols in cancer chemoprevention: lifelong remodeling of our epigenomes. **Pharmacological Research**, v.65, n.6, p. 565 - 576, 2012.

TOPEROFF, G.; ARAN, D.; KARK, J.D.; ROSENBERG, M.; DUBNIKOV, T.; NISSAN, B. et al. Genome-wide survey reveals predisposing diabetes type 2-related DNA methylation variations in human peripheral blood. **Human Molecular Genetics**, v. 21, n.2, p.371 – 383, 2012.

ASCIUTTI, L. S. R.; RIVERA, M. A. A.; COSTA, M. J. C.; IMPERIANO, E.; ARRUDA, M. S.; BANDEIRA, M. G.; ARRUDA, N. S. **Manual de porções média em tamanho real baseado no programa Dietsys para estudo de base populacional**. UFPB, 2005.

LIMA, F. E. L.; LATORRE, M. R. D. O.; COSTA, M. J. C.; FISBERG, R. M. Diet and cancer in Northeast Brazil: evaluation of eating habits and food group consumption in relation to breast cancer. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 4, p. 820-828, 2008.

LIMA, L. P.; SAMPAIO, H. A. C. Caracterização socioeconômica, antropométrica e alimentar de obesos graves. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 4, p. 1011-1020, 2007.

PEREIRA, D. DE C.; LIMA, R. P.; DE LIMA, R. T.; GONÇALVES, MDA. C.; DE MORAIS, L. C.; FRANCESCHINI, SDO. C.; FILIZOLA, R. G.; DE MORAES, R. M.; ASCIUTTI, L. S.; COSTA, M. J. Association between obesity and calcium: phosphorus ratio in the habitual diets of adults in a city of Northeastern Brazil: an epidemiological study. **Journal Nutrition.**, v. 12, n. 90, p. 1-11, 2013.

COSTA, M. J. C.; GUILLAND, J. C.; MOREAU, D.; BOGGIO, V. VITAMIN STATUS OF HEALTH SUBJECTS IN BURGUNDY (FRANCE). **Annals of Nutrition & Metabolism**, Estados Unidos, v. 40, p. 24-51, 2008.

Figure 1 Diagram for sample definition – East and West Regions of the Municipality of João Pessoa.

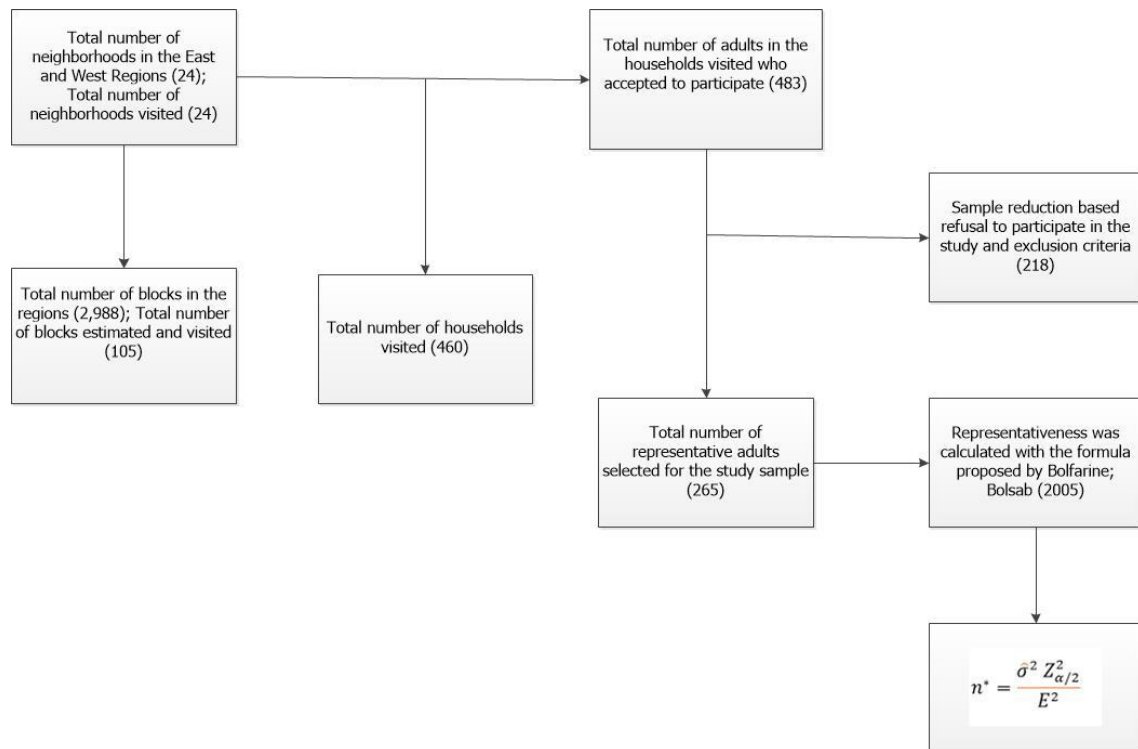


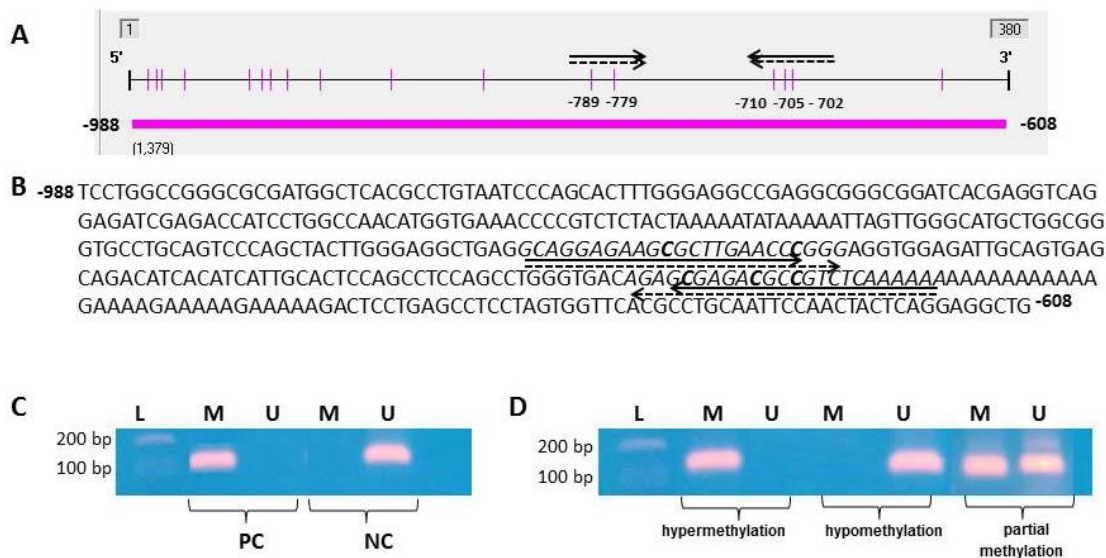
Figure 2. Sequence of the promoter region of *ADRB3*.

Figure. 2 (A) Schematic and **(B)** Partial genomic sequence of the CpG island in the promoter region of *ADRB3* ranging from -988 to -608 bp (GenBank accession number DQ104441.1). The CpG site studied is presented. Primer regions are indicated by arrows (solid for methylated sequence and dashed for non-methylated sequence). Horizontal bar- CpG island; vertical bars- CpG sites. **(C)** Bands of positive (methylated) and negative (unmethylated) control DNA, showing specific amplification for methylated and unmethylated conditions after polymerase chain reaction (109 bp). **(D)** Bands of representative samples of the three conditions found in the study population: hypermethylation, hypomethylation, and partial methylation. Partially methylated DNA refers to the amplified samples for methylated and unmethylated conditions indicating that methylation does not occur in all cells or alleles. L- DNA ladder; M- methylated; U- unmethylated; PC- positive control; NC- negative control.

ARTIGO 2

EFFECT OF A DIET CONTAINING FOLATE AND HAZELNUT OIL CAPSULE ON THE METHYLATION LEVEL OF THE *ADRB3* GENE, LIPID PROFILE AND OXIDATIVE STRESS IN OVERWEIGHT OR OBESE WOMEN

TITULO DA REVISTA: Clinical Epigenetics

ÁREA: MEDICINA II

QUALIS: A1

ISSN: 1868-7075

FATOR DE IMPACTO: 4,97

EFFECT OF A DIET CONTAINING FOLATE AND HAZELNUT OIL CAPSULE ON THE METHYLATION LEVEL OF THE *ADRB3* GENE, LIPID PROFILE AND OXIDATIVE STRESS IN OVERWEIGHT OR OBESE WOMEN

Raquel Patrícia Ataíde Lima^{1*}, Rayner Anderson Ferreira do Nascimento², Rafaella Cristhine Pordeus Luna³, Darlene Camati Persuhn⁴, Alexandre Sérgio da Silva⁵, Maria da Conceição Rodrigues Gonçalves⁶, Alessio Tony Cavalcanti de Almeida⁷, Ronei Marcos de Moraes⁸, Eliseu Verly Junior⁹, Emmanuelle Fouilloux-Meugnier¹⁰, Hubert Vidal¹¹, Luciano Pirola¹², Marciane Magnani¹³, Naila Francis Paulo de Oliveira¹⁴, Patrícia Oliveira Prada¹⁵, Maria José de Carvalho Costa¹⁶

¹ Graduate Program in Nutritional Sciences, Health Sciences Center (Centro de Ciências da Saúde - CCS), Federal University of Paraíba (Universidade Federal da Paraíba), Brazil. raquelpatriciaal@hotmail.com

² Graduate Program in Molecular and Human Biology, Center of Natural and Exact Sciences (Centro de Ciências Exatas da Natureza - CCEN), Federal University of Paraíba. raynerbiomedicina@gmail.com

³ Graduate Program in Nutritional Sciences, CCS, Federal University of Paraíba, Brazil. rafaellacristhine@yahoo.com.br

⁴ PhD Professor of the Graduate Program in Cellular and Molecular Biology, CCEN, Federal University of Paraíba. darlenecp@hotmail.com

⁵ PhD Professor of the Graduate Program in Nutritional Sciences, CCS, Federal University of Paraíba. alexandresergiosilva@yahoo.com.br

⁶ PhD Professor of the Graduate Program in Nutritional Sciences, CCS, Federal University of Paraíba. raul.ceica@ig.com.br

⁷ PhD Professor of the Department of Economics, Center for Applied Social Sciences (Centro de Ciências Sociais Aplicada - CCSA), Federal University of Paraíba. alessio.tony@gmail.com

⁸ PhD Professor of the Graduate Program in Decision Models in Health, CCEN, Federal University of Paraíba. roneimoraes@de.ufpb.br

⁹ PhD Professor of the Department of Epidemiology, Institute of Social Medicine, State University of Rio de Janeiro (Universidade Estadual do Rio de Janeiro). eliseujunior@gmail.com

¹⁰ PhD, Researcher at the University of Lyon 1, CARMEN-Villeurbanne Laboratory, France. emmanuelle.meugnier@univ-lyon1.fr

¹¹ PhD, Researcher at the University of Lyon 1, CARMEN-Villeurbanne Laboratory, France. hubertvidal@univ-lyon.fr

¹² PhD, Researchers from the University of Lyon 1, CARMEN-Villeurbanne Laboratory, France. lucianopirola@univ-lyon1.fr

¹³ PhD Professor of the Graduate Program in Nutritional Sciences, CCS, Federal University of Paraíba. magnani1@gmail.com

¹⁴ PhD Professor of the Graduate Program in Cellular and Molecular Biology, CCEN, Federal University of Paraíba. naila_francis@yahoo.com.br

¹⁵ PhD Professor Coordinator of the Graduate Program in Nutritional and Sport Sciences and Metabolism (Ciências da Nutrição, do Esporte e Metabolismo - CNEM), School of Applied Sciences (Faculdade de Ciências Aplicadas - FCA), State University of Campinas (Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP). pprada.fca@gmail.com

¹⁶ PhD Professor of the Graduate Program in Nutritional Sciences, CCS, Federal University of Paraíba. mjcosta@terra.com.br

* Current address: Pós-graduação em Ciências da Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, NIESN – Núcleo Interdisciplinar de Estudos em Saúde e Nutrição/ Universidade Federal da Paraíba, Castelo Branco, João Pessoa, PB 58059-900, Brazil

Corresponding author:

E-mail: raquelpatriciaal@hotmail.com

ABSTRACT

Studies of genes that play an important role in the development of obesity are needed, especially studies focusing on genes that regulate food intake and affect nutrient metabolism. For example, the beta-3 adrenergic receptor (*ADRB3*) responds to noradrenaline and mediates lipolysis in adipocytes.

Methods: This was a controlled intervention study involving 40 overweight and obese adult women in which food intake, anthropometric measurements, biochemical analyses and methylation levels of the *ADRB3* gene were evaluated before and after intervention. The individuals were randomized into 4 groups: Group 1 (G1) received 300 g of vegetables and legumes containing on average 191 µg/d of folate and 1 hazelnut oil capsule; Group 2 (G2) received 300 g of vegetables and legumes containing on average 191 µg/d of folate and 1 placebo capsule; Group 3 (G3) received 300 g of vegetables and legumes containing on average 90 µg/d of folate and 1 hazelnut oil capsule; and individuals in Group 4 (G4) were only followed-up and maintained their regular dietary habits. Statistical analysis was performed using analysis of variance (ANOVA), Student's t test and simple regression, using *STATA 13* software. **Results:** In the total sample, after the intervention, the women classified as overweight and obese did not present weight loss, and there was a reduction in the methylation levels of the *ADRB3* gene and malondialdehyde, as well as an increase in high-density lipoprotein cholesterol and total antioxidant capacity. **Conclusions:** The beneficial effect of the intake of a hazelnut capsule on the methylation levels of the *ADRB3* gene was demonstrated for the first time.

Keywords: *ADRB3*. Obesity. DNA methylation. Biochemical analyses. Diet

Trial registry: This study was registered at ClinicalTrials.gov, ID: NCT 02846025.

BACKGROUND

Obesity is a metabolic disease that is rapidly increasing around the world. Recent World Health Organization data show that over one third of adults over 18 years of age (38% of men and 40% of women) are overweight, with women in all regions being more prone to obesity than men [1].

In recent decades, obesity has been considered a result of an imbalance between energy intake and expenditure that is driven by easy access to high-calorie foods and reduced energy expenditure [2].

Other factors related to the prevalence of obesity are sleep disorders, endocrine disorders, oxidative stress, inflammation, increased maternal age, microbiota and genetics [3].

In addition to genetic factors, epigenetic mechanisms contribute to the unexplained inheritance of obesity and fat distribution [4]. These epigenetic changes have been associated with the effects of diet composition on health and disease or the long-term effects of gene-environment interactions [5,6]. Folate is a nutrient known to participate in DNA methylation and nucleotide reactions of biosynthesis and is also involved in the formation of methyl groups, which serves as a methyl donor in DNA methylation. Another component that possibly modulates the epigenetic profile is fat and its fractions. [4].

There are many important genes involved in the development of obesity whose expression is under the influence of epigenetic regulation. Recent studies have focused on evaluating changes in the methylation pattern of specific obesity-related genes.

DNA methylation represents one of the most important epigenetic mechanisms for regulating gene expression and is the most widely studied thus far. This mechanism involves the covalent attachment of a methyl group to the 5' position of the cytosine present in the genome of the DNA sequence by DNA methyltransferases (DNMTs) [1]. This methylation is the only known modification that targets DNA itself and is generally associated with gene silencing [7].

There is increasing evidence that gene methylation may contribute to obesity. In fact, studies of the methylation of candidate genes in animal and human models have demonstrated methylation

changes in promoters of several genes that are involved in obesity, appetite control and/or metabolism [8], namely the beta-3 adrenergic receptor (*ADRB3*), which responds to noradrenaline and mediates lipolysis in adipocytes [9].

In this context, the present study aims to evaluate the effect of a diet containing folate and hazelnut oil capsule on the methylation levels of the *ADRB3* gene, lipid profile and oxidative stress in overweight and obese women.

METHODS

STUDY DESIGN

This is a double-blind, placebo-controlled, intervention study linked to a population-based study titled “II Ciclo de Diagnóstico e Intervenção da Situação Alimentar, Nutricional e das Doenças não Transmissíveis mais Prevalentes da População do Município de João Pessoa/PB (II DISANDNT/JP) [Cycle II of Diagnosis and Intervention of the Food, Nutritional and Non-Communicable Diseases Statuses of the Population of the Municipality of João Pessoa/PB (II DISANDNT/JP)”, which was conducted between May 2015 and May 2016. Participants were selected from the sample of overweight and obese adults with the following inclusion criteria.

The following women were included: adult women aged 20 to 59 years, who were overweight or obese (body mass index (BMI) 25.0-35.0 kg/m²), with different socioeconomic levels, and who were users or non-users of medications and had a preserved cognitive status. The exclusion criteria included alcoholism, smoking, neuropsychiatric disorders, use of drugs known to interfere with folic acid metabolism (in the last 3 months), use of multivitamin or mineral supplements, use of anorexigenic substances or of anabolic substances, chronic diseases affecting the endocrine and metabolic system, pregnancy, plans to become pregnant and loss of weight during the study period.

After screening, 40 adult female subjects were selected by convenience sampling and were properly instructed regarding the study objectives according to ethical guidelines; the subjects consented to participate by signing an informed consent form. The study was approved by the

Research Ethics Committee of the CCS/UFPB, under the protocol number 0569/15 and registered in clinical trials under NCT 02846025.

EXPERIMENTAL PROTOCOL

After the eligibility criteria were assessed, the women were instructed to maintain the same weight, eating habits and levels of physical activity that were found during the baseline evaluation [10] and also received an individual diet plan 1 week before starting the dietary intervention (plateau week). All of the individuals' medical treatments remained unchanged throughout the study. At the end of the study, all participants received nutritional counseling for weight loss.

To calculate energy expenditure, the Dietary Reference Intake (DRI) formulas for maintaining body weight were used. Macronutrients were distributed according to the recommendations of the American Heart Association (AHA) [11], and the calculation and analysis of the nutrients present in the recommended diet were performed using the food equivalent system proposed by Costa [12]. The diet contained the following: carbohydrates: 45 - 65% (recommended level of 55%), protein: 10 - 35% (recommended level of 15%), and total fat: 25 - 35% (recommended level of 30%).

In the second week of the study, participants were randomized into 4 groups: Group 1 (G1), in which subjects received 300 g of vegetables and legumes containing on average 191 µg/d of folate and 1 hazelnut oil capsule (25g); Group 2 (G2), in which the subjects received 300 g of vegetables and legumes containing, on average, 191 µg/d of folate and 1 placebo capsule; Group 3 (G3), in which subjects received 300 g of vegetables and legumes containing on average 90 µg/d of folate and 1 hazelnut oil capsule (25g); and Group 4 (G4), in which subjects were only followed-up and maintained their regular dietary habits. To reach the folate concentrations planned for each group, the following foods were used: lentils, soybeans, corn, peas, carrots, zucchini, lettuce, chard, beetroot, broccoli, cauliflower, tomato and cucumber.

The hazelnut oil capsule that was offered was composed basically of monounsaturated fat (68%), rich in oleic acid.

Each group consisted of 10 women, who received daily vegetables and legumes containing folate for a total period of 8 weeks.

NUTRITIONAL AND FOOD ASSESSMENT

Weight and height were measured in triplicate, and the average of the 3 values was used. The BMI was then calculated as the body weight (kg) divided by the squared body height (meters), and the cut-off points recommended by the World Health Organization (WHO) were used [13]. Waist circumference (WC) was used to determine abdominal obesity, with the AHA cut-off point of ≥ 88 cm [14].

To evaluate the regular food intake of the individuals, two 24-hour dietary recalls (24HR) were performed, with a 15-day interval from the beginning of the intervention. The 24HR aimed to determine the dietary habits of the individuals and thus define the menu that would be implemented and to compare the intake at the end of the study. After the plateau week, a third 24HR was performed to check adherence to the nutritional counseling.

At the end of the 8 weeks of intervention, a fourth 24HR was performed to analyze the regular intake of calories and nutrients to determine whether the subjects adhered to the recommendations for the change in food intake in general and in folate intake after intervention.

To complete the 24HR, a food photograph album with household measures was used and was based on the actual weight of the average food intake validated for this population, thus minimizing possible biases of this method [15,16].

The foods were analyzed by the nutrition software Dietwin, and the multiple source method (MSM) was used to estimate the regular intake of the individual from repeated measurements in a determined period; the variation in intake was not affected by the method [17].

BIOCHEMICAL ANALYSIS

The biochemical analyses were performed twice: during the selection of the participants and after the end of the nutritional intervention. In both analyses, the levels of total cholesterol (TC) and its fractions (low-density lipoprotein (LDL) and high-density lipoprotein (HDL)), triglycerides, malondialdehyde (MDA), total antioxidant capacity (TAC), homocysteine and vitamin B12 were measured. The blood samples were collected after a 12-hour fast at home, using sterile vacuum tubes with and without anticoagulant, according to the guidelines for the use of sharp materials.

Lipid profile concentrations were determined using the turbidimetry method using a Labmax 240 premium-Labtest automated biochemical analyzer. For analysis of antioxidant activity through the plasma MDA and serum TAC, we used a previously described protocol [18]. Homocysteine levels were quantified using the high-performance liquid chromatography (HPLC) method [19]. The serum concentrations of folic acid and vitamin B12 were measured by chemiluminescence and an electrochemiluminescence immunoassay, respectively

METHYLATION LEVELS

DNA methylation in genomic DNA from blood was quantified at the CarMeN / Université de Lyon1 - France Laboratory.

Blood was chosen for the analysis as it is a metabolically active tissue, with an important role in the adverse inflammatory and vascular consequences of adiposity, and is widely used for clinical diagnostic purposes [20].

Whole blood was obtained before and after the intervention. The blood samples were obtained at 08:30 am $\pm$ 10 (min) in all patients and in both conditions (before and after intervention) to avoid a potential sampling time effect. DNA was isolated with a QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), and the DNA concentrations of the samples were determined using a Qubit® dsDNA HS Assay Kit. Genomic DNA was modified by bisulfite and amplified by AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (Applied Biosystems, California 94404, USA) using the sequence described in Box 1. The PCR program consisted of an initial enzymatic activation at 95°C for 10 minutes,

followed by 50 cycles of 45 seconds at 95°C, 45 seconds at 60°C and 45 seconds at 72°C and a final extension at 72°C for 10 minutes.

The analysis of the results was performed with PyroMark Q24 software (Qiagen, Hilden, Germany).

Figure 1. Primers used to analyze the methylation status.

Gene	Primers	Annealing Temperature
<i>ADRB3</i>	F 5'CCTTCCTTCTTCCCTACCG3'	64°C
	R 5'TGGTCTGGAGTCTCGGAGTC3'	

F: forward primer, R: reverse primer

STATISTICAL ANALYSIS

For proposed objectives, a descriptive analysis of the characteristics of the sample was performed first using the mean and standard deviation before and after intervention. Data were assessed for normality using the Lilliefors test, a modification of the Kolmogorov-Smirnov test [21]. Statistical analysis was performed with the STATA 13 software. To analyze the initial and final values after dietary intervention, the normal variables were analyzed using Student's t test. Moreover, analysis of variance (ANOVA) was used to compare the effects of the intervention between the 4 groups, and the relationship of methylation levels per group was evaluated by simple linear regression.

All analyses were performed with log10-transformed methylation percentages to obtain normality. For all statistical analyses, values of $P < 0.05$ were considered significant.

RESULTS

The study included 40 women classified as overweight or obese. Means and standard deviations are presented in table 1; the anthropometric measurements, DNA promoter methylation and biochemical parameters were evaluated before and after the dietary intervention.

It was observed, after intervention in the total sample, lower methylation levels of the *ADRB3* gene and increase in HDL-C, MDA and TAC values.

Table 1. Anthropometric characteristics, methylation level, lipid profile and oxidative stress of women before and after intervention.

Parameter	Before Intervention		After intervention		P Value
	Mean	SD	Mean	SD	
Weight (kg)	77.7	14.1	74.4	14	0.4013
Height (m)	1.59	1.1	1.59	1.1	-
BMI (kg/m ²)	30.5	5.3	29.2	5.1	0.3792
WC (cm)	0.94	0.12	0.90	0.12	0.3015
HC (cm)	1.14	0.12	1.01	0.11	0.2288
Waist-to-height ratio (WHtR; cm/m)	0.59	0.8	0.57	0.7	0.3471
Methylation level (%)	42.2	18.1	29.1	14.1	0.0006*
Total cholesterol (mg/dl)	201.6	46.2	194.8	48.1	0.5818
HDL-C (mg/dl)	44.3	9.6	50.7	9.2	0.0118*
LDL-C (mg/dl)	122.7	43.7	119.9	40.1	0.8103
Triglycerides (mg/dl)	146.7	80.6	150.5	67.7	0.8462
MDA	3.2	0.9	4	0.8	0.0029*
TAC (%)	41	13	53	12	0.0005*

Table 2 shows the methylation levels and food intake distributed by intervention group, with values for the following nutrients: folate, total fat, saturated fat, monounsaturated fat, polyunsaturated fat and trans fat. Regarding weight, the groups that had lower levels of methylation had lower weights.

For the calorie intake, no difference was obtained even with dietary intervention, and individuals did not consume the recommended values of folate (400 µg/day, according to the DRI). For total fat, the groups were within the recommended limit (25-30% fat corresponding to energy consumed); for saturated fat, all subjects consumed levels above the recommended (the guidelines recommend a saturated fat intake <10%); for monounsaturated fat, the groups consumed an adequate

amount (>15%), with the exception of group 4; for polyunsaturated fat, groups 2 and 4 did not reach the recommended amount (>10%).

Table 2 - Methylation levels of the *ADRB3* gene, anthropometric data and regular food intake of women of the post-intervention groups.

Variables	Group 1 Mean±SD	Group 2 Mean±SD	Group 3 Mean±SD	Group 4 Mean±SD	P Value
Methylation Levels (%)	25.3±5.2	34.7±3.5	18.1±2.6	38.3±3.5	0.0030*
Weight	70.15 ±2.93	80.56±6;60	73.48 ±2.08	75.91±2.62	0.3207
Calories	1444.1±114.5	1512.8±67.7	1454.8±100.1	1637.2±100.6	0.4863
Folate	311.2±7.1	335.4±9.5	170.1±14.0	96.4±2.05	0.000*
Total Fat (g)	48.9±3.57	42.9±2.61	49.57±4.36	43.64±4.1	0.4667
Total Fat (%)	31.06±1.84	25.5±1.17	31.4±2.92	24.2±1.89	0.0037*
Saturated Fat (g)	21.48±2.22	21.32± 2.0	26.6±1.91	19.24 ±1.7	0.0748
Saturated fat (%)	13.8±1.56	12.6±1.08	16.9±1.41	11.3±1.58	0.0551
Monounsaturated fat (g)	33.6±1.46	14.2 ±0.41	36.02±1.61	26.41±2.98	0.0000*
Polyunsaturated Fat (g)	12.81±1.7	6.76±0.58	19.51±1.66	9.21±0.95	0.0000*
Polyunsaturated Fat (%)	8.14±0.96	5.3±0.74	12.4±1.34	4.05±0.31	0.0000*
Trans Fat (g)	0.58±0.1	0.54±0.08	0.55±0.08	0.53±0.11	0.9859

Group 3 showed a decrease in methylation levels after the intervention (Table 3). Regarding weight, hip circumference and BMI, no significant differences were obtained between the groups (data not shown). However, WC was 1.2 cm lower in group 3 than in the other groups, and waist-to-height ratio (WHtR) decreased by 7.92 cm/m.

Regarding the lipid profile, the values of cholesterol and triglycerides did not show significant differences between the intervention groups (data not shown). However, for the LDL-C values, a decrease of 54.34, 50.32 and 54.78 (mg/dL) was observed in groups 1, 2 and 3, respectively. For oxidative stress, group 2 presented an increase in TAC (P=0.018), and MDA increased in group 1 (P=0.034).

Table 3 Simple regression analysis of methylation levels, anthropometric measurements, lipid profile and oxidative stress for the different intervention groups.

Simple Regression				
Methylation Levels				
	Coefficient	95% CI	t statistics	P Value
Group 1	-0.13	-0.24±0.02	-2.37	0.023*
Group 2	-0.03	-0.14±0.07	-0.66	0.514
Group 3	-0.20	-0.31±0.09	-3.69	0.001*
Waist				
	Coefficient	95% CI	t statistics	P Value
Group 1	-3.8	-13.32±5.72	-0.81	0.424
Group 2	-1.6	-11.12±7.92	-0.34	0.735
Group 3	-1.2	-21.52±2.47	-2.55	0.015*
WHtR				
	Coefficient	95% CI	t statistics	P Value
Group 1	-1.77	-8.35±4.80	-0.55	0.580
Group 2	-0.65	-7.23±5.92	-0.20	0.841
Group 3	-7.92	-14.50±1.35	-2.44	0.020*
LDL				
	Coefficient	95% CI	t statistics	P Value
Group 1	-54.34	-90.78±17.9	-3.02	0.005*
Group 2	-50.32	-86.76±13.87	-2.80	0.008*
Group 3	-54.78	-91.22±18.33	-3.05	0.004*
HDL				
	Coefficient	95% CI	t statistics	P Value
Group 1	16.6	9.24±23.95	4.58	0.000 *
Group 2	6.5	-0.85±13.85	1.79	0.081
Group 3	6.9	-0.45±14.25	1.90	0.065
TAC				
	Coefficient	95% CI	t statistics	P Value
Group 1	0.07	-0.36±0.17	1.32	0.195
Group 2	0.13	0.02±0.23	2.48	0.018*
Group 3	0.03	-0.07±0.13	0.56	0.577
MDA				
	Coefficient	95% CI	t statistics	P Value
Group 1	0.75	0.06±1.43	2.21	0.034*
Group 2	0.43	-0.27±1.13	1.23	0.228
Group 3	0.31	-0.38±0.99	0.91	0.367

Table 4 shows that the folate intake was highest in group 1. For fat intake, group 1 had the greatest decrease in total fat intake, and group 3 had the highest intake of saturated, monounsaturated and polyunsaturated fats.

Table 4 Simple regression analysis of the regular intake of folate, total fat and fat fractions for the different intervention groups.

Simple Regression				
Folate				
	Coefficient	95% CI	t Statistics	P Value
Group 1	195.7	158.4±233.1	10.62	0.000*
Group 2	181.6	143.4±219.8	9.63	0.000*
Group 3	107.5	69.29±145.7	5.7	0.000*
Total Fat				
	Coefficient	95% CI	t Statistics	P Value
Group 1	-4.38	-9.87±1.10	-1.62	0.114
Group 2	-6.85	-12.46±-1.23	-2.47	0.018*
Group 3	-7.84	-13.45±-2.22	-2.83	0.008*
Saturated fat				
	Coefficient	95% CI	t Statistics	P Value
Group 1	2.24	-3.47±7.95	0.8	0.432
Group 2	2.08	-3.62±7.79	0.74	0.463
Group 3	7.4	1.68±13.11	2.63	0.013*
Monounsaturated Fat				
	Coefficient	95% CI	t Statistics	P Value
Group 1	7.19	1.85±12.52	2.73	0.010*
Group 2	-12.21	-17.54±-6.87	-4.64	0.000*
Group 3	9.61	4.27±14.94	3.65	0.001*
Polyunsaturated Fat				
	Coefficient	95% CI	t Statistics	P Value
Group 1	3.6	1.85±12.52	1.93	0.061
Group 2	-2.46	-17.54±-6.87	-1.32	0.195
Group 3	10.3	4.27±14.94	5.54	0.000*

Comparing the results by group before and after intervention showed that there was a significant statistical difference in the methylation levels between groups 2 and 3 and in TAC between groups 1 and 3.

Table 5. Analysis of methylation levels, waist, WHtR, lipid profile and oxidative stress, by group before and after intervention.

Variables	Group 1		Group 2		Group 3		Group 4	
	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After
Methylation levels (%)	41	25	55 ^a	34 ^a	35 ^b	18 ^b	42	38
Waist	0.95	0.92	0.97	0.95	0.9	0.84	0.96	0.96
WHtR	0.60	0.59	0.61	0.60	0.55	0.52	0.60	0.60
LDL-C	101.7	109.66	125.4	113.7	114.5	109.22	169	164
HDL-C	49.6	57.8	43	47.7	40.6	48.1	38.9	41.2
TAC (%)	35 ^c	53 ^c	41 ^d	59 ^d	46	49	40	46
MDA	3.45	4.2	3.14	3.87	3.03	3.76	3.23	3.45

^a Significant difference between before and after intervention; P=0.003; ^b Significant difference between before and after intervention; P=0.007; ^c Significant difference between before and after intervention; P=0.000; ^d Significant difference between before and after intervention; P=0.001.

Table 6 shows the results of the test that was performed to compare the post-intervention groups, and it was observed that group 2 and 3 obtained differences in methylation levels, that is, group 2 had a higher methylation level averages.

It was also observed that there were differences between groups 1 and 2 and group 1 and 3 for HDL-C values, that is, the group that consumed more folate and hazel, group 1, showed an improvement in HDL values.

Table 6. Comparison of post-intervention groups.

	Groupe 1 x 2	Groupe 1 x 3	Groupe 2 x 3
	p-value		
Methylation levels (%)	0.1558	0.2361	0.0016*
Waist	0.1671	0.3672	0.3205
WHtR	0.7752	0.0581	0.0551
LDL -C	0.7989	0.9826	0.8427
HDL -C	0.0187*	0.0158*	0.9217
TAC	0.1940	0.4943	0.1436
MDA	0.4283	0.2982	0.7242

*p < 0.005.

DISCUSSION

In the present study, the dietary intervention with various quantities of folate from vegetables that were close to (but lower than) the DRI, as well as with adequate amounts of monounsaturated fatty acids from the hazelnut oil capsule, did not cause a statistically significant weight loss in the total sample of overweight and obese women; the dietary intervention followed the guidelines for weight maintenance. The results also showed a reduction in the methylation levels of the *ADRB3*

gene and an increase in the HDL-C values, as well as a decrease in the MDA and an increase in TAC, with both of the latter values being used to evaluate oxidative stress.

The most relevant result was found in group 3 (folate: 90 µg/day + hazelnut oil capsule) after the intervention, when the methylation levels decreased (18.1%). According to Jacobsen [22], values below 25% are considered low levels of methylation.

For weight, the women in groups 1 and 3 had lower weight and lower methylation levels. The proteins encoded by *ADRB3* genes belong to the family of beta-adrenergic receptors, which mediate the catecholamine-induced activation of adenylate cyclase through the action of G proteins. These receptors are located in adipose tissue and are involved in energy homeostasis through the mediation of lipolysis and thermogenesis rate. Thus, the genes encoding these receptors are interesting candidates to partially explain the genetic predisposition for obesity in humans [23, 24].

For the dietary intake of folate, total fat and fat fractions evaluated for each intervention group, group 2 consumed a greater daily amount of folate. For fat, groups 1 and 3 consumed higher levels of monounsaturated and polyunsaturated fat, and this difference was statistically significant.

The women in group 3 also had greater decreases in WC, WHtR and LDL-C levels. According to Singh [25], BMI, WC and waist-to-hip ratio are considered methods to distinguish between global obesity (measured by BMI) and central adiposity (measured by WC and waist-to-hip ratio) because a study of the Chinese population demonstrated the impact of fat distribution (subcutaneous and visceral) [25], with *ADRB3* mainly being expressed in visceral adipose tissue [27].

Studies of the *ADRB3* gene are still scarce in the literature. Such studies show that this gene plays an important role in the regulating lipolysis in the brown and white adipose tissue of humans that provide free fatty acids for thermogenesis. Additionally, there is indirect evidence that *ADRB3* may participate in the regulation of body weight in humans [28], suggesting that epigenetic changes in the locus of the *ADRB3* gene may be involved in the development of obesity and its associated metabolic complications [27].

There is some evidence for epigenetic parameters related to metabolic diseases that support a relationship between genes and the environment. This type of relationship between genes and environment, epigenetics and metabolic disorders may influence the epigenome and may be one reason for the development of obesity [29-30].

Dietary factors have been reported to affect methylation levels, and some genes such as *MC4R* and *Leptin*, have already been reported to alter the methylation patterns that result from a high-fat diet [25]. In the present study, the women with the highest intake of monounsaturated fat were those in group 1 and 3; these women also had lower levels of methylation. In contrast, group 3

had the highest intake of polyunsaturated fat and the lowest level of methylation, suggesting that a diet rich in polyunsaturated fat would be more effective in altering the methylation patterns of genes such as *ADRB3*

Nutrients can modify physiological and pathological processes through the expression of altered genes, and epigenetic modifications are considered a key mechanism underlying the effects of nutrition on gene expression. Polyunsaturated fatty acids, such as omega-3, work by reducing body fat and improving pathological parameters [31]. Another beneficial effect of polyunsaturated fatty acids is their regulation of the synthesis and oxidation of fatty acids. That is, consuming the recommended levels of monounsaturated and polyunsaturated fatty acids is suggested also because doing so will lower the methylation levels of the *ADRB3* gene.

The lipid profile is associated with obesity and may be altered in individuals who are classified as overweight and obese. Guay reported that the *ADRB3* gene is associated with dyslipidemia [27]; dyslipidemia is characterized by increased blood levels of LDL-C and triglycerides and reduced levels of HDL-C [32]. Group 1 showed the highest increase in HDL-C levels, and groups 1 and 3 had the greatest decrease in LDL-C values. These values may be associated with lower levels of *ADRB3* gene methylation. The triglyceride and cholesterol values were not significantly different in the present study.

Group 2 presented the highest levels of methylation and lowest decrease in LDL-C, as well as the lowest increase in HDL-C and the lowest intake of monounsaturated and polyunsaturated fat, which are reported to improve the lipid profile and potentially prevent diet-induced dyslipidemia [32].

Biomarkers related to oxidative stress, such as MDA and TAC, have been rarely studied in terms of their association with the *ADRB3* gene in overweight and obese women. However, group 2 had the highest increase in TAC; this group had an intake (300 g) of vegetables similar to that of the other groups and greater consumption of folate (191 µg). Increased plasma TAC values are associated with higher regular intake of fruits, vegetables and nuts [33].

CONCLUSION

In conclusion, this study is the first to demonstrate the beneficial effect of the intake of hazelnut oil capsules on the methylation levels of the *ADRB3* gene; however, the group with the highest folate intake was the group with the highest levels of methylation. Group 3 had the lowest methylation levels, the largest reductions in WC, WHtR, LDL-C and total fat intake and the highest intake of monounsaturated and polyunsaturated fats. The data presented in this study show that the methylation levels were influenced by dietary factors, such as the intake of monounsaturated and

polyunsaturated fats, that contributed to the reduction in the methylation levels of the *ADRB3* gene. The results of this study may be used in the future for the prevention and management of obesity-related complications.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

The study was approved by the Research Ethics Committee of the CCS/UFPB, under the protocol number 0569/15, registered in clinical trials under NCT 02846025, and complied the declaration for human research. All subjects gave their written informed consent.

Consent for publication

Not applicable.

Availability of data and materials

The data generated in this study are coordinated by Dr. Maria José de Carvalho Costa.

Funding

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

Raquel Patrícia Ataíde Lima contributed to data management, statistical analysis, data interpretation and writing the manuscript. Rayner Anderson Ferreira Nascimento contributed to data acquisition and biochemical tests. Rafaella Cristine Pordeus Luna contributed to data management. Darlene Camati Persuhn and Naila Fancis Paulo de Oliveira coordinated the DNA methylation analyses and were involved in the critical review of the manuscript. Eliseu Verly Junior and Maria da Conceição Rodrigues Gonçalves contributed to the analysis of food consumption. Alexandre Sérgio da Silva contributed to the biochemical analyses. Patricia Oliveira Prada, Emmanuelle Fouilloux-Meugnier,

Hubert Vidal, Luciano Pirola and Marciane Magnani were involved in the development of the manuscript or in the critical review of relevant intellectual content. Alessio Tony Cavalcante Almeida and Ronei Marcos de Moraes contributed to the study design and statistical analysis. Maria José de Carvalho Costa contributed to the study design, statistical analysis, data interpretation and writing the manuscript; she coordinated data collection and was involved in the development of the manuscript or in the critical review of relevant intellectual content. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We would like to acknowledge the project coordinator, Prof. Dr. Maria José de Carvalho Costa, and her team composed of teachers, master's, doctoral and undergraduate students and research collaborators (Post-Graduation program in Nutritional Sciences/Federal University of Paraíba).

REFERENCES

- 1 – LOPOMO, A.; BURGIO, E.; MIGLIORE. Epigenetics of Obesity. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 2016; 140:151-184

- 2 – LOPEZ, K.N.; KNUDSON, J.D. Obesity: from the agricultural revolution to the contemporary pediatric epidemic. *Congenit Heart Dis*. 2012;7:189–199.

- 3 - NG, M.; FLEMING, T.; ROBINSON, M.; THOMSON, B.; GRAETZ, N.; MARGONO, C, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*, 2014; 384:766-781.

- 4 - KELLER, M.; HOPP, L.; LIU, X.; WOHLAND, T.; ROHDE, K.; CANCELO, R.; KLOS, M. et al. Genome-wide DNA promoter methylation and transcriptome analysis in human adipose tissue unravels novel candidate genes for obesity. *Molecular Metabolism*, 2017; 6: 86-100.

- 5 – BRETTFELD, C.; ENGLERT, S.; AUMUELLER, E.; HASLBERGER, A.G. Genetic and epigenetic interactions in adaptive thermogenesis pathways in association with obesity from a Public Health Genomics perspective. *Italian Journal of Public Health*. 2012; 9: 1-9.

- 6 – VAN DIJK, S.; TELLAM, R.L.; MORRISON, J.L.; MUHLHAUSLER, B.S.; MOLLOY, P.L. Recent developments on the role of epigenetics in obesity and metabolic disease. *Clinical Epigenetics*, 2015; 7: 1-10.

- 7 - SHEN, W.; WANG, C.; XIA, L.; FAN,C.; DONG, H.; DECKELBAUM, R.J.; QI, K. Epigenetic Modification of the Leptin Promoter in Diet-Induced Obese Mice and the Effects of N-3 Polyunsaturated Fatty Acids. *Scientific Reports*, 2014; 4: 1-12.

- 8 – FRADIN, D.; BOELLE, P.Y.; BELOT, M.P.; LACHAUX, F.; TOST, J.; BESSE, C.; DELEUZE, J.F.; FILIPPO, G.; BOUGNERES, P. Genome-Wide Methylation Analysis Identifies Specific Epigenetic Marks In Severely Obese Children. *Sci Rep*. 2017; 7: 1-10.

- 9 - MANOLIO ,T.A. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature*. 2009; 461:747–53.

- 10 – SWITZENY, O.J.; MÜLLNER, E.; WAGNER, K.H.; BRATH, H.; AUMÜLLER, E.; HASLBERGER, A.G. Vitamin and antioxidant rich diet increases MLH1 promoter DNA methylation in DMT2 subjects. *Clinical Epigenetics*, 2012; 4:1.

- 11 - AHA (American Heart Association): Dietary Guidelines for American. 2010. https://www.heart.org/idc/groups/heartpublic/@wcm/@adv/documents/downloadable/ucm_312853.pdf. Accessed on 01 de abril de 2016.

- 12 – COSTA, M.J.C. Nutrição clínica: uso do sistema de equivalentes na prática dietoterápica. 2nd ed. João Pessoa: Editora da UFPB; 2013.

- 13 - WHO (World Health Organization). Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. World Health Organization, 2000; 894: 11-253

- 14 – GRUNDY, S.M.; CLEEMAN, J.I.; DANIEL, S.S.R.; DONATO, K.A.; ECKEL, R.H.; FRANKLIN, B. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement: Executive Summary. *Crit Pathw Cardiol*, 2005; 4: 198-203

- 15 – ASCIUTTI, L.S.R. Manual de porções média em tamanho real baseado no programa dietsys para estudo de base populacional. João Pessoa: Editora da UFPB, 2005.

- 16 – LIMA, F.E.; LATORRE, M.D.O.; COSTA, M.J.; FISBERG, R.M. Diet and cancer in Northeast Brazil: evaluation of eating habits and food group consumption in relation to breast cancer. *Cad Saude Publica*, 2008; 24: 820-8.

- 17 - MSM. The Multiple Source Method. Departament of Epidemiology of the German Institute of Human Nutrition Potsdam. <https://msm.dife.de/tps/msm/>. Accessed on 17 de novembro de 2014.

- 18 - DE MEDEIROS CAVALCANTE, I.G.; SILVA, A.S.; COSTA, M.J.; PERSUHN, D.C; ISSA, C.T.; DE LUNA FREIRE, T;L. Effect of vitamin D3 supplementation and influence of BsmI polymorphism of the VDR gene of the inflammatory profile and oxidative stress in elderly women with vitamin D insufficiency: Vitamin D3 megadose reduces inflammatory markers. *Exp Gerontol*, 2015; 66: 10-6.

- 19 – KUO, K.; STILL, R.; CALE, S.; MCDOWELL, I. Standardization (External and Internal) of HPLC Assay for Plasma Homocysteine. *Clin Chem*, 1997; 43: 1653-1655.

- 20 – SIEGEL, S. *Estatística não paramétrica para as ciências do comportamento*. McGraw-Hill do Brasil: São Paulo, 1977.

- 21 - JACOBSEN, C.; BRØNS, J.; BORK-JENSEN ET AL. “Effects of short-term high-fat overfeeding on genome-wide DNA methylation in the skeletal muscle of healthy young men,” *Diabetologia*, 2012; 55: 3341–3349.

- 22 – CHOU, Y.C.; TSAI, C.N.; LEE, Y.S.; PEI, J.S. Associação de polimorfismos de genes receptores adrenérgicos com obesidade adolescente em Taiwan. *Pediatr Int*. 2012; 54: 111-116.

- 23 - LEONSKA – DUNIEC, A.; AHMETOV, I.I.; ZMIJEWSKI, P. Genetic variants influencing effectiveness of exercise training programmes in obesity – an overview of human studies. *Biologie Esporte*, 2016; 33: 207-214.
- 24 – DHASARATHY, A.; ROEMMICH, J.N.; CLAYCOMBE, K.J. Influence of maternal obesity, diet and exercise on epigenetic regulation of adipocytes. *Molecular Aspects of medicine*, 2017; 54: 37-49, 2017.
- 25 - DUNN, G.A.; BALE, T.L. Maternal high – fat effects on third – generation female body size via the paternla lineage. *Endocrinology*, 2011; 152: 2228 – 2236.
- 26 - GUAY, S.P.; BRISSON, D.; LAMARCHE, B.; BIRON, S.; LESCELLEUR, O.; BIERTHO, L.; MARCEAU, S.; VOHL, M.C.; GAUDET, B.; BOUCHARD, L. ADRB3 gene promoter DNA nethylation in blood and visceral adipose tissue is associated with metabolic disturbances in men. *Epigenomics*, 2014; 6:33 – 43.
- 27- KURYLOWICZ, A.; JONAS, M.; LISIK, W.; JONAS, M.; WICIK, Z.A.; WIERZBICKI, Z.; CHMURA, A.; PUZIANOWSKA-KUZNICKA, M. Obesity is associated with a decrease in expression but not with the hypermethylation of thermogenesis – related genes in adipose tissues. *Journal of Translational Medicine*, 2015; 13:1-10.
- 28 - D'ANGELO, C.S.; KOFFMANN, C.P. Copy number variants in obesity-related syndromes: review and perspectives on novel molecular approches. *Journal Obesity*, 2012; 212: 1-10.
- 29 - FALL, T. INGELSSON, E. Genome – wide association studies of obesity and metabolic syndrome. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2014; 382:740-757.
- 30 - WELLS, J.C. The evolutions of human fatness and susceptibility to obesity: an ethological approach. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 2014; 81:183 – 205.
- 31 - CHING - YANG, T.; CHEN, Y.J.; CHANG, S.; CHEN, C.; CHANG, P.; SHAO – CHUN LU. Malondialdehyde mediates oxidized LDL – induced coronary toxicity through the Akt – FGF2 pathway via DNA methylation. *Journal of Biomedical Science*, 2014; 21: 1-11.

32 – FERRARI, C.K.B. Capacidade antioxidante total (CAT) em estudos clínicos, experimentais e nutricionais. Journal of the Health Sciences Institute, 2010; 28: 307-310.

OUTROS RESULTADOS

Tabela 1. Característica Geral da amostra.

Parameter	Before Intervention		After intervention		P Value
	Mean	SD	Mean	SD	
Idade	44.1	10.7	44.1	10.7	-
Altura	1.59	0.05	1.59	0.05	-
Peso	77.41	12.74	75.02	12.70	-
IMC	30.42	4.80	29.48	4.76	-
Leptina (%)	50.5	16.21	34.82	13.43	0.0000*
POMC (%)	22.51	10.25	19.77	8.71	0.2012
CAT	0.40	0.13	0.51	0.12	-
MDA	3.21	0.91	3.82	0.77	-

Tabela 2. Análises dos grupos pós intervenção.

	Group 1		Group 2		Group 3		Group 4	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
<i>Lep</i>	51.6	11.90	46.6	17.82	49.6	18.5	54.2	17.37
<i>POMC</i>	20	8.20	24	9.33	20.25	13.7	25	11.06
Idade	52.3	5.83	42.4	9.84	44.3	12.8	37.6	9.44
Altura	1.582	0.04	1.58	0.64	1.61	0.6	1.6	0.06
Peso	73.47	9.45	83.32	20.9	76.63	7.0	76.25	8.41
IMC	29.38	3.92	32.9	7.35	29.5	2.8	29.93	3.6
CAT	.356	0.1	0.41	0.09	0.46	0.19	0.4	0.12
MDA	3.45	1.10	3.14	0.9	3.03	1.01	3.23	0.66

Tabela 3. Teste de Diferença entre os valores, pós intervenção de Metilação do DNA dos genes *Lep* e *POMC* com o perfil antropométrico das mulheres com sobrepeso e obesidade.

	Leptina (%)	Peso	Valor de P
Média	34.8	75.0	0.0000*
	POMC (%)	Peso	
Média	34.0	75.0	0.0000*
	Leptina (%)	RCA	Valor de P
Média	34.8	0.57	0.0000*
	POMC (%)	RCA	
Média	34.0	0.57	0.0000*
	Leptina (%)	IMC	Valor de P
Média	34.8	0.57	0.0000*
	POMC (%)	IMC	
Média	34.0	0.57	0.0000*

Tabela. Regressão simples.

Simple Regression				
Methylation Levels – Gene <i>Lep</i>				
	Coefficient	95% CI	t statistics	P Value
Group 1	-0.13	-0.24±0.02	-2.37	0.023*
Group 2	-0.03	-0.14±0.07	-0.66	0.514
Group 3	-0.20	-0.31±0.09	-3.69	0.001*
Waist				
	Coefficient	95% CI	t statistics	P Value
Group 1	-3.8	-13.32±5.72	-0.81	0.424
Group 2	-1.6	-11.12±7.92	-0.34	0.735
Group 3	-1.2	-21.52±2.47	-2.55	0.015*
WHtR				
	Coefficient	95% CI	t statistics	P Value
Group 1	-1.77	-8.35±4.80	-0.55	0.580
Group 2	-0.65	-7.23±5.92	-0.20	0.841
Group 3	-7.92	-14.50±1.35	-2.44	0.020*
LDL				
	Coefficient	95% CI	t statistics	P Value
Group 1	-54.34	-90.78±17.9	-3.02	0.005*
Group 2	-50.32	-86.76±13.87	-2.80	0.008*
Group 3	-54.78	-91.22±18.33	-3.05	0.004*
HDL				
	Coefficient	95% CI	t statistics	P Value
Group 1	16.6	9.24±23.95	4.58	0.000 *
Group 2	6.5	-0.85±13.85	1.79	0.081
Group 3	6.9	-0.45±14.25	1.90	0.065
TAC				
	Coefficient	95% CI	t statistics	P Value
Group 1	0.07	-0.36±0.17	1.32	0.195
Group 2	0.13	0.02±0.23	2.48	0.018*
Group 3	0.03	-0.07±0.13	0.56	0.577
MDA				
	Coefficient	95% CI	t statistics	P Value
Group 1	0.75	0.06±1.43	2.21	0.034*
Group 2	0.43	-0.27±1.13	1.23	0.228
Group 3	0.31	-0.38±0.99	0.91	0.367

ARTIGO 3**THE ROLE OF EPIGENETICS IN THE ETIOLOGY OF OBESITY: A REVIEW**

TITULO DA REVISTA: Journal of Clinical Epigenetics

ÁREA: MEDICINA II

QUALIS: A1

ISSN: 2472 - 1158

FATOR DE IMPACTO: 2,9

Raquel Patrícia Ataíde Lima^{1*}, Daisuke Hayashi Neto², Keylha Querino de Farias Lima³, Nadjenny Ingrid Galdino Gomes³, Marina Ramalho Ribeiro³, Patrícia Oliveira Prada⁴, Maria José de Carvalho Costa⁵

¹ PhD in Nutritional Science, Health Sciences Center (Centro de Ciências da Saúde - CCS), Federal University of Paraíba (Universidade Federal da Paraíba), Brazil. raquelpatriciaal@hotmail.com

² Undergraduate Program in Nutrition, School of Applied Sciences (Faculdade de Ciências Aplicadas - FCA), State University of Campinas (Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP), Brazil. dai-hayashi@hotmail.com

³ Graduate Program in Nutritional Sciences, CCS, Federal University of Paraíba, Brazil. rafaellacristhine@yahoo.com.br

⁴ PhD Professor in the Graduate Program in Nutrition, Sports and metabolism science - CNEM, School of Applied Sciences (Faculdade de Ciências Aplicadas - FCA), State University of Campinas (Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP), Brazil. pprada.fca@gmail.com

⁵ PhD Professor of the Graduate Program in Nutritional Sciences, CCS, Federal University of Paraíba, Brazil. mjcosta@terra.com.br

* Current address: Pós-graduação em Ciências da Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, NIESN – Núcleo Interdisciplinar de Estudos em Saúde e Nutrição/ Universidade Federal da Paraíba, Castelo Branco, João Pessoa, PB 58059-900, Brazil

Corresponding author:

E-mail: raquelpatriciaal@hotmail.com

Abstract

Obesity is highly prevalent in developed countries and contributes to a substantial burden of morbidity and mortality. Increased adiposity is often accompanied by comorbidities such as insulin resistance, type 2 diabetes, hypercholesterolemia, cardiovascular disease, fatty liver disease, low-grade inflammation, immune disorders, endocrine complications, and sleep apnea, which may require specific dietary and pharmacological interventions. The current obesity epidemic requires a better understanding of the underlying mechanisms through which genetic and epigenetic factors interact to determine metabolic characteristics. Epigenetic studies are dynamic; tags with reversible potential can be influenced by genetics and environment attributing phenotypic variations. There are large knowledge gaps regarding how human epigenetic changes are related to obesity and its consequences. Therefore, the present study elucidates the role of epigenetics in the etiology of obesity. Recent studies suggest that the epigenetic regulation of gene expression (DNA methylation and histone modifications) could be a major contributor to the variation of susceptibility to diseases such as obesity. The identification of genes that determine obesity susceptibility can provide information on the pathophysiological mechanisms underlying body weight regulation, food intake control and fat distribution, which in turn can lead to new approaches to treatment and prevention of obesity.

1. INTRODUCTION

Obesity is highly prevalent in developed countries and contributes to a substantial burden of morbidity and mortality [1]. It is a complex multifactorial disease, which makes a better understanding of the mechanisms underlying the interactions between lifestyle, environment, and genetics necessary for the development of effective prevention and treatment strategies [2].

The quality of the macronutrients and their content in foods consumed, as well as the sedentary lifestyle, affects the energy balance equation, which can potentially lead to the unhealthy accumulation of fat and obesity [3,4]. Increased adiposity is often accompanied by comorbidities, such as insulin resistance, type 2 diabetes, hypercholesterolemia, cardiovascular disease, fatty liver disease, low grade inflammation, immune disorders, endocrine complications and sleep apnea, all of which may require specific dietary and pharmacological interventions [3]. The treatment of obesity is currently based on calorie-restriction diets to reduce the consumption of high energy foods (mainly the ones rich in fat and sugar), as well as recommending a greater intake of fiber and protein to induce satiety, which can be complemented by physical activity or behavioral programs and additional programs to induce weight loss [5].

In a society where foods with high energy density are abundant and physical-activity levels are low, there is a great variation in the vulnerability of individuals to developing obesity and metabolic health problems [6]. Studies estimate the heritability of the body mass index (BMI) of 40% to 70% in children and adults, as well as of other anthropometric measures of obesity and body fat distribution [waist circumference and waist: hip ratio (WHR)] show similar heritability [7]. However, a large portion of heredity remains unexplained [8].

Factors such as changes in gut microbiota, infections, epigenetic marks, perinatal nutrition, postponement of maternal age, superior fecundity among overweight women, associative mating within obese people, sleep problems, endocrine and inflammatory disorders, pharmacological side effects, variability of temperature variability environment, availability of environmental oxygen, and

intrauterine effects have all been considered as contributors to the increasing obesity rates worldwide [9].

The obesity epidemic requires a better understanding of the mechanisms through which genetic and epigenetic factors interact to determine metabolic characteristics of individuals. Epigenetic studies are dynamic. Marks with the potential for reversibility may be influenced by genetics and the environment, attributing phenotypic variations in individuals [10].

There are large knowledge gaps about how human epigenetic changes relate to obesity and its consequences [1]. Therefore, the present study elucidates some of the role of epigenetics in the etiology of obesity.

2. Epigenetic Mechanisms

Epigenetic changes during embryonic development are a result of "causal interactions between genes and their products that contribute to changes in the phenotype". The epigenome acts as a bridge between genetics and the environment, and the epigenetic code modifies gene expression to determine the final phenotype without changing DNA sequences. Epigenetic changes may alter the disease phenomenon, directly affecting the target gene, as a response to environmental cues and pathological states, such as diet, exercise, toxins, oxidative stress, inflammation and metabolic alterations [11].

Epigenetic changes have an important effect on embryo formation and development, X chromosome inactivation, genomic imprinting, cell identity and differentiation, stable inheritance of gene expression, immune cell function, as well as stem cell and cellular plasticity. Histone modifications and DNA methylation, along with non-coding RNAs, are collectively known as epigenetic marks that contain the necessary epigenetic information for the stable inheritance of gene expression prototypes in differentiated cells [11,12].

The main epigenetic mechanisms in mammalian cells are carbon methylation of cytosine residues in the CpG dinucleotide; covalent modifications of histones, such as methylation, acetylation, phosphorylation, and ubiquitination; and the production of non-coding RNAs (microRNAs) [13].

Among the epigenetic mechanisms, DNA methylation is the most well-known epigenetic mark [1, 14-15] because its assays and interpretations are easier than changes in histone modifications [16] and generally occurs in cytosine-phosphate-guanine dinucleotides (CpG), where one of the numerous specific methyltransferase enzymes adds a methyl group to the cytosine at the 5' carbon of a CpG dinucleotide. Also, DNA methylation is potentially hereditary [15, 17-19].

Methylation can affect gene expression and chromosomal stability and potentially influence the health and disease phenotype. Epigenetic profiles are influenced by genetics [20], aging and environmental factors, including diet, chemicals products and smoking habit [21].

DNA Methylation occurs with the covalent transfer of a methyl group from S-adenosyl-L-methionine to cytosines in CpG dinucleotides [16]. These CpG dinucleotides can be grouped into regions known as CpG islands. In general terms, hypermethylation of CpG within the gene promoters is associated with inactivation of transcription, causing stable silencing of gene expression while the unmethylated (hypomethylated) promoters are potentially transcriptionally active [12, 18-19, 22].

3. Epigenetics in the etiology of obesity

Recent studies suggest that the epigenetic regulation of gene expression (DNA methylation and histone modifications) could be a major contributor to the variation in the susceptibility to diseases such as obesity [23-24].

Human obesity usually arises from the combined effects of interactions between multiple genes, environmental and behavioral factors. Such complex etiology makes management and prevention of human obesity especially challenging. Unveiling the whole genetic basis of obesity has

been proven to be an arduous task [25]. Genetic epidemiological methods aiming for the discovery of complex traits such as those associated with obesity can be divided into two broad classes: hypothesis-based approaches (candidate gene or biological pathway) and non-hypothesized approaches (genome-wide link and genomic association - GWAS) , these analyzes in GWAS are responsible for evaluating the association of millions of genetic variants without a previous hypothesis [26].

The identification of genes that determine obesity susceptibility can provide information on the pathophysiological mechanisms underlying body weight regulation, food intake control and fat distribution, which in turn can lead to new approaches to treatment and prevention [27].

These studies still have much to uncover, but the results available so far have shown promise to help explain the variation in susceptibility to obesity. There is growing evidence that a below-ideal exposure to certain nutrients during fetal or early childhood periods is associated with an increased risk of obesity and metabolic diseases in adulthood [28]. Initially, animal studies demonstrated that a range of early-onset exposure to certain nutrient levels, especially during the early gestational experience, could induce epigenetic changes in the metabolic tissues of the offspring that persisted after birth and resulted in permanent alterations to the function of genes [29].

Evidences of the role played by epigenetics in obesity comes mainly from animal models [30] and fewer come from human studies. For example, children born to women who experienced chronic hunger in the first half of pregnancy during the Dutch famine were at a significantly greater risk of developing obesity than comparable subjects; This was later related to epigenetic modifications. This intergenerational study suggests that nutritional deprivation of pregnant women may have lasting non-genetic effects on next generation body weight.

An individual epigenetic pattern is established early during gestation and is subject to transformations through environmental factors throughout life, with epigenetic mechanisms being very important in the development and transgenerational transmission of chronic noncommunicable diseases (NCDs), including obesity [32].

Still regarding the maternal stage and its relation to obesity, the exposure in this period to several chemical substances with obesogenic effects that have been associated to the increase in the BMI of the offspring, which indicates that the obesity is programmed prenatally or early in the childhood, and that a disruption of normal epigenetic regulation alters the expression of key genes, thus probably being involved in adipogenic pathways [33].

Research on monogenic obesity has revealed the biology of obesity in the general population. Molecular mapping of mutations that cause monogenic obesity in mice was one of the first strategies to investigate genes that control body weight. Prominent results obtained from this approach include genes encoding leptin (LEP) and its receptor (LEPR), melanocortin 4 receptor (MC4R) and pro-opiomelanocortin (POMC), among others; These genes affect body weight through pathways in the central nervous system [34].

Large-scale, genome-wide association studies (GWAS) identified > 300 genetic loci for obesity traits. The first major success of GWAS was the discovery of the locus F7978,79. A set of non-coding variants common in the fat mass and obesity-associated gene region (FTO) showed a highly significant association with the risk of obesity [35]. Two other large-scale epigenetic studies, involving 10,000 and 7,800 individuals, respectively, identified a large number of DNA methylation loci associated with BMI, 187 in the first and 83 in the second study [36].

The biology that underlies this association is slowly being resolved. The FTO locus can regulate the expression of proximal RPGRIP1L or distant IRX3-IRX5 to influence body weight, regulating appetite, thermogenesis, adiposity, and obesity-related epigenetic mechanisms [37]. Additional GWAS identified genetic loci are also associated with traits of adiposity, BMI and waist-hip ratio [38,39].

One relevant modulating factor of this epigenetic profile is the environmental influence on the epigenetic marks that can lead to obesity, which remains rather rudimentary. For example, the FTO gene codes for an enzyme that is capable of removing methyl groups from DNA [33] and a

long-term exposure to the high-fat diet may decrease methylation of the melanocortin-4 receptor gene (MC4R) [40].

Obesity induced by a high-fat diet can modify the methylation patterns of leptin (Milagro et al., 2009). Expression of the PPAR γ gene, a key regulator of adipocyte differentiation, has been reduced due to the methylation of the DNA of its promoter in adipocytes of visceral adipose tissue in mammals [40].

In one study it was observed that methylation of the regulatory DNA of the essential fatty acid binding protein in lipid metabolism was also associated with traces of the metabolic syndrome in 517 individuals in more than 40 families [41]). In addition, methylation patterns of three clock genes of circadian rhythm participation (CLOCK, BMAL1 e PER2) were found to be associated with anthropometric traits such as BMI and adiposity [42], further narrowing the relationship between DNA methylation and obesity.

In a study carried out by Lima et al. [43] it was evidenced that methylation levels were influenced by dietary factors, such as the consumption of monounsaturated and polyunsaturated fat that contributed to the reduction of methylation levels of the ADRB3 gene. Results of this research may be used in the future in the prevention and management of complications of obesity, since the ADRB3 gene was related to obesity.

Several other genes involved in adiposity have promoters that appear to be epigenetic targets for obesity (epi-obesogenic genes). One of the first genome-wide methylation studies revealed increased methylation levels at one CpG site (UBASH3A gene) and reduced methylation levels at one CpG site (TRIM3 gene) in obese individuals compared to controls, providing evidence that obesity is associated with epigenetic changes [44]. Although collectively, such studies could indicate that epigenetic changes are associated with obesity, it is not really clear whether they predict or precede obesity [45].

Since obesity arises from combined effects between genes, environment and behavior, the study of epigenetics becomes necessary to identify genes that can determine the susceptibility of

individuals to obesity by providing pathophysiological mechanisms for weight regulation, food intake control and fat distribution. Therefore, the advancement of the field of epigenetics can raise the awareness about the several modifiable factors that play a role in the genesis of obesity, thus promoting the development of better public policies with the addition of action plans and guidelines to improve the strategies for prevention and treatment of obesity.

Declarations

Acknowledgements

We thank all the authors and collaborators for contributing with this publication

Funding

Not applicable.

Availability of data and materials

Not applicable.

Authors' contributions

All authors were responsible for the draft of the work or critical revision for important intellectual content. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

REFERENCES

1. MENDELSON, M.M.; MARIONI, R.E.; JOEHANES, R. et al.; Association of Body Mass Index with DNA Methylation and Gene Expression in Blood Cells and Relations to Cardiometabolic Disease: A Mendelian Randomization Approach, Plos Medicine, doi: 10.1371/journal.pmed.1002215, 2017.
2. WHO - World Health Organization. **Obesity and overweight. Media Cent. Fact sheet N 311** (2013). Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>, acessado em abril 2014.
3. BENJAMIN, E.J.; BLAHA, M.J.; CHIUVE, S.E. et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2017 Update A Report From the American Heart Association, Circulation, v.135,n10,2017.
4. JOHNSON AA, AKMAN K, CALIMPORT SR, WUTTKE D, STOLZING A, DE MAGALHAES JP. The role of DNA methylation in aging, rejuvenation, and age-related disease. Rejuvenation Res.,15(5):483–494. doi: 10.1089/rej.2012.1324,2012.
5. PERUMPAIL, B.J.; CHOLANKERIL, R.; YOO, E.R. et al. An Overview of Dietary Interventions and Strategies to Optimize the Management of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, Diseases, v.5,n.4,2017.
6. BAKER, K.; LOUGHMAN, A.; SPENCER, S.J.; REICHEL, A.C. The impact of obesity and hypercaloric diet consumption on anxiety and emotional behavior across the lifespan, Neuroscience & Biobehavioral Reviews, v.83, p.173-182,2017.

7. BARCZYK, A.; KUTKOWSKA-KAŻMIERCZAK, A.; CASTANEDA, J.; OBERSZTYN, E. The genetics of obesity- pathogenetic, clinical and diagnostic aspects. **Developmental Period Medicine**, v. 21, n. 3, p. 186 – 202, 2017.
8. LOCKE, A.E.; KAHALI, B.; BERNDT, S.I.; JUSTICE, A.E.; PERS, T.H.; DAY, F.R. Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. **Nature**, v. 518, p. 197–206, 2015.
9. SOLAS, M.; MILAGRO, F.I.; URBISTONDO, D.M.; RAMIREZ, M.J.; MARTINEZ, J.A. Precision Obesity Treatments Including Pharmacogenetic and Nutrigenetic Approaches. *CellPress*, v.37,n.7,p. 575-593,2016.
10. CASTILLO – FERNANDEZ, J.E.; SPECTOR, T.D.; BELL, J.T. Epigenetics of discordant monozygotic twins: implications for disease, *Genome Medicine*, v.6,n.7, 2014.
11. SUN, J.; WANG, Y.; CUI, W.; LOU, Y.; SUN, G.; ZHANG, D.; MIAO, L. Role of Epigenetic histone modifications in diabetic kidney disease involving renal fibrosis. **Journal of Diabetes Research**, p.1 – 11, 2017.
12. LOPOMO, A.; BURGIO, E.; MIGLIORE. Epigenetics of obesity. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v.140, p.151-184, 2016.
13. FOMA, A. M.; ASLANI, S.; KARAMI, J.; JAMSHIDI A.; MAHMOUDI, M. Epigenetic involvement in etiopathogenesis and implications in treatment of systemic lupus erythematosus. **Inflammation Research**, v.66,n.12,p. 1057- 1063, 2017.
14. RELTON, C. L.; DAVEY, S. G. Epigenetic epidemiology of common complex disease: prospects for prediction, prevention, and treatment. **Plos Medicine**, v. 7, n. 10, 2010.
15. SCHUBELER, D. Function and information content of DNA methylation. **Nature**, v. 517, n.7534, p. 321-326, 2015.

16. CRIDER, K. S.; YANG, T. P.; BERRY, R. J.; BAILEY, L. B. Folate and DNA methylation: A review of molecular mechanisms and the evidence for folate's role. **Advances Nutrition**, v. 3, n.1, p. 21-38, 2012.
17. AFMAN, L. A.; MULLER, M. Human nutrigenomics of gene regulation by dietary fatty acids. **Progress in Lipid Research**, v.51, p.63–70, 2012.
18. LILLYCROP, K. A.; HOILE, S. P.; GRENFELL, L; BURDGE, G. C. DNA methylation, ageing and the influence of early life nutrition. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 73, n. 3, p. 413-421, 2014.
19. VEL SZIC, K. S.; DECLERCK, K.; VIDAKOVI, M.; BERGHE, W. V. From inflammaging to healthy aging by dietary lifestyle choices: is epigenetics the key to personalized nutrition?. **Clinical Epigenetics**, v. 7, p.33, 2015.
20. MCKAY, J. A.; GROOM, A.; POTTER, C. Genetic and non- genetic influences during pregnancy on infant global and site-specific DNA methylation: role for folate gene variants and vitamin B (12). **PLoS One**, v.7,n.3, p. 1-9, 2012.
21. CHRISTENSEN, B. C.; HOUSEMAN, E. A.; MARSIT, C. J. Aging and environmental exposures alter tissue-specific DNA methylation dependent upon CpG island context. **PLoS Genetics**, v.5, n.8, p.1-13, 2009.
22. SPROUL, D.; MEEHAN, R. R. Genomic insights into cancer-associated aberrant CpG island hypermethylation. **Briefings in Functional Genomics**, v.12, n.3, p.174-190, 2013
23. MACARTNEY-COXSON, D.; BENTON, M. C.; BLICK, R.; STUBBS, R. S.; HAGAN, R. D.; LANGSTON, M. A. Genome-wide DNA methylation analysis reveals loci that distinguish different types of adipose tissue in obese individuals. **Clinical Epigenetics**, v. 9, n. 48, 2017.
24. SCHWENK, R. W.; JONAS, W.; ERNST, S. B.; KAMMEL, A.; JÄHNERT, M.; SCHÜRMANN, A. Differences in Promoter Methylation accompany diet-dependent Alterations of Hepatic Scd1 Expression. **Hormone and Metabolic Research**, v. 45, p. 786– 794, 2013.

25. CHEUNG, W.W.; MAO,P. Recent Advances in Obesity: Genetics and Beyond, Endocrinology, doi: 10.5402/2012/536905, 2012.
26. RAO, R.; NIRUPAMA, L. A. L.; GIRIDHARAN, N. V. Genetic & epigenetic approach to human obesity K. **Indian Journal of Medical Research**, v.140, n.5, p.589–603, 2014.
27. GONZÁLEZ-MUNIESA, P.; MÁRTINEZ-GONZÁLEZ, M. A.; HU, F. B.; DESPRÉS, J. P.; MATSUZAWA, Y.; LOOS, R. J. F.; MORENO, L. A.; 3 BRAY, G. A.; MARTINEZ, J. A. Obesity. **Nature Reviews**, n.3, p. 1-18, 2017.
28. VAN DIJK, S.; TELLAM, R.L.; MORRISON, J.L.; MUHLHAUSLER, B.S.; MOLLOY, P.L. Recent developments on the role of epigenetics in obesity and metabolic disease. *Clinical Epigenetics*, v. 7, n. 66,2015.
29. BOURET, S.; LEVIN, B.E.; OZANNE,S..E. Gene-Environment Interactions Controlling Energy and Glucose Homeostasis and the Developmental Origins of Obesity . *Physiology Reviews*, doi: [10.1152/physrev.00007.2014](https://doi.org/10.1152/physrev.00007.2014), 2015.
30. LOCHE, E.; OZANNE, S. E. Early nutrition, epigenetics, and cardiovascular disease. **Current Opinion in Lipidology**, v 27, p. 449–458, 2016.
31. HEIJMANS, B. T.; TOBI, E. W.; STEIN, A. D.; PUTTER, H.; BLAUW, G. J.; SUSSER, E. S.; SLAGBOOM, E.; LUMEY, L. H. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans.**Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, p.17046–17049, 2008.
32. CHOI, K. M.; LEE, Y. S.; SIN, D. M.; LEE, S.; LEE, M. K.; LEE, Y. M.; HONG, J. T.; YUN, Y. P.; YOO, H. S. Sulforaphane inhibits mitotic clonal expansion during adipogenesis through cell cycle arrest. **Obesity** (Silver Spring), v.20,p.1365–1371, 2013.
33. JANESICK, A.; BLUMBERG, B. Obesogens, stem cells and the developmental programming of obesity. **International Journal of Andrology**, v.35, n.3, p.437-448, 2012.
34. LEVIAN, C.; RUIZ, E.; YANG, X. The pathogenesis of obesity from a genomic and systems biology perspective. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 87, n.2, p.113-126, 2014.

35. FRAYLING, T. M.; TIMPSON, N. J.; WEEDON, M. N. et al. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. **Science**, v. 316, p. 889–894, 2007.
36. DO, C.; SHEARER, A.; SUZUKI, M.; TERRY, M. B.; GELERNTER, J.; GREALLY, J. M.; TYCO, B. Genetic–epigenetic interactions in cis: a major focus in the post-GWAS era. **Genome Biology**, v.18, n.120, p. 1-10, 2017.
37. MILAGRO, F. I.; MORENO-ALIAGA, M. J.; MARTINEZ, J. A. FTO obesity variant and adipocyte browning in humans. **The New England Journal of Medicine**, v. 374, p. 190–191, 2016.
38. LOCKE, A. E.; KAHALI, B.; BERNDT, S. I.; JUSTICE, A. E.; PERS, T. H.; DAY, F. R. Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. **Nature**, v. 518, p. 197–206, 2015.
39. WINKLER, T. W. The influence of age and sex on genetic associations with adult body size and shape: a large-scale genome-wide interaction study. **PLoS Genetics**, v. 11, p.1-42, 2015.
40. WIDIKER, S.; KARST, S.; WAGENER, A.; BROCKMANN, G. A. High-fat diet leads to a decreased methylation of the Mc4r gene in the obese BFMI and the lean B6 mouse lines. **Journal of Applied Genetics**, v. 51, p.93–197, 2010.
41. ZHANG, Y.; KENT, J.W.; LEE, A. et al. Fatty acid binding protein 3 (*fabp3*) is associated with insulin, lipids and cardiovascular phenotypes of the metabolic syndrome through epigenetic modifications in a northern european family population, *BMC Medical Genomics*, v.6,n.9,2013.
42. MILAGRO, F. I.; GÓMEZ-ABELLÁN, P.; CAMPIÓN, J. CLOCK, PER2 and BMAL1 DNA methylation: association with obesity and metabolic syndrome characteristics and monounsaturated fat intake. **Chronobiology International Journal**, v. 29, p.1–15, 2012.
43. LIMA RPA, Nascimento RAF, Luna RCP, et al. Effect of a diet containing folate and hazelnut oil capsule on the methylation level of the ADRB3 gene, lipid profile and oxidative stress in overweight or obese women. *Clin Epigenetics*, doi: 10.1186/s13148-017-0407-6, 2017

44. WANG, Y.; LUK, A. O. Independent predictive roles of eotaxin Ala23Thr, paraoxonase 2 Ser311Cys and beta-adrenergic receptor Trp64Arg polymorphisms on cardiac disease in Type 2 Diabetes—an 8-year prospective cohort analysis of 1297 patients. **Diabetic Medicine**, v.27, p. 376-383, 2010.
45. FRANKS, P. W.; LING, C. Epigenetics and obesity: the devil is in the details. **BMC Medicine**, v.21, n.8, p.8-88, 2010.