

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

YOHANNA DE OLIVEIRA

**PERFIL DE METILAÇÃO DO DNA NO GENE *ADRB3* EM INDIVÍDUOS ADULTOS
POR ÍNDICE DE MASSA CORPORAL E RELAÇÃO COM PERFIL LIPÍDICO,
ESTRESSE OXIDATIVO E CONSUMO ALIMENTAR: UM ESTUDO DE BASE
POPULACIONAL**

João Pessoa

2018

YOHANNA DE OLIVEIRA

**PERFIL DE METILAÇÃO DO DNA NO GENE *ADRB3* EM INDIVÍDUOS ADULTOS
POR ÍNDICE DE MASSA CORPORAL E RELAÇÃO COM PERFIL LIPÍDICO,
ESTRESSE OXIDATIVO E CONSUMO ALIMENTAR: UM ESTUDO DE BASE
POPULACIONAL**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Nutrição.

Linha de pesquisa: Clínica e Epidemiologia Aplicada à Nutrição.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria da Conceição Rodrigues Gonçalves

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria José de Carvalho Costa

João Pessoa

2018

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

048p Oliveira, Yohanna de.

Perfil de metilação do DNA no gene ADRB3 em indivíduos adultos por índice de massa corporal e relação com perfil lipídico, estresse oxidativo e consumo alimentar: um estudo de base populacional / Yohanna de Oliveira. - João Pessoa, 2018.
93 f. : il.

Orientação: Maria da Conceição Rodrigues Gonçalves.
Coorientação: Maria José de Carvalho Costa.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Nutrição. 2. Metilação do DNA - Gene ADRB3. 3. Obesidade - Adultos. 4. Estresse oxidativo. I. Gonçalves, Maria da Conceição Rodrigues. II. Costa, Maria José de Carvalho. III. Título.

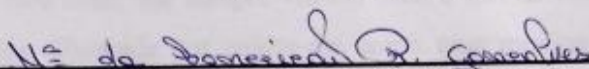
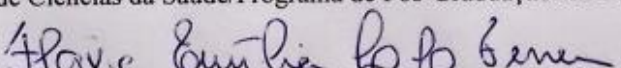
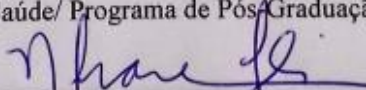
UFPB/BC

YOHANNA DE OLIVEIRA

PERFIL DE METILAÇÃO DO DNA NO GENE *ADRB3* EM INDIVÍDUOS ADULTOS POR ÍNDICE DE MASSA CORPORAL E RELAÇÃO COM PERFIL LIPÍDICO, ESTRESSE OXIDATIVO E CONSUMO ALIMENTAR: UM ESTUDO DE BASE POPULACIONAL

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Nutrição.

APROVADA em 22/02/2018.

BANCA EXAMINADORA
 Prof. ^a Dr. ^a Maria da Conceição Rodrigues Gonçalves Orientadora titular (UFPB/ Centro de Ciências da Saúde/ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição)
Prof. ^a Dr. ^a Maria José de Carvalho Costa Co-orientadora (UFPB/ Centro de Ciências da Saúde/ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição)
 Prof. ^a Dr. ^a Flávia Emília Leite de Lima Ferreira Membro interno – Titular (UFPB/ Centro de Ciências da Saúde/ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição)
Prof. Dr. José Luiz de Brito Alves Membro interno – Suplente (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/ Departamento de Biologia Molecular)
Prof. Dr. Alcides da Silva Diniz Membro externo – Suplente (UFPE/ Centro de Ciências da Saúde/ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição)

João Pessoa
2018

AGRADECIMENTOS

A *Deus* por tudo que me concede em minha jornada, por iluminar todo o meu percurso e me guiar sempre no caminho da verdade, da luz e da justiça. Por ser minha fortaleza em qualquer lugar. Por me fazer companhia nos livros, nos desenhos, nas partituras, na poesia, na serenidade e na coragem.

À minha mãe, dedico minha atenção, o meu zelo, a minha sensibilidade, o meu amor e a minha gratidão. Agradeço pela delicadeza e pela educação. E o que antes eu apenas recebia, hoje eu quero retribuir.

Ao meu amado avô *José Câmara de Oliveira*, por toda a ternura que transmite nos seus olhos. Por este olhar que sempre viu em mim o que às vezes eu nunca via. Por olhar e não precisar falar. Obrigada por cuidar-me como uma menina, pela cumplicidade no bom gosto da música e da literatura. Pela calma que me traz, fruto dos seus bons conselhos. Agradeço o seu exemplo moral que sempre será o sustentáculo maior da família.

Ao meu irmãozinho, que me faz querer ser melhor do que tudo que há de melhor em mim.

À *André Luiz Santos de Araújo*, minha pessoa-luz. Agradeço pelo seu carinho, amizade e amor. Minhas escolhas acadêmicas contaram sempre com o seu incentivo, paciência e companheirismo diário. Agradeço também por ensinar-me que a leveza e a alegria são necessárias até nas dificuldades. Por esse dom de ser mar tranquilo que é o meu conforto. Espero buscar também esse Sol que você tem.

Pelo presente que Deus colocou na minha vida, Tenente *Cássia Surama Oliveira da Silva*. Falar de você é falar de honra, lealdade, serenidade, luz e amadurecimento, todas as maravilhas que vieram acompanhadas desde o início da nossa amizade. Obrigada por tudo, minha inspiração, cada conquista minha sempre será sua também. Você é a pessoa por quem eu lutaria numa guerra. Obrigada pela força, coragem e pelo imenso amor de mãe. Amo você!

Aos 10 anos de amizade dos meus fiéis amigos, *Renata Lopes, André de Oliveira e João Batista*. Agradeço a vocês pelo elo tão forte da nossa amizade, pelas gentilezas de coração e humildade, pelas conversas e conselhos que me deixam plenamente em paz.

À minha orientadora Prof^ª Dr^a *Maria da Conceição Rodrigues Gonçalves* por toda a honra em receber suas diretrizes, incentivo, confiança e tranquilidade, e à Prof^ª Dr^a *Maria José de Carvalho Costa* pelos ensinamentos durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. *José Luiz de Brito Alves*, pelo exemplo ímpar de humanidade, por toda a experiência, consideração e positividade que me despertaram para a sua grandeza como professor, que tem me proporcionado uma visão ampliada de toda uma nova jornada a ser descoberta, com base na determinação. Foi certamente, o período mais próspero desta minha inicial caminhada.

Aos membros da banca examinadora, Prof^ª. *Naila Francis Paulo de Oliveira*, Prof. *Alcides da Silva Diniz* e Prof^ª *Flávia Emília Leite de Lima Ferreira* pelo gentil aceite para participação nesta banca, pela delicadeza, atenção e pelas excelentes sugestões que ajudaram na lapidação deste trabalho.

Às doutorandas queridas *Rafaella Luna* e *Mussara*, por todo o carinho, amizade, confiança e força dedicados diariamente. Agradeço por cada momento compartilhado, pela vivência, apoio, harmonia e por sempre me receberem de braços abertos. Obrigada pelo exemplo moral, força e pela principal lição: que para na vida ser feliz, a única maneira é construir-se em um interior forte, simples, bem cheio de luz, onde longe do mundo, se possa verdadeiramente crescer em paz. Admiro-as imensamente.

À Prof^ª Dr^a. *Ana Hermínia Andrade e Silva*, por toda a disposição e boa vontade, pela contribuição inestimável na realização das análises estatísticas. Só tenho a agradecer por toda a ajuda e compreensão no momento que mais precisei. Pela confiança, sintonia e força que foram essenciais para a finalização desta etapa com excelência.

Ao Prof. Dr. *Alexandre Sérgio Silva* e a todos os membros do *Laboratório de Treinamento Físico Aplicado ao Desempenho e a Saúde*, pela receptividade e pela oportunidade de contribuir com os projetos de pesquisa que me proporcionaram

amadurecimento, seriedade e pela visão de um verdadeiro trabalho em equipe. Agradeço de modo especial, ao Prof. Dr. *Valter Azevedo* e à doutoranda *Glêbia Alexa Cardoso*, pela disposição, amizade e o carinho transmitido às 7 horas da manhã.

A toda a equipe de coordenadores, professores, estudantes, instituições executoras e financiadoras envolvidas no Projeto II DISANDNT/PB por tornar possível a concretização desta conquista por meio de investimentos em pesquisa científica.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Nutrição, a todos os professores do programa por contribuírem com o meu aperfeiçoamento profissional.

Por fim, a todos que de alguma forma colaboraram para a conclusão deste projeto. Muito obrigada!

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser (ainda),
mas Graças a Deus,
não sou mais o que era antes”.*

(Marthin Luther King)

RESUMO

Estudiosos têm evidenciado o papel da metilação do DNA como um mecanismo epigenético potencial relacionado com diversos genes candidatos ao desenvolvimento da obesidade e alterações no metabolismo de lipídeos. Portanto, diante das relações entre gene e obesidade, o objetivo deste estudo foi avaliar os níveis de metilação do DNA no gene *ADRB3* por índice de massa corporal (IMC) e relacionar com perfil lipídico, estresse oxidativo e consumo alimentar. Trata-se de um estudo transversal de base populacional, com 262 adultos com idades entre 20 a 59 anos, de ambos os sexos, representativo das zonas leste e oeste do município de João Pessoa/PB. Os questionários referentes às variáveis demográficas, socioeconômicas, epidemiológicas e de estilo de vida, além da avaliação nutricional foram aplicados nos domicílios. Para as análises bioquímicas, as concentrações séricas de homocisteína, alfa-1-glicoproteína ácida, perfil lipídico, ácido fólico, vitamina B12, malondialdeído (MDA) e capacidade de antioxidante total (CAT), foram analisadas. Para as análises dos níveis de metilação do DNA no gene *ADRB3* foi utilizado o método PCR em tempo real. As relações entre as variáveis do estudo foram realizadas utilizando a análise de variância (ANOVA) e modelos de regressão linear múltipla. Todos os resultados foram obtidos utilizando o *software* R versão 3.3.2. A partir da estratificação de categorias de IMC, observou-se diferença em média nos valores das variáveis idade, relação cintura/altura (RCA), relação cintura/quadril (RCQ), circunferência da cintura (CC), triglicerídeos e consumo de gordura trans, que ocorreram mais entre as categorias “eutrofia” e “obesidade”. A partir da análise de regressão múltipla no grupo de adultos eutróficos, observou-se que ocorreu relação negativa entre os níveis de metilação do gene *ADRB3* com valores séricos de ácido fólico, bem como com o gênero independente de IMC. No entanto, não observou-se relação entre perfil lipídico, estresse oxidativo e consumo alimentar nos indivíduos distribuídos nas três categorias de IMC. A ausência de relação dos níveis de metilação do gene *ADRB3* no sobrepeso e na obesidade leve e moderada pode ser explicada pela quantidade insuficiente de gordura corporal para iniciar os processos inflamatórios e de estresse oxidativo com impacto direto nos níveis de metilação.

Palavras-chave: Metilação do DNA. Índice de Massa Corporal. Lipídeos. Estresse Oxidativo. Consumo alimentar.

ABSTRACT

Researchers have highlighted the role of DNA methylation as a potential epigenetic mechanism related to several candidate genes for the development of obesity and changes in lipid metabolism. Therefore, in view of the relationship between gene and obesity, the aim of this study was to evaluate DNA methylation levels in the *ADRB3* gene by body mass index (BMI) and to correlate with lipid profile, oxidative stress and food intake. This is a cross-sectional population-based study, with 262 adults aged 20-59 years, of both sexes, representative of the eastern and western zones of the city of João Pessoa/PB. The questionnaires related to the demographic, socioeconomic, epidemiological and lifestyle variables, as well as the nutritional assessment were applied in the households. For the biochemical analyzes, the serum concentrations of homocysteine, alpha-1-acid glycoprotein, lipid profile, folic acid, vitamin B12, malondialdehyde (MDA) and total antioxidant capacity (TAC) were analyzed. For the analysis of DNA methylation levels in the *ADRB3* gene, the PCR real time method was used. The relationships between the study variables were performed using analysis of variance (ANOVA) and multiple regression models. All results were obtained using software version 3.3.2. From the stratification of BMI categories, there was a mean difference in the values of age, waist-to-height ratio (WHtR), waist-to-hip ratio (WHR), waist circumference (WC), triglycerides and trans fat consumption, which occurred more in the categories "eutrophy" and "obesity". From the multiple regression analysis in the eutrophic group, negative relationship was observed between the methylation levels of the *ADRB3* gene with serum folic acid levels, as well as with the gender-independent BMI. However, it was not observed a relationship between lipid profile, oxidative stress and food intake in the individuals distributed in the three categories of BMI. The absence of a relationship between methylation levels of the *ADRB3* gene in overweight and mild and moderate obesity can be explained by the insufficient amount of body fat to initiate inflammatory processes and oxidative stress with a direct impact on methylation levels.

Keywords: DNA methylation. Body mass index. Lipids. Oxidative stress. Food intake.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS DA DISSERTAÇÃO

Figura 1	As mudanças epigenéticas como causa ou consequência da obesidade e as morbididades relacionadas.....	24
Figura 2	Principais mecanismos epigenéticos.....	27
Figura 3	Mecanismos moleculares de metilação do DNA.....	28
Figura 4	Via de metabolismo do folato.....	30
Figura 5	Mapa utilizado no sorteio de quadras em João Pessoa/PB.....	34
Figura 6	Diagrama dos cálculos para definição da amostra da Zona leste do município de João Pessoa.....	38
Figura 7	Diagrama dos cálculos para definição da amostra da Zona oeste do município de João Pessoa.....	39
Figura 8	Fluxograma da coleta de dados.....	42
Figura 9	Processo de coleta e isolamento do DNA a partir dos leucócitos.....	48
Figura 10	Sequência esquemática das ilhas CpG do éxon 1 do gene <i>ADRB3</i> . Ilha 1 compreende 806 pares de bases (+ 621 até + 1426) e a Ilha 2 compreende 214 pares de bases (+ 1465 até + 1678). Barras vermelhas verticais indicam os sítios CpG.....	49

LISTA DE QUADROS

QUADROS DA DISSERTAÇÃO

Quadro 1	Critérios para estratificação final da amostra.....	35
Quadro 2	Estratificação dos bairros por renda com desvio padrão.....	36
Quadro 3	Cálculo da estimativa do tamanho da amostra, por zona.....	36
Quadro 4	Amostra de quadras por bairro, número de quadras sorteadas por bairro e zonas visitadas.....	37

LISTA DE TABELAS

TABELAS DO ARTIGO

Tabela 1	Características da amostra da população de adultos por estado nutricional do município de João Pessoa/PB/Brasil.....	80
Tabela 2	Análise de regressão múltipla dos níveis de metilação do gene <i>ADRB3</i> com perfil lipídico e estresse oxidativo dos indivíduos adultos por estado nutricional.....	82
Tabela 3	Análise de regressão múltipla dos níveis de metilação do gene <i>ADRB3</i> com variáveis de consumo alimentar dos indivíduos adultos eutróficos (n = 114).	90
Tabela 4	Análise de regressão múltipla dos níveis de metilação do gene <i>ADRB3</i> com variáveis de consumo alimentar dos indivíduos adultos com sobrepeso (n = 95).....	90
Tabela 5	Análise de regressão múltipla dos níveis de metilação do gene <i>ADRB3</i> com variáveis de consumo alimentar dos indivíduos adultos obesos (n= 53).....	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

I DISANDNT/JP Primeiro 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 Segundo Ciclo de Diagnóstico e Intervenção da Situação Alimentar, Nutricional e das Doenças Não Transmissíveis Mais Prevalentes da População do Município de João Pessoa/PB

AA *Arachidonic acid* (Ácido araquidônico)

ADIPOQ *Adiponectin* (Adiponectina)

ADRB3 *Adrenoreceptor Beta – 3* (Receptor adrenérgico Beta – 3)

AGs Ácidos graxos

AGT Ácidos graxos trans

ARMC8 *Armadillo repeat containing 8*

CAT Capacidade Antioxidante Total

CC Circunferência da Cintura

CCS Centro de Ciências da Saúde

CCEN Centro de Ciências Exatas e da Natureza

CH₃ metil

CNPq Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CpG *Cytosine – phosphate – Guanine* (Citosina – fosfato – Guanina)

CT Colesterol Total

DCNT Doenças Crônicas não Transmissíveis

DCVs Doenças Cardiovasculares

DHGNA Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica

DIRAS3 *DIRAS family GTPase 3*

DMT2 Diabetes Mellitus Tipo 2

DNA *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico)

DNMTs DNA metiltransferases

EDTA *Ethylenediamine tetraacetic acid* (Ácido Etilenodiaminotetracético)

EPA *Eicosapentaenoic acid* (Ácidos eicosapentaenóico)

EPIC European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition

Et-1 *Endothelin-1* (Endotelina-1)

EUA *United States of America* (Estados Unidos da América)

FAPESQ Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba

FTO *Fat-mass and obesity-associated protein* (Proteína da obesidade e de massa de gordura associada)

GWAS *Genome Wide Association Study* (Estudo de Associação em Todo o Genoma)

HA Hipertensão Arterial

HAT Histona Acetiltransferase

HDAC Histona Desacetilase

HDAC4 *Histone deacetylase 4* (Histona deacetilase 4)

HDL *High-Density Lipoprotein* (Lipoproteína de alta densidade)

HERV-w *Human endogenous retrovirus type w* (Retrovírus endógeno humano tipo w)

iNOS *Inducible nitric oxide synthase* (Induzível de óxido nítrico sintase)

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IMC Índice de Massa Corporal

LDL *Low-Density Lipoprotein* (Lipoproteína de baixa densidade)

LEP *Leptin* (Leptina)

MDA *Malondialdehyde* (Malondialdeído)

mRNA *Messenger RNA* (RNA mensageiro)

MS Ministério da Saúde

MSM *Method Source Multiple* (Método de Múltiplas Fontes)

MTHFR *Methylene tetrahydrofolate reductase* (Metileno tetra hidrofolato redutase)

ncRNAs RNAs não-codificantes

NHANES *National Health and Nutrition Examination Study*

NIESN Núcleo Interdisciplinar de Estudos em Saúde e Nutrição

NODAL *Nodal growth differentiation factor* (Fator de diferenciação do crescimento nodal)

OMS Organização Mundial de Saúde

PA Pressão Arterial

PCR *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

PKD4 *Pyruvate dehydrogenase kinase 4* (Piruvato desidrogenase quinase 4)

PPGCN Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição

PUFA *Polyunsaturated fatty acids* (Ácidos graxos poli-insaturados)

QFA Questionário de Frequência Alimentar

R24h Recordatório de 24 horas

RCA Relação Cintura/Altura

RCQ Relação Cintura/Quadril

RNA *Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucléico)

SAM S-adenosil-metionina

SM Síndrome Metabólica

SNPs *Single Nucleotide Polymorphisms* (Polimorfismos de nucleotídeo único)

SNS Sistema Nervoso Simpático

SOCS3 *Suppressor of Cytokine Signaling 3* (Supressor da sinalização de citocina 3)

SORBS3 *Sorbin and SH3 domain containing 3*

TAS Tecido adiposo subcutâneo

TAV Tecido adiposo visceral

TBARS *Thiobarbituric Acid Reactive Substances* (Ácido tiobarbitúrico)

TCLE Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TG Triglicerídeos

TNF- α *Tumor necrosis fator alpha* (Fator de Necrose Tumoral alfa)

UFPB Universidade Federal da Paraíba

WHO World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1 Sobrepeso e Obesidade em adultos	19
2.2 Genética e Obesidade	22
2.3 Epigenética e Metilação do DNA	26
2.4 <i>ADRB3</i>	31
3 ABORDAGEM METODOLÓGICA	33
3.1 Caracterização do estudo	33
3.2 Questões éticas	33
3.3 Protocolo amostral	33
3.4 População e amostra	40
3.4.1 Critérios de inclusão	41
3.4.2 Critérios de exclusão	41
3.5 Coleta de dados	41
3.6 Avaliação Nutricional	43
3.7 Avaliação do Consumo Alimentar	43
3.7.1 Estimativa do Consumo Habitual	44
3.8 Análise Bioquímica	44
3.8.1 Perfil Lipídico	45
3.8.2 Malondialdeído (MDA)	45
3.8.3 Capacidade Antioxidante Total (CAT)	45
3.8.4 Homocisteína	46
3.8.5 Alfa-1-glicoproteína ácida	46
3.8.6 Ácido Fólico	47
3.8.7 Vitamina B12	47
3.9 Análise do nível de metilação no gene <i>ADRB3</i>	47
3.9.1 Obtenção da amostra e Extração de DNA a partir do sangue	47
3.9.2 Desenho do Primer	49
3.9.3 Conversão do DNA pelo bissulfito de sódio	49
3.9.4 Níveis de metilação	50
3.10 Análise estatística	50

REFERÊNCIAS.....	52
APÊNDICE.....	61
APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	62
APÊNDICE B – Software para o desenho do primer.....	63
APÊNDICE C – Sequência Exon 1 do gene <i>ADRB3</i>.....	64
APÊNDICE D – UCSC Genome Browser.....	65
ANEXOS.....	66
ANEXO A – Certidão do Comitê de Ética em Pesquisa.....	67
ANEXO B – Identificação do distrito, número do caso e USF.....	68
ANEXO C – Caracterização socioeconômica e demográfica.....	69
ANEXO D – Caracterização epidemiológica.....	70
ANEXO E – Avaliação antropométrica.....	71
ANEXO F – Encaminhamento para exame de sangue	72
ARTIGO.....	73

1 INTRODUÇÃO

A patologia da obesidade é complexa e multifatorial, que pode ser influenciada por fatores genéticos, comportamentais e ambientais. Acredita-se que as interações gene-ambiente podem ser responsáveis pela modificação da expressão de genes e mecanismos epigenéticos, levando à obesidade e complicações associadas (CHANG; NEU, 2015).

A epigenômica refere-se ao estudo das modificações epigenéticas “do genoma”, e a epigenética pode ser definida como fenômenos herdados e reversíveis que afetam a expressão do gene, sem alterar a sequência de pares de base subjacente por meio de processos, incluindo a metilação do DNA, modificações pós-traducionais das histonas e a ação reguladora dos RNAs não-codificantes (KAUSHIK; ANDERSON, 2016).

A metilação do DNA é realizada por DNA metiltransferases (DNMTs), que consiste na adição de forma covalente de um grupo metil (CH_3) ao nucleotídeo citosina (C) de DNA, seguido por uma base guanina (G) na formação de 5-metilcitosina (HAGGARTY, 2015).

Há evidências crescentes de que os mecanismos epigenéticos podem mediar os efeitos nutricionais e serem responsáveis pelo desenvolvimento de doenças crônicas. Isto ocorre através das mudanças causadas pelas marcas epigenéticas no genoma, que são herdadas pelas próximas gerações, embora não alterando a sequência do DNA. Deste modo, fatores nutricionais podem ter potencial efeito sobre a expressão do gene através de mecanismos epigenéticos e estes efeitos são, portanto, muito relevantes para a prevenção de doenças cardiovasculares (DCVs) quando a modificação da nutrição é favoravelmente alterada (REMELY et al., 2015).

Durante o período embrionário podem ocorrer modificações no epigenoma, que podem contribuir para alterações na programação fetal do desenvolvimento humano. Evidências mostram que existe uma influência sobre a regulação nutricional epigenética durante a vida intra-uterina que pode resultar em modificações na idade adulta. Assim, as alterações do padrão epigenético estão associadas com diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), hipertensão arterial (HA), aterosclerose, distúrbios metabólicos, obesidade, e os resultados de perda de peso, com foco atual principal no estudo de possíveis terapias inovadoras baseadas em agentes nutricionais ou farmacológicos que podem modificar as marcas epigenéticas (WU; IMHOFF-KUNSCH; GIRARD, 2012).

A maioria dos fitoquímicos dietéticos podem modular o estresse oxidativo e a sinalização inflamatória, além de regular as vias metabólicas e bioenergéticas, podendo ser traduzidos em padrões epigenéticos estáveis de expressão gênica. Evidências crescentes têm

revelado que as interações complexas entre os componentes alimentares e as modificações de histonas, metilação do DNA e RNAs não-codificantes são fatores que influenciam o fenótipo da inflamação, atuando na proteção ou predisposição de um indivíduo a várias doenças crônicas, devido a uma ampla gama de respostas dos seres humanos aos componentes alimentares relacionados às modulações genéticas e epigenéticas da expressão de proteínas-alvo, aos principais genes envolvidos no metabolismo e a distribuição dos constituintes da dieta (VEL SZIC et al., 2015).

De acordo com Guay et al. (2012), em um estudo de todo o epigenoma, o gene *ADRB3* emergiu com um novo candidato promissor associado a doenças nutricionais, ganho de peso, metabolismo lipídico e de carboidratos, resistência à insulina e DCVs.

O receptor adrenérgico $\beta 3$ (*ADRB3*) está localizado no cromossomo 8, possui 2.252 pares de base e dois éxons, sendo expresso principalmente no tecido adiposo, e está envolvido na regulação do metabolismo energético e lipídico (MUND; FRISHMAN, 2013; DIAS et al., 2015). Segundo Guay et al. (2014), em uma primeira análise da metilação do DNA em *locus* do gene *ADRB3* no sangue e tecido adiposo visceral (TAV) de homens caucasianos foi revelado que a hipermetilação do DNA do gene *ADRB3* está associada com o aumento dos níveis de colesterol séricos, pressão arterial (PA), distribuição de gordura corporal e obesidade.

Portanto, diante das evidências entre gene e obesidade, esse estudo tem como objetivo geral avaliar os níveis de metilação do DNA no gene *ADRB3* por índice de massa corporal (IMC) e relacionar com perfil lipídico, estresse oxidativo e consumo alimentar, e como objetivos específicos: analisar os níveis de metilação do DNA no gene *ADRB3* em uma população representativa de adultos com eutrofia, sobrepeso e obesidade e relacionar os níveis de metilação do gene *ADRB3* com perfil lipídico, ácido fólico, vitamina B12, homocisteína, alfa-1-glicoproteína, estresse oxidativo, consumo de lipídeos totais e frações, folato e vitamina B12.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Sobrepeso e Obesidade em adultos

A Organização Mundial de Saúde (OMS) aponta a obesidade como um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. A projeção é que, em 2025, cerca de 2,3 bilhões de adultos estejam com sobrepeso, e mais de 700 milhões, obesos (WHO, 2016).

O sobrepeso e a obesidade são definidos como o acúmulo de gordura anormal ou excessivo que apresenta risco para a saúde. Como medida de obesidade geral, é utilizado o índice de massa corporal (IMC), sendo o peso corporal (Kg) dividido pela altura ao quadrado (Kg/m^2). Um indivíduo com $\text{IMC} \geq 30$ é considerado obeso e um com $\text{IMC} \geq 25$ é considerado com excesso de peso e, com base nessas medidas, em 2014, mais de 1,9 bilhão da população mundial de adultos, entre 18 anos e mais velhos, estavam acima do peso, sendo mais de 600 milhões obesos (WHO, 2016). No Brasil, estudiosos apontam que mais de 50% da população está acima do peso, ou seja, na faixa de sobrepeso e obesidade (ABESO, 2016).

A obesidade é um distúrbio metabólico originado a partir de um desequilíbrio no balanço entre a ingestão calórica e o gasto energético, resultando em excesso de gordura corporal e no desenvolvimento de um conjunto de distúrbios crônicos adversos, incluindo as DCVs, hipertensão, hiperinsulinemia, intolerância à glicose, dislipidemia, DM2, doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA), câncer, dispnéia do sono, doença de Alzheimer, doenças renais e pulmonares (ELIA; CONDORELLI, 2015).

O excesso prejudicial de nutrientes não é limitado aos efeitos de curto prazo e medidas de saúde pública são atualmente focadas no efeito da ingestão excessiva crônica (KRISTANC; KREFT, 2016). A ingestão de gorduras em excesso e a falta de atividade física são apenas uma parte do problema, e a associação da obesidade e diabetes com DCNT, como DCVs e câncer também é relevante. Deste modo, alterações na ingestão de alimentos, quando em excesso e contínua, podem tornar-se tóxicas e desencadear vários efeitos deletérios, como resposta inflamatória crônica, estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, adiposidade, resistência à insulina no músculo esquelético e diminuição da produção de insulina pelas células β do pâncreas (CAMPS et al., 2016).

A nova abordagem da obesidade reconhece os principais determinantes multifatoriais como fatores genéticos, epigenéticos, fisiológicos, comportamentais, sócio-culturais e ambientais que levam a um desequilíbrio entre o consumo e gasto energético durante um período de tempo prolongado (BRAY et al., 2016). A importância da duração do sono,

disruptores endócrinos, consumo de alimentos industrializados, tabagismo, o ganho de peso associado a alguns medicamentos, idade avançada dos pais ao nascimento e efeitos inter e intra-uterinos, têm sido relatados como contribuintes para a epidemia da obesidade (JANESICK; SHIODA; BLUMBERG, 2014).

Zhang et al. (2016), em um estudo de base populacional para investigar a prevalência de obesidade central entre adultos com IMC eutrófico e sua associação com doenças metabólicas na cidade de Jilin, na China, demonstraram que a hipertensão, diabetes e hiperlipidemia foram significativamente associados com a obesidade central entre os adultos eutróficos. Nesse estudo, entre os adultos com IMC eutrófico e obesidade central, 55,6% dos participantes auto-avaliaram como peso normal, 27,0% achavam que seu peso corporal estava “acima do normal” e apenas 12,7% dos participantes realizaram métodos para perder peso, enquanto que 85,3% não os fizeram. A partir desses resultados, constatou-se que a maioria dos indivíduos eutróficos acreditava que seu peso corporal não seria um fator de risco para doenças.

Outro estudo transversal de base populacional realizado por Xu et al. (2016) na cidade de Tianjin, na China, com amostra de 7.603 indivíduos com idades entre 20-79 anos, que teve como objetivo examinar em que medida diferentes indicadores de adiposidade corporal, tais como IMC, circunferência da cintura (CC) e relação cintura/quadril (RCQ) afetam a prevalência de sobrepeso e obesidade e utilizando a combinação dos três indicadores, observou-se que a prevalência de sobrepeso e obesidade foi de 69,8%, aumentou com a idade até 60 anos e houve um declínio depois. A prevalência de sobrepeso avaliada apenas pelo IMC foi maior do que a avaliada pela CC e RCQ, enquanto que a prevalência da obesidade definido pelo IMC foi muito menor do que o definido pela CC ou RCQ.

Segundo o estudo de Mi et al. (2015), a prevalência da obesidade entre homens e mulheres chineses aumentou significativamente de 1991 a 2011, particularmente entre os homens. Sendo a obesidade definida como $IMC \geq 28,0 \text{ Kg/m}^2$ de acordo com critérios da China, na pesquisa de 2011, a média do IMC ajustado à idade foi de $23,8 \text{ Kg/m}^2$ para os homens e $23,4 \text{ Kg/m}^2$ para as mulheres. A prevalência ajustada por idade de obesidade foi de 11,3% no geral, 11,8% entre os homens, e 11,0% entre as mulheres. As estimativas de prevalência de obesidade idade-ajustada entre a população chinesa foram significativamente menores do que os da população dos Estados Unidos (todas $p < 0.05$). Durante o período de 20 anos, a prevalência de obesidade aumentou de 2,88% para 11,8% entre os homens e de 4,55% para 11,0% entre as mulheres.

No estudo de Taylor et al. (2015), utilizando uma amostra representativa de dados coletados através de um sistema de vigilância de doença e fator de risco crônicos por mais de 10 anos, empregando a metodologia de análise de idade, período e coorte para identificar e descrever padrões e tendências para ajudar na interpretação do aumento da prevalência de obesidade e diabetes no Sul da Austrália, segundo os autores referidos, a prevalência de idade-sexo padronizada para obesidade e diabetes aumentou em 2002-2013 de 18,6% para 24,1% e de 6,2% para 7,9%, respectivamente. A idade de pico para a obesidade foi de aproximadamente 70 anos, com uma taxa de aumento constante entre 20 e 70 anos de idade, e para a diabetes foi de aproximadamente 80 anos. Houve efeitos de coorte fortes com uma aceleração de risco após 1960 para a obesidade e depois da década de 1940 para a diabetes, destacando que a magnitude do efeito de coorte foi muito mais pronunciada para a obesidade do que para a diabetes.

Flegal et al. (2016), objetivando uma compreensão mais abrangente das tendências da obesidade nos Estados Unidos, examinaram a prevalência de obesidade em 5.455 adultos (2.638 homens, com média idade de 46,8 anos e 2.817 mulheres, com idade média de 48,4 anos) a partir dos 2 anos mais recentes do inquérito contínuo *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) em 2013-2014 e as tendências ao longo da década de 2005 a 2014 e o ajuste para sexo, idade, raça/origem hispânica, tabagismo e educação. A prevalência ajustada por idade de obesidade em 2013-2014 foi de 35,0% entre os homens e de 40,4% entre as mulheres. Para ambos os sexos, a prevalência de obesidade variou por raça/origem hispânica. Para os homens, a prevalência de obesidade também variou pelo tabagismo, com a prevalência da obesidade significativamente mais baixa entre os fumantes do que entre os que nunca fumaram. Os valores correspondentes para a obesidade classe 3 ($IMC \geq 40,0 \text{ Kg/m}^2$) foram de 5,5% para os homens e 9,9% para as mulheres. Para as mulheres, a prevalência da obesidade geral e de classe 3 ambas mostraram uma tendência linear significativa entre 2005 e 2014.

Pengpid e Peltzer (2017) analisaram as associações entre os fatores de risco comportamentais e excesso de peso e obesidade em 48.741 adultos em amostras representativas da população nacional de 20 países na Europa, 8 países da Ásia, Austrália, Chile e EUA. No geral, para todos os 31 países, a prevalência de excesso de peso ou obesidade foi de 44,1%, 31,7% com sobrepeso e 12,4% obesidade. Em modelos de regressão logística ajustada, os homens e as mulheres ex-fumantes foram positivamente associados com sobrepeso e obesidade, enquanto o fumo leve ou moderado entre os homens foi inversamente relacionado com a obesidade. O uso moderado de álcool foi positivamente associado com

sobrepeso e obesidade, enquanto o uso demasiado de álcool foi associado negativamente com excesso de peso. O consumo diário de frutas e vegetais foi encontrado para ser protetor de sobrepeso e obesidade geral para os homens, mas não para as mulheres. A atividade física foi positivamente associada com excesso de peso, mas não com a obesidade, revelando que alguns comportamentos de risco para doenças crônicas parecem estar associados com sobrepeso e obesidade entre os adultos.

2.2 Genética e Obesidade

Durante a última década, tem aumentado o interesse no papel da epigenética no desenvolvimento de condições complexas, como a obesidade. No geral, progressos significativos têm sido feitos no campo da epigenética e obesidade e do potencial de marcadores epigenéticos para a obesidade que podem ser detectados no nascimento. Consequentemente, isso pode contribuir para a previsão de um risco de obesidade do indivíduo ainda na idade jovem e permitir possibilidades para a introdução de estratégias de prevenção direcionadas. Tornando-se evidente que várias marcas epigenéticas são modificáveis, alterando a exposição no útero, mas também por mudanças de estilo de vida na fase adulta, o que implica o real potencial para intervenções que podem ser introduzidas no período pós-natal para modificar os perfis epigenômicos desfavoráveis (VAN DIJK et al., 2015a).

Vários estímulos ambientais podem alterar a metilação do DNA com um impacto para o desenvolvimento da obesidade, já que a obesidade é uma doença programável no âmbito de modificações epigenéticas quando expostos a agressões ambientais desfavoráveis, como estresse oxidativo, dieta rica em calorias, álcool e a poluição do ar. O estresse oxidativo pode ser coordenado através de mudanças nos padrões de metilação, que conduz ao estado de doença crônica da obesidade (YARA; LAVOIE; LEVY, 2015).

Processos epigenéticos são dinâmicos, reversíveis e sensíveis a fatores exógenos. Portanto, eles oferecem uma oportunidade única para a dieta à base de intervenções que visam às vias epigenéticas (CHENG; XU, 2010). A nutrição tem uma importância à longo prazo que pode afetar gerações posteriores. Deste modo, a restrição calórica benéfica desempenha um papel nutricional pertinente contribuindo para a longevidade, através da modulação favorável de mecanismos epigenéticos, tais como a metilação do DNA e a modificação de histonas (SARGENT, 2015). Portanto, o aconselhamento dietético específico para os indivíduos com um fenótipo particular pode ser mais eficaz na prevenção de doenças crônicas do que

recomendações gerais sobre a dieta sem a fundamentação epigenética (NIELSEN; EL-SOHEMY, 2012).

A identificação de mudanças nos perfis de metilação do DNA, modificações de histonas ou outro processo epigenético relacionado, podem ajudar a prever a susceptibilidade do indivíduo de ganhar ou perder peso. Desta forma, a investigação dos mecanismos epigenéticos que afetam a homeostase do peso pode desempenhar um importante papel na prevenção da deposição excessiva de gordura, auxiliando na previsão de um plano de redução de peso mais adequado e específico nos casos de obesidade (MARTINEZ et al., 2014).

Como muitas funções celulares relacionadas com a homeostase energética são reguladas pela expressão gênica e interações gene-ambiente, as variações individuais no peso corporal, composição e metabolismo do tecido adiposo podem ser influenciados pela composição genética e ingestão de nutrientes, bem como por vias bioquímicas mediadas por genes que regulam a absorção de nutrientes, distribuição, metabolismo e excreção, além de outros processos energéticos celulares (JENAB et al., 2009). A ingestão materna não adequada de gordura, folato, proteínas e ingestão total de energia pode alterar a regulação epigenética de genes específicos da prole, resultando na alteração da função do tecido (BURDGE; HOILE; LILLYCROP, 2012).

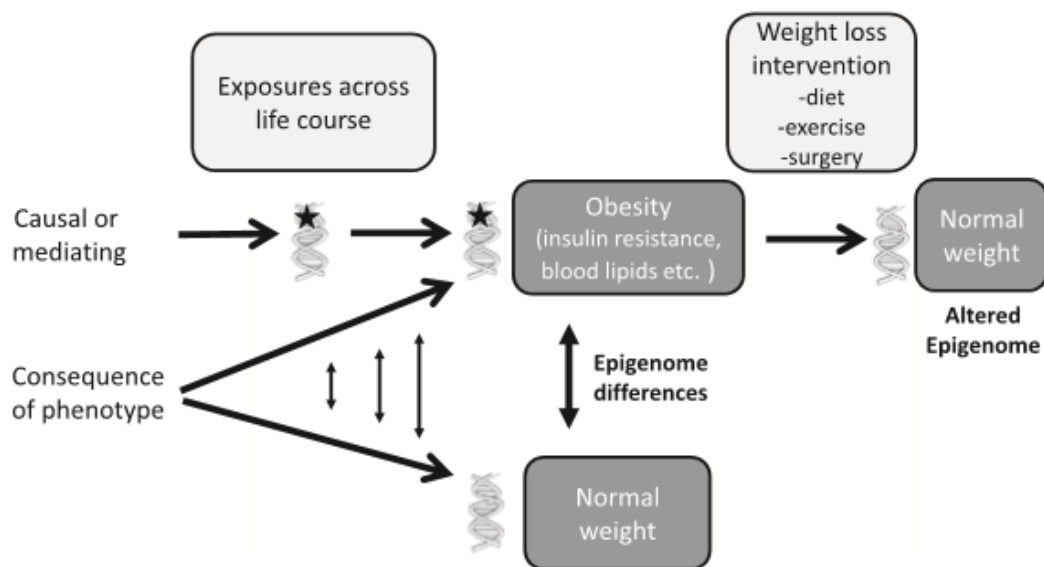
Além disso, evidências de estudos epidemiológicos e experimentais têm sugerido uma teoria da "programação fetal da doença de adultos" para a obesidade e as complicações metabólicas associadas, o que denota um papel essencial para os períodos intra-uterinos e neonatais (GALI RAMAMOORTHY et al., 2015; THORNBURG, 2015). Deste modo, tanto a sub quanto a sobre-nutrição durante os estágios intra-uterino e neonatal afetam profundamente a saúde humana em um momento posterior da vida, produzindo alterações evidentes na atividade do genoma, sem alterar a sequência de DNA, possivelmente resultando em memória epigenética e mudanças transgeracionais na saúde do fenótipo (WHARTON, 2016; LIM et al., 2015).

Evidências iniciais de apoio ao papel da epigenética na obesidade e DMT2 foram fornecidas principalmente por estudos com animais, que registraram mudanças epigenéticas no metabolismo de tecidos após a alimentação rica em gordura e consequentemente em calorias e diferenças epigenéticas entre os animais magros e obesos e por estudos em humanos que mostraram mudanças epigenéticas em genes candidatos da obesidade e DMT2 em indivíduos obesos/diabéticos. Recentemente, os avanços nas metodologias epigenéticas do Estudo de Associação em Todo o Genoma (GWAS) levaram a uma rápida expansão dos estudos em populações humanas. Estes estudos também relataram diferenças epigenéticas

entre adultos obesos / DMT2 e controles saudáveis e mudanças epigenéticas em associação com fatores nutricionais, perda de peso e as intervenções de exercício (VAN DIJK et al., 2015b).

Uma questão chave é a medida na qual as modificações epigenéticas podem contribuir para o desenvolvimento do fenótipo metabólico, ao invés de simplesmente ser uma consequência dela (Figura 1). Dessa forma, a programação epigenética poderia contribuir para o desenvolvimento da obesidade, bem como a reprodução de um papel em consequência, o risco de problemas cardiovasculares e metabólicos (VAN DIJK et al., 2015b).

Figura 1. As mudanças epigenéticas como causa ou consequência da obesidade e as morbidades relacionadas.



FONTE: Van Dijk et al. (2015b).

A associação da epigenética com o colesterol e a homeostase da glicose têm desempenhado um papel importante na susceptibilidade, desenvolvimento e progressão de morbidades complexas, tais como DMT2, obesidade e síndrome metabólica (SM) (EGGERMANN et al., 2015).

Bollati et al. (2014) avaliaram os efeitos da ingestão de nutrientes na metilação do DNA em um conjunto de cinco genes que desempenham papéis importantes no processo inflamatório e estresse oxidativo (*CD14*, *Et-1*, *iNOS*, *HERV-w* e *TNFα*) em 165 indivíduos adultos com sobrepeso e obesidade, e constataram que não houve associação entre IMC e metilação do DNA de qualquer um dos respectivos genes na população estudada. No entanto, a metilação do *TNFα* foi positivamente associada com níveis séricos de LDL, a relação de

CT/HDL e a proporção de LDL/HDL. Através de dados derivados do questionário de frequência alimentar (QFA), foram identificadas associações positivas significativas de metilação do *HERV-w* com a ingestão dietética de β -caroteno e carotenóides, bem como associações negativas de metilação do *TNF α* com consumo de colesterol, ácido fólico, β -caroteno, carotenóides e retinol.

De acordo com Houde et al. (2015), em um estudo com 73 indivíduos com obesidade grave de ambos os sexos, os níveis de metilação do DNA no promotor do gene *ADIPOQ* no tecido adiposo subcutâneo foi positivamente associado com o IMC e CC, enquanto que os níveis de metilação do DNA no gene *LEP* em células sanguíneas foram negativamente associados com o IMC. Os valores de colesterol LDL foram associados com os níveis de metilação do DNA em ambos os genes, sugerindo assim que o LDL pode regular os seus perfis epigenéticos no tecido adiposo subcutâneo e visceral, confirmando a partir desses resultados que os perfis epigenéticos dos genes *LEP* e *ADIPOQ* estão associados com a obesidade.

Aslibekyan et al. (2014), em um estudo para avaliar as alterações na metilação em todo o genoma associadas com a ingestão de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) ω -3, realizado em 185 indivíduos nativos do Alaska, identificaram 27 sítios CpG com metilação diferencial em várias regiões do genoma. Padrões de metilação do DNA em várias regiões genômicas estavam associados com o consumo de PUFA ω -3, bem como a glicose em jejum e colesterol LDL, apresentando evidências preliminares em apoio da hipótese emergente de regulação nutricional das mudanças epigenéticas que podem estar envolvidas na proteção contra a doença metabólica e cardiovascular.

De la Rocha et al. (2016) demonstraram pela primeira vez através da análise de regressão linear múltipla, uma forte associação da metilação do DNA dos genes *HDAC4* e *PDK4*, ambos importantes reguladores do metabolismo da glicose e AGs, como os ácidos eicosapentaenóico (EPA) e araquidônico (AA) em DNA em duas coortes de dieta e estágio de desenvolvimento pós-natal distintas, independente do IMC e sexo.

No estudo de Flores-Sierra et al. (2016), que investigaram pela primeira vez os efeitos do ácido graxo elaídico (*trans*) e o ácido oleico (*cis*) sobre a metilação do DNA, constataram que o ácido elaídico e seu isômero *cis* ácido oléico exercem perfis distintos de metilação global do DNA e na transcrição gênica em culturas de células humanas. Além disso, o ácido elaídico induz a hipermetilação global do DNA no tecido adiposo, que pode ser imposta pela exposição materna e que são detectáveis até 3 meses no pós-natal em modelos de ratos.

Sugerindo assim, que os efeitos deletérios dos ácidos graxos trans (AGT) na saúde humana podem exercer efeitos à longo prazo sobre o epigenoma após a exposição materna.

Segundo Day et al. (2016), em um estudo com 12 genes (abrangendo 22 sítios de metilação) no qual demonstraram uma relação negativa entre a expressão gênica e a metilação do DNA, a hipermetilação do gene *SORBS3* foi associada com uma diminuição significativa da expressão do gene nos participantes com obesidade, enquanto que os demais 11 genes apresentaram um aumento da expressão do gene que estava correlacionada com uma diminuição da metilação.

Ali et al. (2016), avaliaram a relação entre a metilação do DNA e a obesidade em todo o genoma utilizando uma coorte de origem no Norte da Europa. Foram identificados 3 sítios, no qual o perfil de metilação foi associado com o percentual de índice de massa corporal (%IMC). Esses sítios também foram associados com SM, incluindo obesidade central, depósitos de gordura, capacidade de resposta à insulina e colesterol séricos. O perfil de metilação do gene *SOCS3* foi inversamente associado com o %IMC, relação cintura-altura (RCA), triglicerídeos (TG) e SM, e positivamente correlacionada com colesterol HDL. Além disso, a metilação e expressão gênica do *SOCS3* em células mononucleares do sangue periférico foram inversamente correlacionadas e a expressão do *SOCS3* foi positivamente correlacionada com o estado de SM.

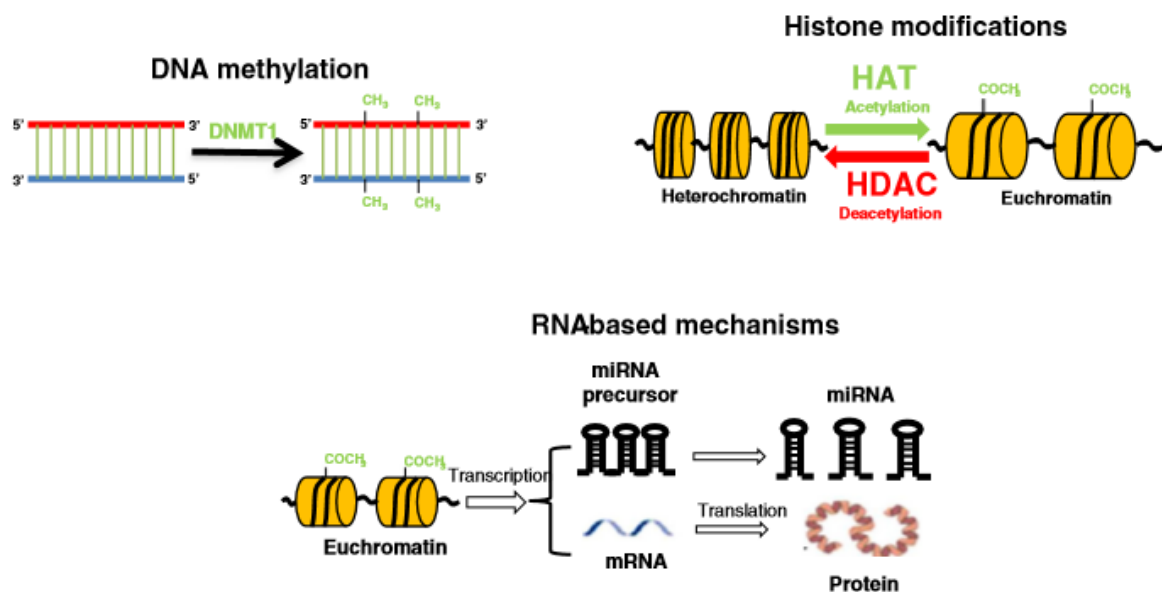
Embora a genética da obesidade seja complexa, o gene *FTO* tem sido o mais fortemente associado com a obesidade até agora. Recentemente, estudiosos começaram a elucidar a fisiopatologia subjacente de como esse gene pode atuar no aumento do risco para a obesidade. Vários polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) podem alterar diversos reguladores em relação à diferenciação de adipócitos e termogênese. O gene *FTO* está associado significativamente com várias doenças gastrointestinais, como DHGNA, adenomas do cólon, câncer de pâncreas e no sucesso da cirurgia bariátrica, sendo necessárias mais investigações sobre este *locus* genético para o fornecimento de pistas para potenciais alvos terapêuticos (EHRLICH; FRIEDENBERG, 2016).

2.3 Epigenética e Metilação do DNA

A epigenética é descrita como o fenômeno da alteração da expressão fenotípica da informação genética hereditária que ocorre sem mudanças na sequência de nucleotídeos do DNA (MARTINO et al., 2016). Os principais mecanismos epigenéticos envolvem a metilação do DNA e as modificações pós-traducionais de histonas da cromatina que se projetam a partir

de núcleos dos nucleossomos, e incluem a acetilação, fosforilação e ubiquitinação (WHAYNE, 2015), além de pequenos RNAs não codificantes (microRNAs) (ZHANG; REN, 2016). Estes mecanismos (Figura 2) regulam a expressão gênica e são uma parte vital do desenvolvimento normal e diferenciação de células especializadas (ALBERGHINI et al., 2015; ELIA; CONDORELLI, 2015). Uma dessas modificações, a acetilação de histonas, consiste na adição de um radical acetil nos resíduos de lisina das histonas e ocorre por meio da enzima denominada histona acetiltransferase (HAT), resultando na descompactação da cromatina (eucromatina), favorecendo a expressão gênica. Por outro lado, a enzima histona desacetilase (HDAC) faz a remoção dos grupos acetil, condensando a estrutura da cromatina à heterocromatina e tornando o DNA inacessível aos fatores de transcrição. Alterações na estrutura da cromatina alteram a expressão do gene, enquanto que os RNAs não codificantes controlam a expressão gênica a nível pós-transcricional (RAE, 2016).

Figura 2. Principais mecanismos epigenéticos.



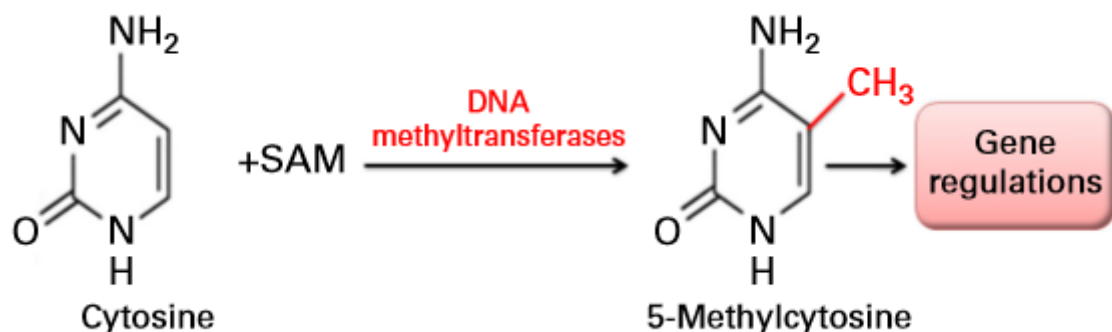
FONTE: Zhang; Ren (2016).

Como os padrões epigenéticos são estabelecidos durante o início da gestação e estão sujeitos a transformações através de fatores ambientais durante a vida, os mecanismos epigenéticos tornam-se muito importantes no desenvolvimento e na transmissão transgeracional de doenças crônicas não-transmissíveis (DCNT), incluindo a obesidade (CHOI et al., 2013).

A partir de vários estudos de associação do epigenoma, tornou-se claro que as alterações epigenéticas em resposta às condições ambientais, dieta e mutações genéticas contribuem para o desenvolvimento e a progressão de doenças inflamatórias como a artrite reumatóide, doenças metabólicas (obesidade, DM2), DCVs e câncer (MILL; HEIJMANS, 2013). Fatores como estilo de vida e dieta têm uma forte influência na regulação epigenética de genes do metabolismo de energia, tais como leptina (responsável pelo controle do apetite), receptor de insulina (que desempenha um papel central na homeostase da glicose), Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) (considerado como uma adipocina devido ao seu papel na inflamação relacionada com a obesidade e modulação da resposta de insulina), e a síntese de ácidos graxos (AGs) (ao catalisar a síntese de ácidos graxos) (MILAGRO et al., 2013).

A metilação do DNA é uma modificação epigenética (Figura 3) resultante da adição de um grupo metil na posição do carbono 5 de citosinas e, mais comumente em citosinas anteriores a guaninas, formando sítios de dinucleotídeos no genoma denominados de dinucleotídeos CpG, a partir de DNA metiltransferases (DNMTs), e refere-se a um mecanismo por meio do qual no início da vida as modificações são biologicamente memorizadas ou incorporadas (HUIDOBRO; FERNANDEZ; FRAGA, 2013; DEMETRIOU et al., 2015). Os padrões de metilação do DNA são estabelecidos durante o desenvolvimento precoce e são mantidos no tecido diferenciado através de DNMTs (JELTSCH; JURKOWSKA, 2014).

Figura 3. Mecanismos moleculares de metilação do DNA.



FONTE: Zheng et al. (2014).

As DNMTs são uma das mais importantes classes de enzimas envolvidas na metilação do DNA e na manutenção da metilação do genoma (RAE, 2016). Quatro variações principais de DNMTs foram identificadas em seres humanos, denominadas DNMT1, DNMT3A,

DNMT3B e DNMT3L, para mediar a metilação. A DNMT1 mantém os padrões de metilação existentes da fita original. A DNMT3A e DNMT3B, por outro lado, estão relacionadas com a regulação da metilação de DNA *de novo*, enquanto que a DNMT3L atua como um co-fator único na metilação em células germinativas. Em geral, a metilação do DNA impede a ligação dos fatores de transcrição, levando ao silenciamento ou supressão da expressão dos genes, acarretando na não-transcrição do DNA (HAGGARTY, 2015).

Frequentemente, os baixos níveis de metilação do DNA (hipometilação) estão associados com o aumento da atividade do gene, enquanto que altos níveis de metilação (hipermetilação) são associados com alterações de repressão do gene (YU et al., 2015). A metilação do DNA é a marca epigenética mais estudada com forte suporte mecanicista tanto para hereditariedade quanto para respostas a mudanças dietéticas (MENTCH et al., 2015; RODRIGUEZ-GALLEGO et al., 2015; MADDOCKS et al., 2016; MENTCH; LOCASALE, 2016).

O ácido fólico, presente nos vegetais, desempenha um papel importante na provisão de grupos metil que são usados para sintetizar S-adenosil-metionina (SAM), que é o doador de metil universal para a metilação do DNA. Além disso, a metionina, tal como o substrato para SAM e aminoácidos essenciais humanos, também é essencial para a manutenção do fluxo de grupos metil para a remetilação (CRIDER et al., 2012).

O ácido fólico é metabolizado eventualmente a metionina (Figura 4), a qual é então convertida em SAM, o doador da molécula metil. SAM doa um grupo metil para DNA, RNA, proteínas e lípidos. As vitaminas B2 e B12 são necessárias para este processo. A enzima metileno tetra hidrofolato redutase (MTHFR) é responsável por este processo, bem como, as mutações no gene que codifica esta enzima são ligadas à hiper-homocisteinemia leve como a homocisteína pode também ser convertida em metionina (SHORTHER; FELDER; VRANA, 2015).

De acordo com Kok et al. (2015), o folato e o ácido fólico sintético podem servir como doadores para a emissão de unidades de carbono em conjunto com vitaminas do complexo B, e têm sido implicados em processos de programação epigenética durante o início do desenvolvimento. Um estudo randomizado, controlado por placebo sobre os efeitos à longo prazo da suplementação de ácido fólico e vitamina B12 na incidência de fraturas de ossos em idosos com níveis de homocisteína ligeiramente elevados, observou alterações no perfil de metilação do DNA de genes em leucócitos (*DIRAS3*, *ARMC8* e *NODAL*) implicados nos processos de desenvolvimento normal e carcinogênese.

2.4 ADRB3

A proteína codificada pelo gene do receptor adrenérgico $\beta 3$ (*ADRB3*) pertence à família dos receptores beta adrenérgicos, que medeiam a ativação induzida pela catecolamina da adenilato ciclase através da ação das proteínas G. O *ADRB3* é o receptor chave que medeia a termogênese bem como a lipólise, estimuladas por catecolaminas no tecido adiposo. Nos seres humanos, a baixa atividade do *ADRB3* pode promover a obesidade através da diminuição da função no tecido adiposo. Assim, os genes que codificam esses receptores são candidatos interessantes para explicar parte da predisposição genética à obesidade em seres humanos (LEOŃSKA-DUNIEC; AHMETOV; ZMIJEWSKI, 2016).

O gene *ADRB3* é expresso principalmente no tecido adiposo visceral (TAV) em adultos, e está envolvido na lipólise do tecido adiposo branco e marrom e na regulação da termogênese (KURYLOWICZ et al., 2015). O aumento do gasto energético através da ativação endógena do tecido adiposo marrom é uma abordagem potencial para tratar a obesidade e diabetes, já que a classe de agonistas do receptor adrenérgico $\beta 3$ pode estimular a termogênese do tecido adiposo marrom humano, sendo um tratamento promissor para a doença metabólica (CYPESS et al., 2015).

O sistema nervoso simpático (SNS) está relacionado com a função do tecido adiposo e diferentes receptores adrenérgicos, principalmente o receptor adrenérgico $\beta 3$, com uma relação bidirecional. Um desequilíbrio simpático/ parassimpático do receptor adrenérgico $\beta 3$ está relacionado com o armazenamento de TAV. Assim, para além dos fatores bem conhecidos classicamente associados com a síndrome da adiposidade visceral, a atividade autonômica tem um importante papel na regulação do tecido adiposo subcutâneo e visceral (LOPES et al., 2016).

Guay et al. (2012) apresentaram uma série de novos genes candidatos para a investigação da base molecular da dislipidemia, incluindo o gene *ADRB3*. Os autores constataram que os indivíduos com hipercolesterolemia familiar com baixos níveis de HDL apresentaram hipermetilação do DNA no promotor do gene *ADRB3*, em comparação com os indivíduos com hipercolesterolemia que possuíam níveis de HDL mais elevados, demonstrando assim que a variabilidade dos níveis de metilação do DNA pode contribuir de forma significativa nas concentrações plasmáticas de HDL.

A hipermetilação no DNA do gene *ADRB3* foi significativamente associada com a dislipidemia em hipercolesterolemia familiar, com uma menor RCQ e PA mais elevada em homens com obesidade grave. Enquanto que a hipometilação foi associada com uma maior

RCQ. Curiosamente, os homens com obesidade grave também apresentaram hipometilação do *ADRB3* em comparação com homens com hipercolesterolemia familiar, tendo sido demonstrado que alterações epigenéticas no gene *ADRB3* podem estar envolvidas no desenvolvimento da obesidade, bem como nas respectivas complicações metabólicas (GUAY et al., 2014).

Em um estudo envolvendo um painel de genes relacionados com a termogênese, a expressão do *ADRB3* foi significativamente menor nos tecidos adiposos dos indivíduos obesos do que nos tecidos de indivíduos com peso normal, destacando que no obeso, a expressão do *ADRB3* foi menor no TAV do que no tecido adiposo subcutâneo (TAS). No entanto, não houve correlação entre o nível de expressão e o nível de metilação. Logo, a diminuição da expressão do gene *ADRB3* relacionado com a termogênese nos tecidos adiposos de indivíduos obesos pode ser devido à baixa reatividade para os estímulos hormonais e adrenérgicos, e assim, com um menor potencial para ativar a termogênese do que em indivíduos não-obesos (KURYLOWICZ et al., 2015).

Em outro estudo sobre a relação entre o polimorfismo Trp64Arg do gene *ADRB3* e a obesidade e os níveis de colesterol séricos realizado com 1.602 chineses de ambos os gêneros, na análise geral, não houve associação significativa entre o polimorfismo Trp64Arg e o IMC tanto no grupo de hipertensos quanto no grupo normotenso. Entretanto, no subgrupo hipertenso, os resultados da regressão múltipla revelou associação significativa entre o polimorfismo Trp64Arg e os níveis de colesterol séricos. O polimorfismo pode afetar em 3,2% as variações do nível de colesterol total, 2,5% nas variações dos níveis de LDL e 3,4% das variações da proporção de HDL. No subgrupo normotenso, não houve associação significativa entre o polimorfismo e os níveis de colesterol. Demonstrando, portanto, que o polimorfismo Trp64Arg no gene *ADRB3* pode estar associado com a dislipidemia em indivíduos hipertensos (LIU et al., 2015).

No entanto, os resultados dos respectivos estudos não se aplicam ao do presente estudo, inédito quanto aos níveis de metilação do gene *ADRB3* em leucócitos em uma população representativa de adultos de ambos os sexos com base nas três categorias de IMC.

3 ABORDAGEM METODOLÓGICA

3.1 Caracterização do estudo

Trata-se de um estudo transversal, vinculado a uma pesquisa de base populacional intitulada “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.

3.2 Questões éticas

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 (ANEXO A).

Para o presente estudo de dissertação, 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 A).

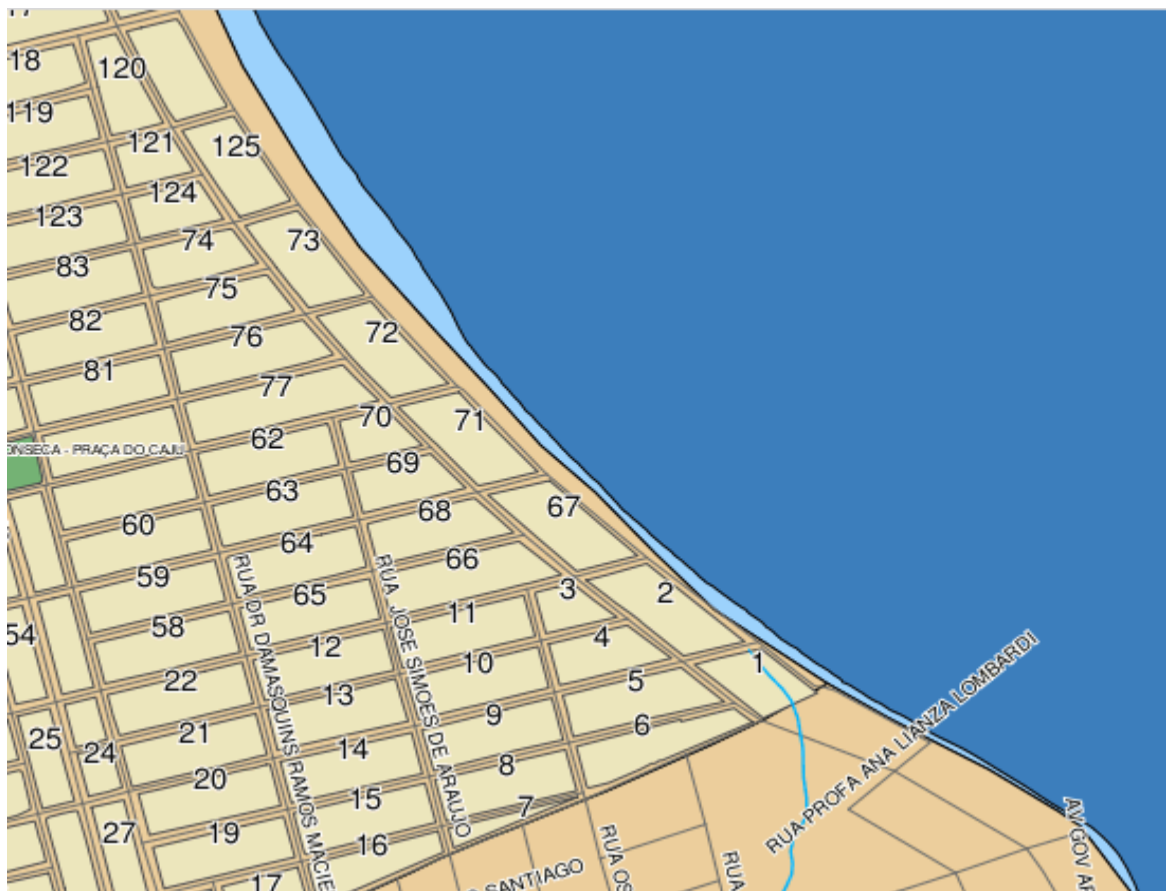
3.3 Protocolo amostral

Para realização do presente projeto, estudo inédito de base populacional, representativo de 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 5) 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; SICHIERI; GIGANTE, 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 1 e a estratificação dos bairros por renda com desvio padrão e peso de cada estrato observa-se no quadro 2.

Figura 5. Mapa utilizado no sorteio de quadras em João Pessoa/PB.



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

Quadro 1. Critérios para estratificação final da amostra.

CRITÉRIOS PARA ESTRATIFICAÇÃO (4 ESTRATOS)	ESTRATIFICAÇÃO FINAL (4 ESTRATOS)
Até 2,5 salários mínimos*	Estrato 1: bairros de até 2,5 salários mínimos
Até 5 salários mínimos	Estrato 2: 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 2, 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; MORAES; COSTA, 2009):

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

Assim, pode-se calcular a amostra por zona (Quadro 3):

$$nh = wh n$$

Quadro 2. 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 3. 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	0.0196165	7
LESTE	402	5	14.7309	0.0445528	14
LESTE	1083	9	83.1941	0.1200266	38
OESTE	569	4	92.3594	0.0630611	20
OESTE	577	3	145.5690	0.0639477	20
OESTE	153	1	0.0000	0.0169567	6

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

Como apresentado no quadro 2, 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 3). Após definido o número de quadras a serem amostradas para cada bairro (Quadro 4), 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 4. 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 3, 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 6 e 7.

Figura 6. Diagrama dos cálculos para definição da amostra da Zona leste do município de João Pessoa.

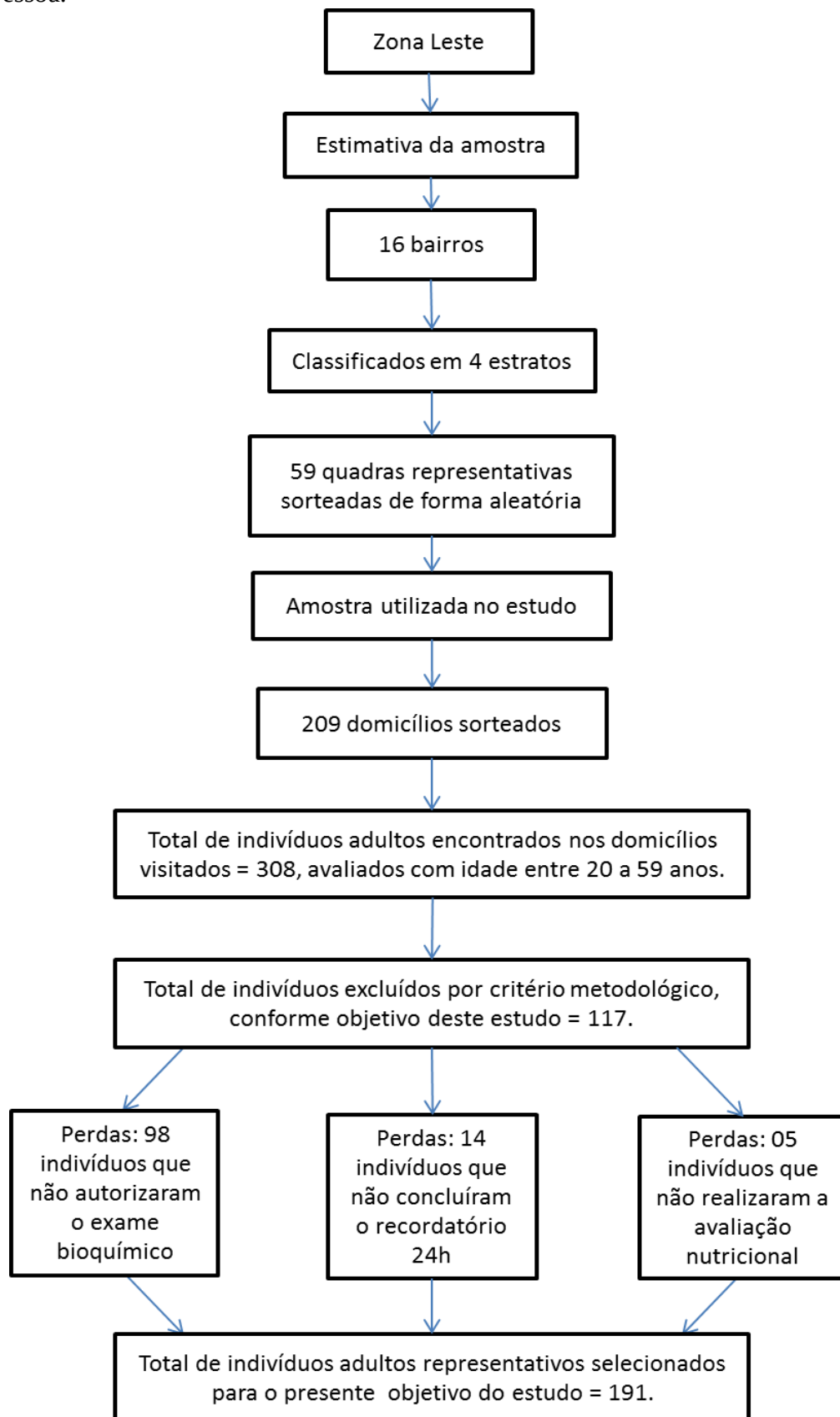
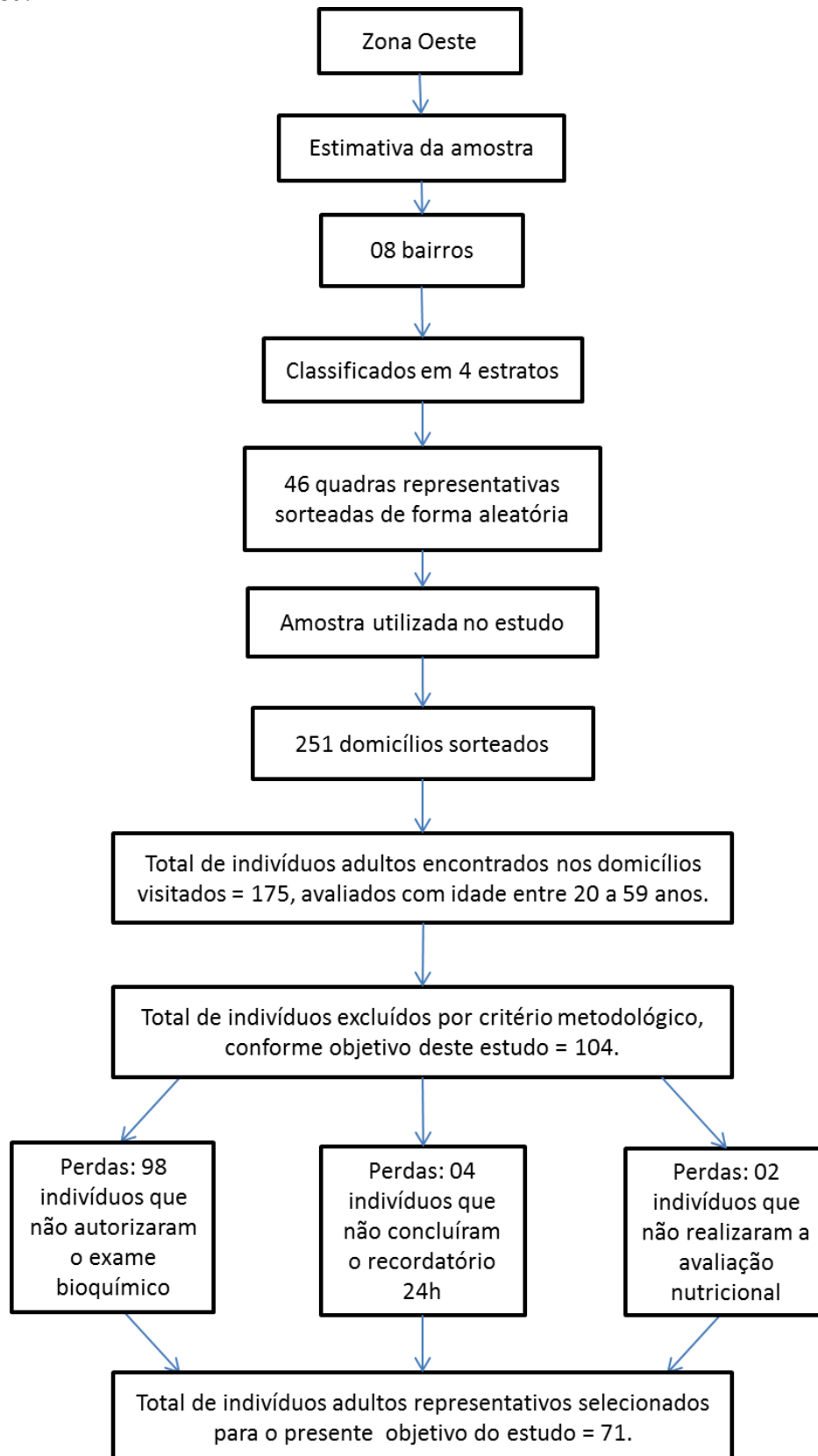


Figura 7. Diagrama dos cálculos para definição da amostra da Zona oeste do município de João Pessoa.



3.4 População e amostra

Para realização do presente projeto, estudo inédito de base populacional, representativo de adultos das zonas Leste e Oeste do município de João Pessoa, constatou-se que esta população é superior a 10.000 habitantes, conforme dados do Censo Demográfico do IBGE em 2010, e a fração amostral é menor que 5%, não sendo 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; BOLSAB, 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 obtidos 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\$ 3.320,00 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, sendo a amostra total desta pesquisa de 262 adultos.

3.4.1 Critérios de inclusão

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

3.4.2 Critérios de exclusão

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

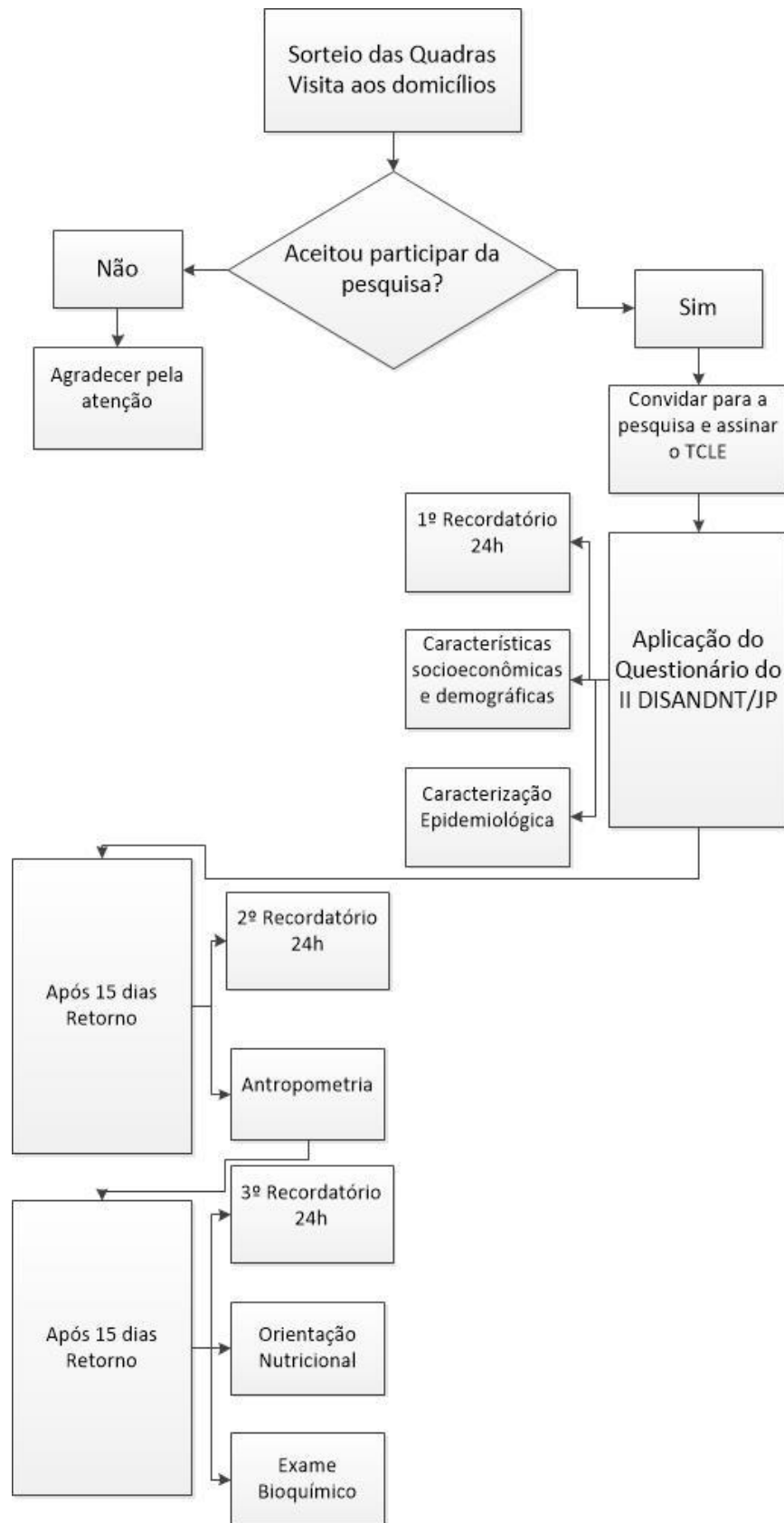
3.5 Coleta de dados

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 8.

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 do perfil de metilação do gene *ADRB3*.

Figura 8. Fluxograma da coleta de dados.



3.6 Avaliação Nutricional

As medições de peso e altura foram realizadas em triplicata, e utilizou-se a média dos três valores. Para a mensuração do peso, foi utilizada uma balança digital eletrônica, da marca PLENNA, modelo *Lumina mea* 02550, com capacidade de até 150 Kg e precisão de 100 g. Para a tomada de medidas de estatura utilizou-se uma fita métrica, não extensível de 2 m de comprimento, fixada com fita adesiva numa parede plana sem rodapé, em um lugar iluminado, que permitisse uma boa leitura. A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda os seguintes pontos de IMC de corte para classificar o estado de peso em adultos de 20 a 59 anos de idade: $<18,5 \text{ kg} / \text{m}^2$ (baixo peso), $18,5\text{-}24,9 \text{ kg} / \text{m}^2$ (eutrófico), $25,0\text{-}29,9 \text{ kg} / \text{m}^2$ (sobrepeso), $30,0\text{-}39,9 \text{ kg} / \text{m}^2$ (obesidade), e $\geq 40 \text{ kg} / \text{m}^2$ (extremamente obesos) (WHO, 2000).

O 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, eutrófico, sobrepeso e obesidade em todas as faixas etárias.

Os indicadores utilizados para determinar o estado de obesidade abdominal foram circunferência da cintura (CC), relação cintura/altura (RCA) e relação cintura/quadril (RCQ). A Associação Americana do Coração recomenda pontos de corte da circunferência da cintura para determinação da obesidade abdominal como $\geq 102 \text{ cm}$ em homens e $\geq 88 \text{ cm}$ 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).

O indicador cintura/altura tem por base o quociente das medidas da cintura e altura em centímetros. O ponto de corte utilizado foi de 0.5, respaldado por estudos realizados em todo o mundo em diversas populações como ferramenta de avaliação para identificar riscos à saúde e relação com morbidades (ASHWELL; GIBSON, 2016).

3.7 Avaliação do Consumo Alimentar

Um dos métodos de inquérito de consumo alimentar é o recordatório 24 horas (R24h). 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, sendo dois de dia de semana e um dia do final de semana. 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.

Utilizou-se 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).

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.

3.7.1 Estimativa do Consumo Habitual

No que se refere à análise do consumo alimentar para estimar o consumo habitual e corrigir a variância intrapessoal, vários métodos estatísticos estão disponíveis, lembrando que para que se possa estimar a variabilidade do consumo diário de nutriente são necessários no mínimo dois recordatórios. Nesse estudo, foi utilizado o software Método de Múltiplas Fontes (Multiple Source Method – MSM, 2012), online, elaborado pela European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC), disponível no site (<https://msm.dife.de/tps/msm/>).

3.8 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.

3.8.1 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; Levy; Fredrickson (1972). E foi realizado no Laboratório de Estudos do Treinamento Físico Aplicado ao Desempenho e a Saúde (LETFADS), do Departamento de Educação Física da Universidade Federal da Paraíba.

3.8.2 Malondialdeído (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 (Bioespectro, 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 (LETFADS), do Departamento de Educação Física da Universidade Federal da Paraíba.

3.8.3 Capacidade 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 µl de plasma foram adicionados a 3,9 ml de solução DPPH, agitado em vórtex, colocado em repouso por 30 minutos e sem 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 (LETFADS), do Departamento de Educação Física da Universidade Federal da Paraíba.

3.8.4 Homocisteína

A dosagem da concentração de homocisteína foi realizada no Laboratório Clínico Roseane Dore, a partir do método de Kuo; Cale; McDowell (1997) para aplicação em cromatografia líquida de alta eficiência (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; CALE; McDOWELL, 1997).

3.8.5 Alfa-1-glicoproteína ácida

As concentrações plasmáticas de alfa-1-glicoproteína ácida foram quantificadas por imunoturbidimetria em amostras de soro, utilizando o kit padronizado, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil). Para calibração, utilizou-se o Calibra Plus Proteína (Labtest: Ref-346). A absorbância foi obtida no analisador automático

LabMax 240 (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil) no comprimento de onda 340nm. Sendo esta análise realizada no Laboratório de Estudos do Treinamento Físico Aplicado ao Desempenho e a Saúde (LETFADS), na Universidade Federal da Paraíba.

3.8.6 Ácido Fólico

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

3.8.7 Vitamina B12

Níveis séricos de vitamina B12 foram avaliados através de imunoensaio de electroquimioluminescência. Um valor de corte de menos do que 132,0 pg/mL e 180,0 pg/mL de vitamina B12 foi feito como sugestivo de deficiência para homens e mulheres, respectivamente. As análises foram realizadas no Laboratório Clínico Roseane Dore.

3.9 Análise do nível de metilação no gene *ADRB3*

O sangue foi escolhido para a análise, pois é um tecido metabolicamente ativo, com um papel importante nas conseqüências inflamatórias e vasculares adversas da adiposidade e é amplamente utilizado para fins de diagnóstico clínico (WAHL et al., 2017). Em adição, dois estudos mostraram alterações no perfil de metilação do gene *ADRB3* em associação com perfil lipídico em tecido sanguíneo (GUAY et al., 2014; LIMA et al., 2017).

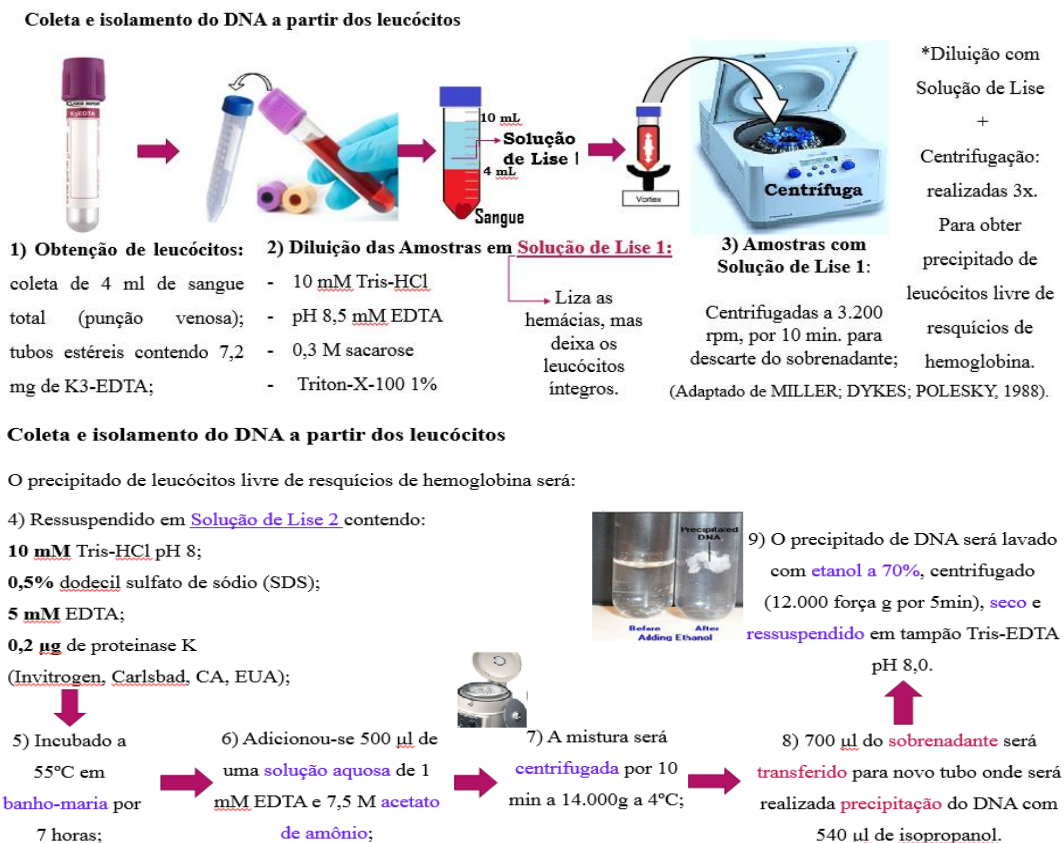
3.9.1 Obtenção da amostra e Extração de DNA a partir do sangue

A etapa inicial de extração do DNA foi realizada no Laboratório de Genética Molecular Humana do Departamento de Biologia Molecular da Universidade Federal da Paraíba (CCEN/UFPB).

Com o auxílio de um Vacutainer® com EDTA, 5 mL de sangue total foi obtido por indivíduo. As amostras foram diluídas em uma primeira solução de lise, contendo 10 mM Tris-HCl pH 8,5 mM EDTA, 0,3 M sacarose, Triton-X-100 1% afim de lisar as hemácias, deixando os leucócitos íntegros. Em seguida, foram centrifugadas à 3.200 rpm para descarte

do sobrenadante. Esse processo foi repetido diversas vezes até ser obtido um precipitado de leucócitos limpo de resquícios de hemoglobina. O precipitado foi então suspenso novamente em solução de lise contendo 10 mM Tris-HCl pH 8, 0,5% dodecil sulfato de sódio (SDS), 5 mM EDTA 0,2 µg de proteinase K (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e incubado a 55°C em banho-maria. Após 7 horas de incubação, foi adicionado 500 µl de solução aquosa de 1mM EDTA e 7,5 M acetato de amônio. A mistura foi centrifugada por 10 min a 14.000g a 4°C e 700 µl do sobrenadante foi transferido para um novo tubo, no qual foi realizada a precipitação do DNA com 540 µl de isopropanol. Em seguida, o precipitado de DNA foi lavado com 70% etanol, centrifugado (12.000g por 5 min), seco e ressuspensionado em tampão Tris-EDTA pH 8,0 (MILLER; DYKES; POLESKY, 1988), de acordo com a Figura 9. O DNA genômico foi quantificado QubitTM por fluorescência, onde os dados de DNA são quantificados com mais precisão e a análise da pureza (razão entre 260/280) foi realizada por espectrofotômetro Nanodrop® (Thermo Scientific, Califórnia, USA) e estocados à -20° até as análises.

Figura 9. Processo de coleta e isolamento do DNA a partir dos leucócitos.

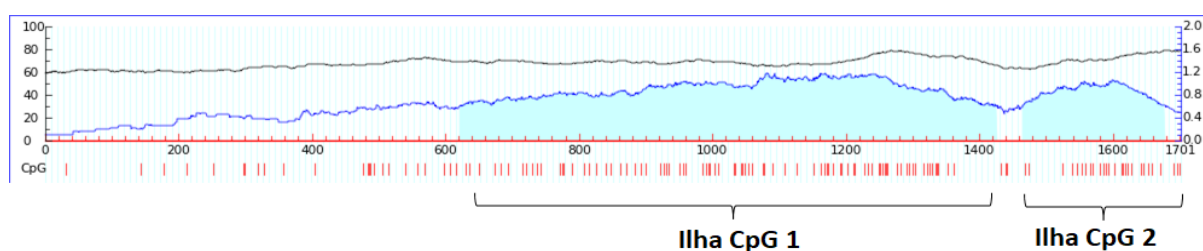


Fonte: Miller; Dykes; Polesky (1988), ilustrado por Lisbôa (2017).

3.9.2 Desenho do Primer

O primer para *ADRB3* foi obtido com o auxílio do software http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi (APÊNDICE B), a partir da sequência genômica do éxon 1 (APÊNDICE C) depositada no UCSC Genome Browser <http://genome-euro.ucsc.edu/> (chr8:37,962,991-37,966,965) (APÊNDICE D). A presença de ilhas CpG no éxon 1 foi verificada a partir do Software MethPrimer (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer2/MethPrimer.cgi>), onde observou-se a presença de duas ilhas CpG na região de interesse, sendo a região flanqueada pelo primer localizada na primeira ilha (Figura 10).

Figura 10. Sequência esquemática das ilhas CpG do éxon 1 do gene *ADRB3*. Ilha 1 compreende 806 pares de bases (+ 621 até + 1426) e a Ilha 2 compreende 214 pares de bases (+ 1465 até + 1678). Barras vermelhas verticais indicam os sítios CpG.



3.9.3. Conversão do DNA pelo bissulfito de sódio

As amostras foram submetidas à 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 amostras de DNA diluídas em RNA-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 à 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 12.000rpm para eluição do DNA purificado.

3.9.4. Níveis de Metilação

As análises de metilação foram realizadas pelo método Real Time PCR (*Applied Biosystem*). O DNA genômico convertido pelo bissulfito foi amplificado por AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (*Applied Biosystems*, California 94404, EUA) utilizando as sequências dos primers descritas no Apêndice C. O programa de PCR consistiu numa ativação enzimática inicial a 95°C durante 10 min, seguida por 50 ciclos de 45s a 95°C, 45s a 60°C e 45s a 72°C e uma extensão final a 72° C durante 10 min. A análise dos resultados foi realizada com o software PyroMark Q24 (Qiagen, Hilden, Alemanha).

3.10 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do *software* R versão 3.3.2 disponível gratuitamente em <https://www.r-project.org/>. Inicialmente foi feita a caracterização da amostra por meio da estatística descritiva representada pela frequência simples, utilizando-se medidas de posição como tendência central e de dispersão. Adicionalmente foram procedidos testes de Análise de Variância (ANOVA) para verificar se havia diferença média entre o IMC em que os indivíduos foram classificados, para todas as variáveis quantitativas do estudo.

Para identificar a existência de relação no que diz respeito aos níveis de metilação do gene *ADRB3* e as variáveis do presente estudo, foram propostos os seguintes modelo de regressão linear múltipla:

Modelo 1:

$$\text{Níveis de metilação} = \beta_0 + \beta_1 * \text{Colesterol total} + \beta_2 * \text{LDL} + \beta_3 * \text{HDL} + \beta_4 * \text{Triglicerídeos} + \beta_5 * \text{Homocisteína} + \beta_6 * \text{CAT} + \beta_7 * \text{MDA} + \beta_8 * \text{Alfa-1-glicoproteína} + \beta_9 * \text{Ácido fólico} + \beta_{10} * \text{Vitamina B12}.$$

Modelo 2:

Níveis de metilação = $\beta_0 + \beta_1 \cdot \text{Calorias} + \beta_2 \cdot \text{Lipídeos} + \beta_3 \cdot \text{Folato} + \beta_4 \cdot \text{Vitamina B12} + \beta_5 \cdot \text{Gorduras monoinsaturadas} + \beta_6 \cdot \text{Oléico} + \beta_7 \cdot \text{Ômega 3} + \beta_8 \cdot \text{Ômega 6} + \beta_9 \cdot \text{Gorduras saturadas} + \beta_{10} \cdot \text{Colesterol} + \beta_{11} \cdot \text{Gorduras poli-insaturadas} + \beta_{12} \cdot \text{Gorduras trans}$.

O nível de significância adotado foi de 5%.

REFERÊNCIAS

- ABESO. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica. **Mapa da Obesidade**. Disponível em: <abeso.org.br/atitude-saudavel/mapa-obesidade>. Acesso em: julho, 2016.
- ALBERGHINI, F. et al. An epigenetic view of B-cell disorders. **Immunology and Cell Biology**, v. 93, n. 3, p. 253–260, 2015.
- ALI, O. et al. Methylation of *SOCS3* is inversely associated with metabolic syndrome in an epigenome-wide association study of obesity. **Epigenetics**, v. 11, n. 9, p. 699–707, 2016.
- ASCIUTTI, L. S. R. et al. **Manual de porções média em tamanho real baseado no programa Dietsys para estudo de base populacional**. Universidade Federal da Paraíba, 2005.
- ASHWELL, M.; GIBSON, S. Waist-to-height ratio as an indicator of ‘early health risk’: simpler and more predictive than using a ‘matrix’ based on BMI and waist circumference. **BMJ Open**, v. 6, p. 1-7, 2016.
- ASLIBEKYAN, S. et al. DNA Methylation Patterns Are Associated with n–3 Fatty Acid Intake in Yup’ik People. **Journal of Nutrition**, v. 144, n. 4, p. 425-430, 2014.
- BOLLATI, V. et al. Nutrients Intake Is Associated with DNA Methylation of Candidate Inflammatory Genes in a Population of Obese Subjects. **Nutrients**, v. 6, n. 10, p. 4625-4639, 2014.
- BRAY, G.A. et al. Management of obesity. **The Lancet**, v. 387, n. 10031, p. 1947-1956, 2016.
- BOLFARINE, H.; BOLSAB, W. O. Elementos de amostragem. São Paulo: **Edgard Blucher**; 2005. 269p.
- BURDGE, G.C.; HOILE, S.P.; LILLYCROP, K.A. Epigenetics: are there implications for personalised nutrition? **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 15, n. 5, p. 442–447, 2012.
- CAMPS, J. et al. Paraoxonases, mitochondrial dysfunction and non-communicable diseases. **Chemical Biological Interactions**, v. 259, p. 382-387, 2016.

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

CHENG, J.; XU, X. Diet, epigenetic, and cancer prevention. **Advances in Genetics**, v. 71, p. 237–255, 2010.

CHOI, S. et al. Nutritional epigenomics: a portal to disease prevention. **Advances in Nutrition**, v. 4, n. 5, p. 530–532, 2013.

COCHRAN, W. G. **Sampling Techniques**. Editora Walter A. Shewhart. New York, 1953.

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

CRIDER, K.S. et al. Folate and DNA methylation: a review of molecular mechanisms and the evidence for folate's role. **Advances in Nutrition**, v. 3, n. 1, p. 21–38, 2012.

CYPESS, A.M. et al. Activation of human brown adipose tissue by a b3-adrenergic receptor agonist. **Cell Metabolism**, v. 21, n. 1, p. 33–38, 2015.

DAY, S.E. et al. Next-generation sequencing methylation profiling of subjects with obesity identifies novel gene changes. **Clinical Epigenetics**, v. 8, p. 77, 2016.

DEKKERS, K.F. et al. The multifaceted interplay between lipids and epigenetics. **Current Opinion in Lipidology**, v.27, n.3, p. 288-294, 2016.

DE LA ROCHA, C. et al. Associations between whole peripheral blood fatty acids and DNA methylation in humans. **Scientific Reports**, v. 6, p. 258-267, 2016.

DEMETRIOU, C.A. et al. Biological embedding of early-life exposures and disease risk in humans: a role for DNA methylation. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 45, n. 3, p. 303-332, 2015.

DIAS, M.M. et al. 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.

EGGERMANN, T. et al. Congenital imprinting disorders: EUCID.net — a network to decipher their aetiology and to improve the diagnostic and clinical care. **Clinical Epigenetics**, v. 7, p. 23, 2015.

EHRLICH, A.C.; FRIEDENBERG, F.K. Genetic Associations of Obesity: The Fat-Mass and Obesity-Associated (FTO) Gene. **Clinical and Translational Gastroenterology**, v. 7, p. 140, 2016.

ELIA, L.; CONDORELLI, G. RNA (Epi)genetics in cardiovascular diseases. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 89, p. 11–16, 2015.

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

FLEGAL, K.M. et al. Trends in Obesity Among Adults in the United States, 2005 to 2014. **Journal of American Medical Association**, v. 315, n. 21, p. 2284-2291, 2016.

FLORES-SIERRA, J. et al. The trans fatty acid elaidate affects the global DNA methylation profile of cultured cells and in vivo. **Lipids in Health and Disease**, v. 15, p. 75, 2016.

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.

GALI RAMAMOORTHY, T. et al. Developmental programming of hypothalamic neuronal circuits: impact on energy balance control. **Front Neuroscience**, v. 9, p. 126, 2015.

GERAGHTY, A.A. et al. Nutrition During Pregnancy Impacts Offspring's Epigenetic Status—Evidence from Human and Animal Studies. **Nutrition and Metabolic Insights**, v. 8, n.1, p. 41–47, 2015.

GRUNDY, S.M. et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome. **Circulation**, v. 112, p. 285 – 290, 2005.

GUAY, S.P. et al. 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.

GUAY, S.P. et al. Epigenome-wide analysis in familial hypercholesterolemia identified new loci associated with high-density lipoprotein cholesterol concentration. **Epigenomics**, v. 4, n. 6, p. 623-639, 2012.

HAGGARTY, P. Genetic and metabolic determinants of human epigenetic variation. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 18, p. 334-338, 2015.

HOUDE, A.A. et al. 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, p. 29, 2015.

HUIDOBRO, C.; FERNANDEZ, A.F.; FRAGA, M.F. The role of genetics in the establishment and maintenance of the epigenome. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, n. 9, p. 1543–1573, 2013.

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

JANESICK, A.S.; SHIODA, T.; BLUMBERG, B. Transgenerational inheritance of prenatal obesogen exposure. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 398, p. 31–35, 2014.

JELTSCH, A.; JURKOWSKA, R.Z. New concepts in DNA methylation. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 39, n. 7, p. 310–318, 2014.

JENAB, M. et al. Biomarkers in nutritional epidemiology: applications, needs and new horizons. **Human Genetics**, v. 125, p. 507–525, 2009.

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

KANDI, V.; VADAKEDATH, S. Effect of DNA Methylation in Various Diseases and the Probable Protective Role of Nutrition: A Mini-Review. **Cureus**, v. 7, n. 8, p. 309, 2015.

KAUSHIK, P.; ANDERSON, J.T. Obesity and epigenetics. **Biomolecular Concepts**, v.7, n. 3, p. 145–155, 2016.

KOK, D.E. et al. The effects of long-term daily folic acid and vitamin B12 supplementation on genome-wide DNA methylation in elderly subjects. **Clinical Epigenetics**, v. 7, p. 121, 2015.

KRISTANC, L.; KREFT, S. European medicinal and edible plants associated with subacute and chronic toxicity part I: plants with carcinogenic, teratogenic and endocrine-disrupting effects. **Food and Chemical Toxicology**, v. 92, p. 150-164, 2016.

KUO, K.; CALE, S.; McDOWELL, I. Standardization (External and Internal) of HPLC Assay for Plasma Homocysteine. **Clinical Chemistry**, v. 43, n. 9, p. 1653-5, 1997.

KURYLOWICZ, A. et al. 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, p. 31, 2015.

LEOŃSKA-DUNIEC, A.; AHMETOV, I.I.; ZMIJEWSKI, P. Genetic variants influencing effectiveness of exercise training programmes in obesity – an overview of human studies. **Biology of Sport**, v. 33, n. 3, p. 207–214, 2016.

LIM, W.Y. et al. Maternal blood pressure during pregnancy and early childhood blood pressures in the offspring: the GUSTO birth cohort study. **Medicine**, v. 94, n. 45, p. 1981, 2015.

LIMA, F. E. L. et al. 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, R.P.A. 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. **Clinical Epigenetics**, v. 9, p. 110, 2017.

LISBÔA, J. V. C. **Influência do polimorfismo C677T no gene da MTHFR relacionado à suplementação de uma dieta com folato nos status inflamatórios de mulheres obesas e com sobrepeso**. 2017. 112f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Nutrição) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017.

LIU, J. et al. Study on relationship between Trp64Arg polymorphism of β 3-adrenergic receptor gene and obesity and blood lipids. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**, v. 95, n. 20, p. 1558-62, 2015.

LOPES, H.F. et al. Visceral adiposity syndrome. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 8, p. 40, 2016.

MADDOCKS, O.D.K. et al. Serine Metabolism Supports the Methionine Cycle and DNA/RNA Methylation through De Novo ATP Synthesis in Cancer Cells, **Molecular Cell**, v. 61, n. 2, p. 210-221, 2016.

MARTINEZ, J. et al. Epigenetics in adipose tissue, obesity, weight loss, and diabetes. **Advances in Nutrition**, v. 5, n. 1, p. 71–81, 2014.

MARTINO, F. et al. Epigenetics and cardiovascular risk in childhood. **Journal of Cardiovascular Medicine**, v. 17, n. 8, p. 539–546, 2016.

MENTCH, S.J.; LOCASALE, J.W. One-carbon metabolism and epigenetics: understanding the specificity. **Annals of The New York Academy of Sciences**, v. 1363, p. 91-98, 2016.

MENTCH, S.J. et al. Histone Methylation Dynamics and Gene Regulation Occur through the Sensing of One-Carbon Metabolism. **Cell Metabolism**, v. 22, n. 5, p. 861-873, 2015.

MI, Y.J. et al. Prevalence and Secular Trends in Obesity Among Chinese Adults, 1991-2011. **American Journal of Preventive Medicine**, v. 49, n. 5, p. 661-669, 2015.

MILAGRO, F.I. et al. Dietary factors, epigenetic modifications and obesity outcomes: progresses and perspectives. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 34, n. 4, p. 782–812, 2013.

MILL, J.; HEIJMANS, B.T. From promises to practical strategies in epigenetic epidemiology. **Nature Reviews Genetics**, v. 14, n. 8, p. 585–94, 2013.

MILLER, S.A.; DYKES, D.D; POLESKY, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 3, p. 1215, 1988.

MSM. The Multiple Source Method. **Departament os Epidemiology of the German Institute of Human Nutrition Potsdam – Rehbrücke**, 2012. Disponível em: <msm.dife.de/tps/msm>. Acesso em: julho, 2016.

MUND, R.A.; FRISHMAN, W.H. Brown adipose tissue thermogenesis: b3-adrenoreceptors as a potential target for the treatment of obesity in humans. **Cardiology in Review**, v.21, n. 6, p. 265–269, 2013.

NIELSEN, D.E.; EL-SOHEMY, A. A randomized trial of genetic information for personalized nutrition. **Genes & Nutrition**, v. 7, n. 4, p. 559–566, 2012.

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.

PENGPID, S.; PELTZER, K. Associations between behavioural risk factors and overweight and obesity among adults in population-based samples from 31 countries. **Obesity Research & Clinical Practice**, v. 11, n. 2, p. 158-166, 2017.

RAE, W. Indications to Epigenetic Dysfunction in the Pathogenesis of Common Variable Immunodeficiency. **Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis**, v.1, p. 1-10, 2016.

REMELY, M. et al. Therapeutic perspectives of epigenetically active nutrientes. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 11, p. 2756–2768, 2015.

RODRÍGUEZ-GALLEGO, E. et al. Mapping of the circulating metabolome reveals α -ketoglutarate as a predictor of morbid obesity-associated non-alcoholic fatty liver disease. **International Journal of Obesity**, v. 39, n. 2, p. 279-287, 2015.

SARGENT, J. Obesity: obesity turns the hepatic epigenetic clock forward. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 11, n. 1, p. 2, 2015.

SHORTHER, 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. 118, 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 2016.

TAYLOR, A.W. et al. The Use of a Chronic Disease and Risk Factor Surveillance System to Determine the Age, Period and Cohort Effects on the Prevalence of Obesity and Diabetes in South Australian Adults -2003–2013, **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, e0125233, 2015.

THORNBURG, K.L. The programming of cardiovascular disease. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 6, n. 5, p. 366-376, 2015.

VAN DIJK, S.J. et al. Epigenetics and human obesity. **International Journal of Obesity**, v. 39, n. 1, p. 85–97, 2015a.

VAN DIJK, S.J. et al. Recent developments on the role of epigenetics in obesity and metabolic disease. **Clinical Epigenetics**, v. 7, p. 66, 2015b.

VEL SZIC, K.Z. et al. From inflammaging to healthy aging by dietary lifestyle choices: is epigenetics the key to personalized nutrition? **Clinical Epigenetics**, v. 7, p. 33, 2015.

WAHL, S. et al. Epigenome-wide association study of body mass index, and the adverse outcomes of adiposity. **Nature**, v. 541, n. 7635, p. 81-86, 2017.

WHARTON, S. Current perspectives on long-term obesity pharmacotherapy. **Canadian Journal of Diabetes**, v. 40, n. 2, p. 184-191, 2016.

WHAYNE, T.F. Epigenetics in the development, modification, and prevention of cardiovascular disease. **Molecular Biology Reports**, v. 42, n. 4, p. 765–776, 2015.

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

WHO. World Health Organization. **International guide for monitoring alcohol consumption and related harm**. Geneva: WHO, 2000.

WHO. World Health Organization. **Obesity and overweight**. Fact sheet 2016. Disponível em: <www.who.int/mediacentre/factsheets/>. Acesso em julho 2016.

WU, G.; IMHOFF-KUNSCH, B.; GIRARD, A.W. Biological mechanisms for nutritional regulation of maternal health and fetal development. **Paediatric and Perinatal Epidemiology**, v. 26, n. 1, p. 4–26, 2012.

XU, W. et al. Prevalence of Overweight and Obesity among Chinese Adults: Role of Adiposity Indicators and Age. **Obesity Facts**, v. 9, n. 1, p. 17–28, 2016.

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.

YU, B. et al. DNA methylome and transcriptome sequencing in human ovarian granulosa cells links age-related changes in gene expression to gene body methylation and 3'-end GC density. **Oncotarget**, v. 6, n. 6, p. 3627–43, 2015.

ZHANG, P. et al. Prevalence of Central Obesity among Adults with Normal BMI and Its Association with Metabolic Diseases in Northeast China. **PLoS ONE**, v. 11, n. 7, e0160402, 2016.

ZHANG, Y.; REN, J. Epigenetics and obesity cardiomyopathy: From pathophysiology to prevention and management. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 161, p. 52–66, 2016.

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

APÊNDICE

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências da Saúde
Núcleo Interdisciplinar de Estudos em Saúde e Nutrição
Programa de Pós-Graduação em Ciências da 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 (criança, adolescente, adulto e idoso) à tomada de medidas de peso, altura, circunferência e dobras cutâneas, para avaliação nutricional
- ☐ Coleta de sangue, de adultos e idosos para análise bioquímica de Hemograma Completo, Glicemia, Vitamina A e E, Vitamina B12, Ácido Fólico, PCR, Glicemia, Alfa 1 – glicoproteína ácida, Homocisteína, Malondialdeído, ROS, Interleucinas e epigenética.
- ☐ Responder informações sobre higiene dentária;
- ☐ Responder informações sobre armazenamento de alimentos.

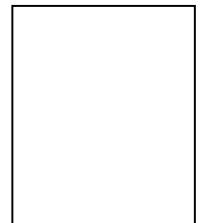
Destacamos neste termo que:

- 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 B – SOFTWARE PARA O DESENHO DO PRIMER

Primer3: WWW primer tool		disclaimer	bugs? suggestions?	Questions?
pick primers from a DNA sequence		cautions		
Paste source sequence below (5'→3', string of ACGTNacgtm -- other letters treated as N -- numbers and blanks ignored). FASTA format ok. Please N-out undesirable sequence (vector, ALUs, LINEs, etc.) or use a Mispriming Library (repeat library) : NONE				
☒ Pick left primer or use left primer below:		☐ Pick hybridization probe (internal oligo) or use oligo below:		☒ Pick right primer or use right primer below (5'→3' on opposite strand):
Pick Primers Reset Form				
Sequence Id:		A string to identify your output.		
Targets:		E.g. 50,2 requires primers to surround the 2 bases at positions 50 and 51. Or mark the source sequence with [and]: e.g. ...ATCT[CCCC]TCAT.. means that primers must flank the central CCCC.		
Excluded Regions:		E.g. 401,7 68,3 forbids selection of primers in the 7 bases starting at 401 and the 3 bases at 68. Or mark the source sequence with < and >: e.g. ...ATCT<CCCC>TCAT.. forbids primers in the central CCCC.		
Product Size Min:	100	Opt:	200	Max:
			1000	
Number To Return:	5	Max 3' Stability:	9.0	
Max Mispriming:	12.00	Pair Max Mispriming:	24.00	
Pick Primers Reset Form				
General Primer Picking Conditions				
Primer Size Min:	18	Opt:	20	Max:
			27	
Primer Tm Min:	57.0	Opt:	60.0	Max:
			63.0	Max Tm Difference:
Product Tm Min:		Opt:		Max:
Primer GC% Min:	20.0	Opt:		Max:
			80.0	
Max Self Complementarity:	8.00	Max 3' Self Complementarity:	3.00	

APÊNDICE C – SEQUÊNCIA EXON 1 DO GENE *ADRB3*

ADRB3 – HUMAN

EXON 1

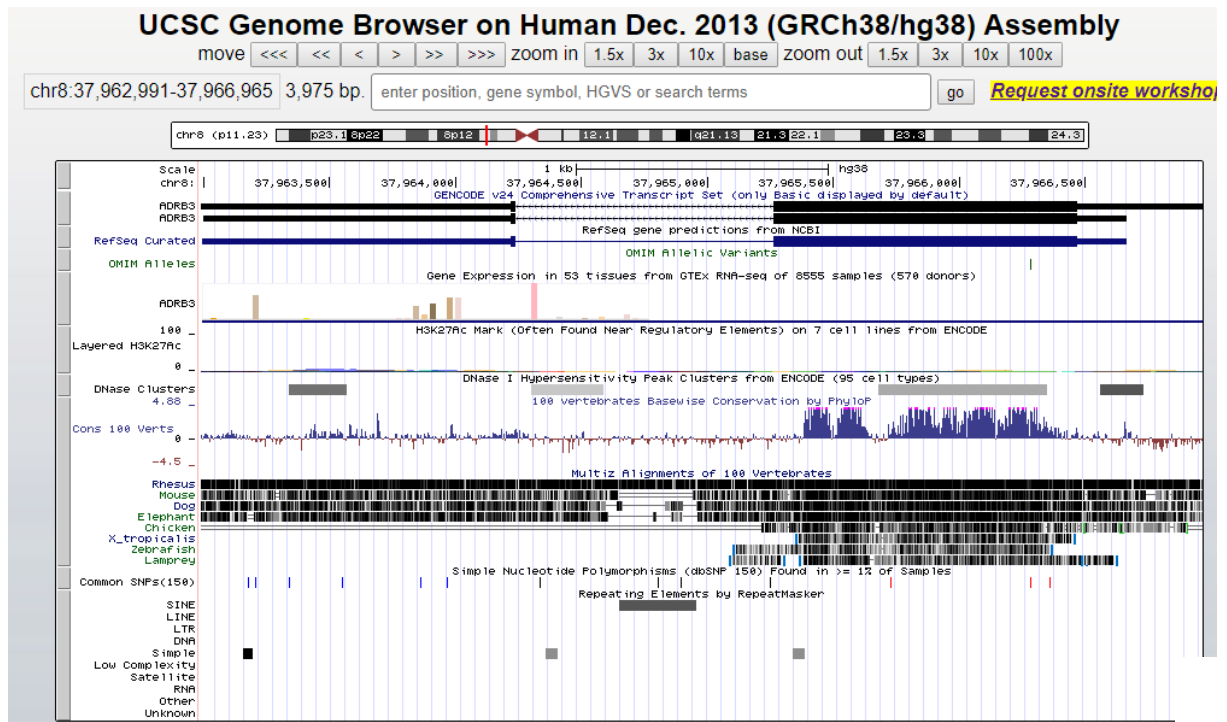
CTCTGATACATAAAGGGTGGGGATGGGAGCGCTCTCCTCTCTCCTTCCCCTGCCTT
GCTGTGGGAACCTTCTGGGAAAGGAGGTGCAGGGCTCCAGGAAGCCAGTGCCCAG
GGAGTGCTATGCTGAGTCCAGGAGCCTGGCCACGGCAGGGGTGGACAGATGGTG
GCAGAGGAACCACGGTGTCCCTTCTCCAGATTTAGCTAAAGGAAACGTGGAGC
ATCCCATTTGGCCATCCTCCCCACTCTCCAATTCGGCTCCAGAGGCCCTCCAGACT
ATAGGCAGCTGCCCCCTTTAAGCGTCGCTACTCCTCCCCCAAGAGCGGTGGCACCG
AGGGAGTTGGGGTGGGGGGAGGCTGAGCGCTCTGGCTGGGACAGCTAGAGAAGA
TGGCCCAGGCTGGGGAAGTCGCTCTCATGCCTTGCTGTCCCCTCCCCTGAGCCAG
GTGATTTGGGAGACCCCCCTCCTTCTTTCCCTACCGCCCCACGCGCGACCCGG
GGATGGCTCCGTGGCCTCACGAGAACAGCTCTCTTGCCCCATGGCCGGACCTCCC
CACCCTGGCGCCCAATACCGCCAACACCAGTGGGCTGCCAGGGGTTCGGTGGGA
GGCGGCCCTAGCCGGGGGCCCTGCTGGCGCTGGCGGTGCTGGCCACCGTGGGAGG
CAACCTGCTGGTCATCGTGGCCATCGCCTGGACTCCGAGACTCCAGACCATGACC
AACGTGTTTCGTGACTTCGCTGGCCGCAGCCGACCTGGTGATGGGACTCCTGGTGG
TGCCGCCGGCGGCCACCTTGGCGCTGACTGGCCACTGGCCGTTGGGCGCCACTGG
CTGCGAGCTGTGGACCTCGGTGGACGTGCTGTGTGTGACCGCCAGCATCGAAACC
CTGTGCGCCCTGGCCGTGGACCGCTACCTGGCTGTGACCAACCCGCTGCGTTACG
GCGCACTGGTCACCAAGCGCTGCGCCCCGACAGCTGTGGTCCTGGTGTGGGTCTGT
GTCGGCCGCGGTGTCGTTTTCGCGCCCATCATGAGCCAGTGGTGGCGCGTAGGGGCC
GACGCCGAGGCGCAGCGCTGCCACTCCAACCCGCGCTGCTGTGCCTTCGCCTCCA
ACATGCCCTACGTGCTGCTGTCTCCTCCTCCGTCTCCTTCTACCTTCCTCTTCTCGTGA
TGCTCTTCGTCTACGCGCGGGTTTTTCGTGGTGGCTACGCGCCAGCTGCGCTTGCTG
CGCGGGGAGCTGGGCCGCTTTCCGCCCCGAGGAGTCTCCGCCGGCGCCGTGCGGCT
CTCTGGCCCCGGCCCCGGTGGGGACGTGCGCTCCGCCCGAAGGGGTGCCCGCCTG
CGGCCGGCGGCCCGCGCGCCTCCTGCCTCTCCGGGAACACCGGGCCCTGTGCACC
TTGGGTCTCATCATGGGCACCTTCACTCTCTGCTGGTTGCCCTTCTTTCTGGCCAA
CGTGCTGCGCGCCCTGGGGGGCCCTCTCTAGTCCCGGGCCCGGCTTTCCTTGCCC
TGAAGTGGCTAGGTTATGCCAATTCTGCCTTCAACCCGCTCATCTACTGCCGCAGC
CCGACTTTCGCAGCGCCTTCCGCCGTCTTCTGTGCCGCTGCGGCCGTGCGCTGCC
TCCGGAGCCCTGCGCCGCCGCCGCCGCCGCCCTCTTCCCCTCGGGCGTTCTGCG
GCCCGGAGCAGCCAGCGCAGCCAGGCTTTGCCAACGGCTCGACGG

Desenho Final dos Primers

Primer Forward - 5' CCTTCCTTCTTTCCCTACCG 3'

Primer Reverse - 5' TGGTCTGGAGTCTCGGAGTC3'

APÊNDICE D – UCSC GENOME BROWSER



ANEXOS

ANEXO A - CERTIDÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

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.


Dr.ª Eliane Magalhães
Coordenadora do CEP/CCS/UFPB
Mat. SIAPE: 0332618

ANEXO B – IDENTIFICAÇÃO DO DISTRITO, NÚMERO DO CASO E USF

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. Dr. Alcides da Silva Diniz
Prof.^a Dr.^a Darlene Camati Persuhn
Prof.^a Dr.^a Flávia Emília Leite de Lima
Prof. Dr. Alexandre Silva
Prof. Dr. João Andrade da Silva
Prof.^a Dr.^a Luiza Sonia Rios Asciuti
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.^aDr.^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 _____ DS: _____ USF: _____ Data da entrevista: ____/____/____

Nome do Agente Comunitário de Saúde (ACS): _____

Responsável pelas informações: _____

Endereço da família: Rua: _____ nº _____

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

EQUIPE RESPONSÁVEL: _____

ANEXO C – CARACTERIZAÇÃO SÓCIO-ECONOMICA 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: _____ DS: _____ USF: _____

Nº	Nome	Grau de Parentesco (*)	Data de nascimento	Idade	Gênero 1 - M 2 - F	Escolaridade (anos de estudo)	Nível de escolaridade (ver legenda)	Renda per capita (em R\$)	Bens de consumo da família (assinalar e a quantidade)	Observações
1	Responsável/respondente:								☐ Aparelho de som/rádio ☐ Aparelho de televisão ☐ Videocassete ☐ DVD ☐ Microcomputador de mesa ☐ Microcomputador portátil (notebook) ☐ Automóvel ☐ Geladeira ☐ Freezer ☐ Máquina de lavar roupa ☐ Máquina de lavar louça ☐ Aspirador de pó ☐ Forno de microondas ☐ Telefone celular ☐ Telefone fixo ☐ Máquina fotográfica digital ☐ Aparelho de ar-condicionado Outros: ☐ _____ ☐ _____ ☐ _____	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										
								Renda familiar:		

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

ANEXO D – CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA

2. CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DAS FAMÍLIAS:

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

Caso N°:_____ **DS:**___ **USF:**_____

[illegible]

ANEXO E – AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA**NO CASO DE ADULTOS (20 a 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 – FICHA DE ENCAMINHAMENTO PARA COLETA DE SANGUE

FICHA DE ENCAMINHAMENTO PARA COLETA DE SANGUE:

Caso Nº: _____ DS: _____ USF: _____

Exames só para todos os Adultos e Idosos:

Hemograma Completo, Glicemia, Vitamina A e E, Vitamina B12, Ácido Fólico, PCR – hus, Glicemia, Alfa 1 – glicoproteína ácida.

Só para Adultos: Homocisteína, Malondialdeído, CAT e Interleucinas

DATA: ____/____/____

Nº	Nome:

Nome do Agente Comunitário de Saúde (ACS): _____

Unidade Básica de Saúde da Família: _____

Origem: UFPB. ESTUDO: SEGUNDO CICLO DE DIAGNÓSTICO E INTERVENÇÃO DA SITUAÇÃO ALIMENTAR, NUTRICIONAL E DE DOENÇAS NÃO-TRANSMISSÍVEIS MAIS PREVALENTES DA POPULAÇÃO DO MUNICÍPIO DE JOÃO PESSOA/PB

.....

ARTIGO

Diminuição dos níveis de metilação do DNA no gene *ADRB3* em leucócitos está relacionada com valores séricos de ácido fólico em adultos eutróficos

TITULO DA REVISTA: Journal of Translational Medicine

ÁREA: Nutrição

QUALIS: A1

ISSN: 1479-5876

FATOR DE IMPACTO: 3.786

ARTIGO

Diminuição dos níveis de metilação do DNA no gene *ADRB3* em leucócitos está relacionada com valores séricos de ácido fólico em adultos eutróficos

Yohanna de Oliveira^{1*}, Raquel Patrícia Ataíde Lima¹, Rafaella Cristhine Pordeus Luna¹, Mussara Gomes Cavalcanti Alves Monteiro¹, Cássia Surama Oliveira da Silva¹, Rayner Anderson Ferreira do Nascimento², Keylla Querino de Farias Lima¹, Flávia Emília Leite de Lima Ferreira¹, Rodrigo Pinheiro de Toledo Vianna¹, Ronei Marcos de Moraes³, Naila Francis Paulo de Oliveira⁴, Aléssio Tony Cavalcanti de Almeida⁵, Alexandre Sérgio Silva¹, Alcides da Silva Diniz⁶, Maria José de Carvalho Costa¹ e Maria da Conceição Rodrigues Gonçalves¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Nutrição, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil.

² Programa de Pós Graduação em Biologia Molecular e Humana, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil.

³ Programa de Pós Graduação em Modelos de Decisão em Saúde, Departamento de Estatística, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil.

⁴ Programa de Pós Graduação em Odontologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil.

⁵ Programa de Pós Graduação em Economia Aplicada, Departamento de Economia, Centro de Ciências Sociais Aplicadas, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil.

⁶ Programa de Pós Graduação em Ciências da Nutrição, Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

* Endereço do autor correspondente: yoh_0806@hotmail.com; Tel./Fax: +55-83-3216-7417.

Resumo

Introdução A metilação do DNA tem sido evidenciada como um mecanismo epigenético potencial relacionado com diversos genes candidatos ao desenvolvimento da obesidade. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar os níveis de metilação do DNA no gene *ADRB3* por índice de massa corporal (IMC) em uma população representativa de adultos, além de caracterizar essa população quanto ao perfil lipídico, estresse oxidativo e consumo alimentar. **Métodos** Este foi um estudo transversal de base populacional, envolvendo 262 adultos com idades entre 20 a 59 anos, de ambos os sexos, representativo das zonas leste e oeste do município de João Pessoa/PB, no qual foram avaliadas variáveis de estilo de vida e realizadas a avaliação nutricional, análises bioquímicas e dos níveis de metilação do DNA no gene *ADRB3* utilizando o método PCR em tempo real. As relações entre as variáveis do estudo foram realizadas utilizando a análise de variância (ANOVA) e modelos de regressão múltipla. Todos os resultados foram obtidos utilizando o *software* R versão 3.3.2. **Resultados** A partir da estratificação de categorias de IMC, observou-se diferença em média nos valores das variáveis idade, relação cintura/altura (RCA), relação cintura/quadril (RCQ), circunferência da cintura (CC), triglicerídeos e consumo de gordura trans, que ocorreram mais entre as categorias “eutrofia” e “obesidade”. A partir da análise de regressão múltipla no grupo de adultos eutróficos, observou-se que ocorreu relação negativa entre os níveis de metilação do gene *ADRB3* com valores séricos de ácido fólico. No entanto, não observou-se relação entre perfil lipídico, estresse oxidativo e consumo alimentar nos indivíduos distribuídos nas 3 categorias de IMC. **Conclusões** Foi demonstrada uma relação negativa dos níveis de metilação do gene *ADRB3* nos indivíduos adultos eutróficos com valores séricos de ácido fólico, bem como com o gênero independente de IMC, no entanto, não observou-se relação com perfil lipídico, estresse oxidativo e variáveis de consumo alimentar. Quanto à ausência de relação dos níveis de metilação do gene *ADRB3* nas categorias de sobrepeso e obesidade leve e moderada, provavelmente a resposta está na quantidade insuficiente de gordura corporal para iniciar os processos inflamatórios e de estresse oxidativo com impacto direto nos níveis de metilação, que diferentemente encontra-se na maioria das vezes em níveis exacerbados na obesidade grave.

Palavras-chave: *ADRB3*, Metilação do DNA, Índice de massa corporal, Ácido fólico.

1. Introdução

A obesidade é considerada um grave problema de saúde pública, afetando 39% da população mundial [1]. A projeção epidêmica é que, em 2025, mais de 2 bilhões de adultos estejam acima do peso ou obesos [2].

Múltiplos determinantes biológicos, comportamentais, genéticos e epigenéticos são contribuintes para a etiologia multifatorial da obesidade, como por exemplo, distúrbios do sono, potenciais traços de comportamento obesogênico, caracterizado pelo consumo excessivo de calorias e estilo de vida sedentário, regulação central do balanço energético, biologia do tecido adiposo e músculo esquelético, além de alterações na microbiota intestinal, sinalização hormonal, fatores reprodutivos, uso de drogas e os efeitos intergeracionais intra-uterinos [3].

Evidências crescentes indicam que os mecanismos epigenéticos no tecido adiposo podem estar envolvidos na patogênese de distúrbios metabólicos, armazenamento de gordura, remodelação celular e adipogênese, ressaltando o envolvimento da metilação do DNA na diferenciação de adipócitos e seu efeito na expressão de diversos genes relacionados à obesidade [4].

A metilação do DNA é a marca epigenética mais frequente e bem caracterizada, por exercer um papel chave na regulação da expressão gênica e no fenótipo molecular, sem alterar a sequência do DNA, podendo ser alterada por exposições ambientais e influências genéticas [5]. Em adição, o folato é uma vitamina B solúvel em água que desempenha um papel importante como doador de grupos metil necessários para a regulação epigenética adequada [6].

Outra complexidade relacionada ao estudo da obesidade é a marca da heterogeneidade dos indivíduos obesos, através das diferenças notáveis na configuração corporal e na acumulação regional de gordura corporal nos níveis de adiposidade, como a obesidade subcutânea, em que o excesso de gordura subcutânea é encontrado em torno das áreas do quadril e coxa e a obesidade visceral, na qual a gordura é concentrada na região abdominal, principalmente no tecido adiposo mesentérico. A obesidade visceral, também conhecida como o excesso de tecido adiposo visceral (TAV), tende a ser mais prejudicial em termos de saúde, sendo um potencial fator de risco cardiovascular [7].

Recentemente, foi demonstrado que a modificação nos níveis de metilação de genes candidatos ao desenvolvimento da obesidade apresentaram uma relação excelente na estratificação de indivíduos obesos e não-obesos, sugerindo assim que os níveis de metilação do DNA no sangue possui um grande potencial para caracterizar o fenótipo da obesidade por identificar uma variação epigenética robusta e biologicamente relevante relacionada ao índice de massa corporal (IMC), utilizando um material biológico minimamente invasivo ao invés do tecido adiposo [8].

Interessantemente, o gene do receptor adrenérgico $\beta 3$ (*ADRB3*) está localizado no cromossomo 8, possui 2.252 pares de base e dois éxons e desempenha um papel importante na regulação da lipólise no tecido adiposo branco e marrom que proporcionam ácidos graxos livres para a termogênese, indicando a participação do gene *ADRB3* na regulação do peso corporal em humanos [9]. No entanto, o papel da metilação do DNA no gene *ADRB3* relacionado ao aumento da susceptibilidade à obesidade visceral e alteração da distribuição da gordura corporal ainda não foi totalmente elucidado.

Nesse contexto, o presente estudo tem como objetivo avaliar os níveis de metilação do DNA no gene *ADRB3* por IMC em uma população representativa de adultos, além de caracterizar essa população quanto ao perfil lipídico, estresse oxidativo e consumo alimentar.

2. Métodos

2.1. Caracterização do Estudo

Trata-se de um estudo de caráter transversal, vinculado a uma pesquisa de base populacional intitulada “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), que foi conduzida no período de maio de 2015 a março de 2016.

2.2. Questões éticas

O protocolo de pesquisa do projeto mencionado anteriormente, ao qual está vinculado o presente estudo, 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.

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).

2.3 Amostragem

Para realização deste estudo inédito de base populacional, representativo 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 e dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) [10].

Para o cálculo da casuística, foi utilizado um procedimento amostral único, composto em níveis. Devido à presença da heterogeneidade sobre a variável "renda" e a relação existente entre renda, prevalência de doenças e nutrição [11], utilizou-se uma amostragem estratificada [12] 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 [10].

Após a estratificação calculou-se o tamanho da amostra, ou seja, o número de quadras representativas por zona. Posteriormente a obtenção do tamanho da amostra, foi calculado o peso de cada estrato, quando obteve-se o número de quadras por zona de acordo com seu estrato. Para obter o peso de cada estrato utilizou-se a fórmula segundo Silva, Moraes e Costa [13].

Considerando que a média da renda dos indivíduos adultos das zonas leste e oeste que 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, 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, sendo a amostra total deste estudo de 262 adultos distribuídos nas zonas estudadas no presente estudo.

O presente estudo teve como critérios de inclusão: Indivíduos de faixas etárias entre 20 – 59 anos, diferentes condições socioeconômicas e usuários ou não de medicamentos, com exceção dos medicamentos abaixo descritos. Para os critérios de exclusão considerou-se: Indivíduos com distúrbios neuropsiquiátricos; usuários de suplemento de polivitamínicos, minerais, anorexígenos e anabolizantes, gestantes e lactentes.

2.4 Coleta de dados

As visitas domiciliares 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. Foram aplicados questionários para a caracterização socioeconômica, demográfica, epidemiológica, de estilo de vida, de consumo alimentar e realizadas a avaliação nutricional e análises bioquímicas.

2.5 Avaliação Nutricional

As medidas de peso e altura foram realizadas em triplicata, e foi utilizada a média dos três valores. O IMC foi então calculado como o peso corporal (kg) dividido pela altura quadrada do corpo (metros) e os pontos de corte em adultos de 20 a 59 anos de idade foram classificados segundo os critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS) [14].

A circunferência da cintura (CC) foi utilizada para determinar a obesidade abdominal, com o ponto de corte AHA ≥ 88 cm em mulheres e ≥ 102 cm em homens [15]. Também foi utilizada a relação cintura/quadril (RCQ) para avaliar o estado de obesidade abdominal, identificado com o ponto de corte RCQ $> 0,90$ em homens e $> 0,85$ em mulheres [16].

A relação cintura/altura (RCA) tem por base o quociente das medidas da cintura e altura em centímetros. O ponto de corte utilizado foi de 0.5, respaldado por estudos realizados

em todo o mundo em diversas populações como ferramenta de avaliação para identificar riscos à saúde e relação com morbidades [17].

2.6 Avaliação do Consumo Alimentar

Para avaliar a ingestão regular de alimentos dos indivíduos, realizaram-se três recordatórios alimentares de 24 horas (R24h), contemplando um no final de semana, com um intervalo de 15 dias desde o início da coleta de dados, conforme melhor descrito em um estudo publicado anteriormente [18].

2.7 Análises Bioquímicas

A coleta de sangue foi realizada com os indivíduos adultos em jejum nos respectivos domicílios por uma enfermeira com plena experiência em coleta sanguínea e as análises das variáveis bioquímicas foram realizadas conforme descrito em um estudo previamente publicado [18]. A análise de alfa-1-glicoproteína foi realizada através da técnica de imunoturbidimetria e os testes foram realizados em um analisador automatizado (LabMax 240, Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil) utilizando o kit padronizado, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil).

2.8 Análise do Nível de Metilação do DNA

A análise dos níveis de metilação do DNA genômico do sangue foi realizada pelo método Real Time PCR (*Applied Biosystem*), de acordo com as condições descritas em um estudo previamente publicado [18].

3. Análise Estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do *software* R versão 3.3.2 [19] disponível gratuitamente em <https://www.r-project.org/>. Inicialmente foi feita a caracterização da amostra por meio da estatística descritiva representada pela frequência simples, utilizando-se medidas de posição como tendência central e de dispersão.

Adicionalmente foram procedidos testes de Análise de Variância (ANOVA) para verificar se havia diferença média entre o IMC em que os indivíduos foram classificados, para todas as variáveis quantitativas do estudo.

Para identificar a existência de relação no que diz respeito aos níveis de metilação do gene *ADRB3* e as variáveis do presente estudo, foram propostos os seguintes modelo de regressão linear múltipla:

$$\text{Níveis de metilação} = \beta_0 + \beta_1 * \text{Colesterol total} + \beta_2 * \text{LDL} + \beta_3 * \text{HDL} + \beta_4 * \text{Triglicerídeos} + \beta_5 * \text{Homocisteína} + \beta_6 * \text{CAT} + \beta_7 * \text{MDA} + \beta_8 * \text{Alfa-1-glicoproteína} + \beta_9 * \text{Ácido fólico} + \beta_{10} * \text{Vitamina B12}.$$

$$\text{Níveis de metilação} = \beta_0 + \beta_1 * \text{Calorias} + \beta_2 * \text{Lipídeos} + \beta_3 * \text{Folato} + \beta_4 * \text{Vitamina B12} + \beta_5 * \text{Gorduras monoinsaturadas} + \beta_6 * \text{Oléico} + \beta_7 * \text{Ômega 3} + \beta_8 * \text{Ômega 6} + \beta_9 * \text{Gorduras saturadas} + \beta_{10} * \text{Colesterol} + \beta_{11} * \text{Gorduras poli-insaturadas} + \beta_{12} * \text{Gorduras trans}.$$

O nível de significância adotado foi de 5%.

3. Resultados

O estudo foi composto por 262 indivíduos adultos, sendo 175 do sexo feminino (66,79%) e 87 do sexo masculino (33,21%).

De acordo com a Tabela 1, foi procedido o teste de comparação de múltiplo de médias para cada variável, através do teste ANOVA, e observou-se diferença entre as médias dos valores das variáveis descritas a seguir, em relação ao estado nutricional: idade, RCA, RCQ, CC, triglicerídeos e consumo de gordura trans. É relevante mencionar que não houve diferença significativa dos níveis de metilação por estado nutricional.

Para saber entre quais categorias de IMC ocorreu diferença significativa, foi procedido o teste de Tukey, onde observou-se que essas diferenças ocorreram mais entre as categorias “eutrofia” e “obesidade”.

Tabela 1. Características da amostra da população de adultos por estado nutricional do município de João Pessoa/PB/Brasil.

Parâmetro	Eutrofia (43,51%)	Sobrepeso (36,26%)	Obesidade (20,23%)	P-value
Níveis de metilação (%) Média ± SD	43,29 ± 19,14	39,32 ± 17,57	42,74 ± 17,29	0,6020
Idade Média ± SD	35,07 ± 11,83 ^{ab}	41,78 ± 12,52 ^b	42,23 ± 11,58 ^a	0,0002*
RCA (cm/cm) Média ± SD	0,40 ± 0,16 ^{ab}	0,55 ± 0,06 ^{bc}	0,61 ± 0,15 ^{ac}	>0,0000*
RCQ (cm/cm) Média ± SD	0,79 ± 0,08 ^{ab}	0,87 ± 0,09 ^b	0,92 ± 0,09 ^a	>0,0000*
CC (cm) Média ± SD	74,45 ± 9,45 ^{ab}	89,48 ± 8,67 ^{bc}	101,52 ± 13,90 ^{ac}	>0,0000*
Colesterol total (mg/dl) Média ± SD	175,15 ± 35,63	195,73 ± 45,19	199,40 ± 43,48	0,9460
LDL (mg/dl) Média ± SD	97,74 ± 47,71	112,03 ± 56,16	112,54 ± 62,30	0,1050
HDL (mg/dl) Média ± SD	45,84 ± 11,70	41,45 ± 10,46	42,87 ± 10,31	0,2740
Triglicerídeos (mg/dl) Média ± SD	120,39 ± 63,78 ^a	158,10 ± 93,39	158,33 ± 73,90 ^a	0,0241*
CAT (%) Média ± SD	41 ± 15	41 ± 14	42 ± 15	0,6880
MDA Média ± SD	2,75 ± 0,99	2,98 ± 0,89	2,93 ± 0,75	0,6330
Alfa-1-glicoproteína (mg/dl) Média ± SD	63,96 ± 20,86	64,66 ± 17,67	68,02 ± 16,45	0,2020
Homocisteína (micromol/l) Média ± SD	11,42 ± 12,40	10,31 ± 6,43	10,69 ± 6,25	0,3540
Ácido fólico (ng/ml) Média ± SD	14,23 ± 5,47	13,67 ± 4,87	14,70 ± 5,74	0,5660
Vitamina B12 (pg/ml) Média ± SD	277,67 ± 136,74	261,83 ± 113,45	289,23 ± 126,91	0,0936

Continuação da Tabela 1.

Parâmetro	Eutrofia (43,51%)	Sobrepeso (36,26%)	Obesidade (20,23%)	P-value
Lipídeos (g) Média ± SD	55,12 ± 29,94	58,85 ± 52,14	58,47 ± 46,68	0,8810
Calorias (Kcal) Média ± SD	1805,16 ± 695,07	1829,67 ± 1012,35	1954,71 ± 1815,64	0,7160
Folato (mcg) Média ± SD	170,58 ± 174,83	139,58 ± 111,68	126,53 ± 89,34	0,5640
Vitamina B12 (mcg) Média ± SD	2,10 ± 1,53	1,86 ± 1,59	2,01 ± 1,64	0,1370
Gorduras monoinsaturadas (g) Média ± SD	14,50 ± 8,46	16,43 ± 13,80	15,07 ± 11,68	0,9240
Oléico (g) Média ± SD	9,59 ± 7,33	12,03 ± 12,19	11,09 ± 10,75	0,7780
Ômega 3 (g) Média ± SD	0,64 ± 0,95	0,61 ± 0,63	0,68 ± 0,89	0,4100
Ômega 6 (g) Média ± SD	5,81 ± 4,96	6,81 ± 5,64	8,44 ± 14,17	0,2660
Gorduras saturadas (g) Média ± SD	17,33 ± 10,69	18,42 ± 17,72	16,85 ± 13,36	0,6750
Colesterol (mg) Média ± SD	264,93 ± 264,93	258,18 ± 224,64	226,09 ± 171,47	0,9460
Gorduras trans (g) Média ± SD	0,75 ± 1,60 ^a	0,61 ± 0,54	0,76 ± 0,91 ^a	0,0172*

a- diferença significativa em média da variável entre os indivíduos obesos e eutróficos (p-valor Teste de Tukey < 0,05)

b- diferença significativa em média da variável entre os indivíduos com sobrepeso e eutróficos (p-valor Teste de Tukey < 0,05)

c- diferença significativa em média da variável entre os indivíduos obesos e com sobrepeso (p-valor Teste de Tukey < 0,05)

Não observou-se relação significativa entre as variáveis níveis de metilação do gene *ADRB3* com perfil lipídico e estresse oxidativo no estado nutricional de eutrofia, sobrepeso e obesidade. No entanto, encontrou-se relação dos níveis de metilação do gene *ADRB3* com níveis séricos de ácido fólico nos indivíduos eutróficos, ou seja, a cada aumento de 1 unidade de ácido fólico, os níveis de metilação diminuem, em média, 2,27% (p-valor = 0,0327 < 0,05), conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. Análise de regressão múltipla dos níveis de metilação do gene *ADRB3* com perfil lipídico e estresse oxidativo dos indivíduos adultos por estado nutricional.

Colesterol Total (mg/dl)				
	Coefficient	CI 95%	Statistics t	p-Value
Eutrofia	0,23	[-0,10 ; 0,56]	0,69	0,4999
Sobrepeso	0,06	[-0,04 ; 0,15]	0,61	0,5442
Obesidade	-0,13	[-0,24 ; -0,01]	-1,06	0,3000
LDL (mg/dl)				
	Coefficient	CI 95%	Statistics t	p-Value
Eutrofia	-0,47	[-0,82 ; -0,11]	-1,31	0,2051
Sobrepeso	-0,02	[-0,09 ; 0,04]	-0,38	0,7087
Obesidade	0,12	[0,03 ; 0,21]	1,35	0,1910
HDL (mg/dl)				
	Coefficient	CI 95%	Statistics t	p-Value
Eutrofia	0,41	[-0,16 ; 0,97]	0,72	0,4808
Sobrepeso	0,27	[-0,02 ; 0,56]	0,92	0,3639
Obesidade	0,06	[-0,49 ; 0,60]	0,12	0,9160
Triglicerídeos (mg/dl)				
	Coefficient	CI 95%	Statistics t	p-Value
Eutrofia	0,08	[-0,06 ; 0,22]	0,54	0,5941
Sobrepeso	0,02	[-0,01 ; 0,05]	0,57	0,5742
Obesidade	0,02	[-0,04 ; 0,08]	0,36	0,720
CAT (%)				
	Coefficient	CI 95%	Statistics t	p-Value
Eutrofia	27,64	[-8,54 ; 63,83]	0,76	0,4543
Sobrepeso	11,30	[-8,87 ; 31,48]	0,56	0,5789
Obesidade	17,42	[-7,63 ; 42,47]	0,70	0,4940
MDA				
	Coefficient	CI 95%	Statistics t	p-Value
Eutrofia	-4,55	[-1,37 ; 10,48]	0,77	0,4516
Sobrepeso	-8,07	[-12,60 ; -3,53]	-1,78	0,0839
Obesidade	-1,54	[-6,81 ; 3,72]	-0,29	0,7720
Alfa-1-glicoproteína (mg/dl)				
	Coefficient	CI 95%	Statistics t	p-Value
Eutrofia	0,23	[0,02 ; 0,44]	1,07	0,2964
Sobrepeso	0,00	[-0,18 ; 0,19]	0,02	0,9880
Obesidade	0,08	[-0,16 ; 0,32]	0,33	0,7420

Homocisteína (micromol/l)				
	Coefficient	CI 95%	Statistics t	p-Value
Eutrofia	-1,74	[-3,50 ; 0,01]	-0,99	0,3339
Sobrepeso	-0,45	[-0,82 ; -0,08]	-1,20	0,2368
Obesidade	-0,54	[-1,02 ; -0,06]	-1,12	0,2750
Ácido fólico (ng/ml)				
	Coefficient	CI 95%	Statistics t	p-Value
Eutrofia	-2,27	[-3,26 ; -1,28]	-2,30	0,0327*
Sobrepeso	-0,79	[-1,53 ; -0,05]	-1,06	0,2956
Obesidade	-0,44	[-1,13 ; 0,25]	-0,63	0,5330
Vitamina B12 (pg/ml)				
	Coefficient	CI 95%	Statistics t	p-Value
Eutrofia	6,65	[2,72 ; 10,58]	1,69	0,1067
Sobrepeso	3,67	[1,21 ; 6,14]	1,49	0,1452
Obesidade	-0,32	[-2,80 ; 2,16]	-0,13	0,8970

No que se refere aos resultados da regressão múltipla com base no modelo 2 descrito anteriormente sobre consumo alimentar, não observou-se relação entre níveis de metilação do gene *ADRB3* e o consumo dos nutrientes nas três categorias de IMC (Material Suplementar).

4. Discussão

No presente estudo, observou-se que ocorreu relação negativa entre os níveis de metilação do gene *ADRB3* com níveis séricos de ácido fólico nos indivíduos adultos eutróficos. Observando-se que, à medida que aumentam os valores séricos de ácido fólico nos indivíduos eutróficos, diminuem os níveis de metilação. No entanto, não observou-se relação entre perfil lipídico, estresse oxidativo e consumo alimentar nos indivíduos distribuídos nas três categorias de IMC.

Embora não tenha sido elucidado o mecanismo responsável, maiores concentrações séricas de ácido fólico foram associadas com menores níveis de metilação do DNA no gene *ADRB3* em indivíduos adultos eutróficos, o que pode representar um efeito protetor para a obesidade. Esse achado concorda com os resultados de um estudo que demonstrou que maiores valores séricos de ácido fólico está relacionado com a diminuição da metilação do DNA em leucócitos em mulheres eutróficas, e essa resposta é distinta em mulheres obesas,

fornecendo novas evidências de que o metabolismo adequado do ácido fólico pode ser afetado pela obesidade, provavelmente devido a uma diluição volumétrica, resultando em uma redistribuição da vitamina da circulação para os tecidos [6].

Dada à escassez de estudos nas diferentes categorias de IMC relacionando níveis de metilação em leucócitos em adultos de uma mesma população, este representa o primeiro passo na busca de diferenças nos níveis de metilação do gene *ADRB3* nos diversos graus de obesidade, o que pode ajudar na compreensão de relações com as diferentes categorias da variável IMC.

Embora seja bem conhecido que a fisiopatologia central da obesidade é decorrente de uma quantidade excessiva de adiposidade, o IMC (que não estima diretamente a gordura corporal) ainda prevalece como o indicador de adiposidade mais utilizado em todo o mundo, por razões práticas de comparabilidade e facilidade para medição de peso e altura [7]. Para refinar a avaliação de risco, o IMC pode ser complementado pela medição da CC para discriminar a obesidade visceral e pela proporção das circunferências da cintura para o quadril (RCQ) e a relação cintura-altura (RCA), sendo esta última um indicador clínico coadjuvante de risco cardiovascular, revelando que a acumulação de gordura abdominal e visceral representa um risco aumentado para doenças cardiometabólicas [20].

A obesidade é uma doença heterogênea com diferentes subtipos e a metilação do DNA mostra-se contribuir para essas diferenças [21]. Embora poucos pesquisadores tenham investigado a relação do gene *ADRB3* e o seu papel na susceptibilidade à obesidade, somente três estudos sobre metilação foram encontrados na literatura consultada, sendo o primeiro realizado com metilação do gene *ADRB3* em homens com obesidade grave [22], o segundo com metilação no TAV em obesos e eutróficos [9], e o terceiro com metilação em mulheres com sobrepeso e obesidade [18].

Neste sentido, Guay et al. [22] demonstraram que os níveis de metilação mais elevados no gene *ADRB3* do tecido sanguíneo foram significativamente associados com uma menor RCQ e menores valores do colesterol LDL em homens com obesidade grave. Além disso, os polimorfismos *ADRB3* g.-843C>T e p.W64R foram fortemente associados com a metilação do gene *ADRB3*, reforçando o impacto de ambas, tanto mutações quanto a metilação do DNA no promotor do gene *ADRB3*.

Ressalta-se ainda, que o polimorfismo Trp64Arg no gene *ADRB3* está associado a um aumento de 3,9 vezes no IMC, e essas associações foram observadas principalmente em

asiáticos do leste. Por outro lado, a menor expressão do gene *ADRB3* em caucasianos e sua relação com uma maior predisposição à obesidade e comorbidades relacionadas ainda é controversa [23].

Foi reportado que a diminuição da expressão do gene *ADRB3* no TAV está associada com a obesidade, mas não à hipermetilação do mesmo, demonstrando ainda que os níveis médios de metilação desse gene no TAV também foram semelhantes nos indivíduos com obesidade a partir do grau III e eutróficos [9], corroborando com o presente estudo quanto à ausência de diferença dos níveis de metilação do gene *ADRB3* em leucócitos para as diferentes categorias de IMC. Logo, a identificação no sangue como um biomarcador substituto mais acessível da metilação do DNA do que no tecido adiposo é uma alternativa promissora no campo da epigenética, porém ainda desafiadora.

No entanto, esses achados não se aplicam aos do presente estudo, inédito quanto aos níveis de metilação do gene *ADRB3* em leucócitos em uma população representativa adulta de ambos os sexos por categorias de IMC. Como não existe na literatura consultada estudos classificando a população com base nas três categorias de IMC e níveis de metilação do gene *ADRB3* para fins comparativos, supõem-se que provavelmente outros fatores influenciaram nos resultados como o tamanho da amostra e a não-estratificação por sexo.

Contudo, quando o sexo foi analisado isoladamente em relação ao perfil de metilação do gene *ADRB3*, observou-se que os homens apresentaram maior nível de metilação que as mulheres ($46,40 \pm 18,81$ e $39,42 \pm 17,54$ respectivamente, $p=0,0037$; Mann Whitney). De fato, a literatura mostra que além de fatores externos como a dieta [18], uso do tabaco [24], álcool [25] e poluição do ar [26], fatores internos como idade e sexo também tem influência sobre o perfil de metilação de DNA. Diferenças entre o perfil de metilação de DNA entre homens e mulheres já foi observada em pele para o gene *miR-137* [27] e em células bucais para os genes *MMP9* e *TIMP-1* [28].

Por outro lado, vale ressaltar que não foi detectada relação dos níveis de metilação do gene *ADRB3* com sobrepeso e obesidade, já que alguns estudos demonstram que essas relações são mais proeminentes na obesidade grave (grau III e IV) [22,9]. Sugerindo assim, que no sobrepeso e na obesidade leve e moderada (grau I e II), o estado no qual tem início o desencadeamento da cascata inflamatória e os impactos do estresse oxidativo, a quantidade de adiposidade ainda é insuficiente para influenciar as marcas epigenéticas e causar alterações no fenótipo.

Interessantemente, a metilação do DNA, especialmente na região promotora, é uma marca epigenética bem caracterizada relacionada à regulação da expressão gênica em células eucarióticas. Geralmente, os níveis de metilação no promotor são inversamente correlacionados com os níveis de expressão dos genes correspondentes. No entanto, novos estudos têm avaliado o papel da metilação do DNA no primeiro éxon como no presente estudo, revelando que a metilação do éxon facilita o processo de transcrição, e com um impacto direto na expressão de genes [29]. Desta forma, compreende-se que outras regiões do gene, além da região promotora, podem atuar no controle da expressão com diferentes padrões de metilação.

Neste sentido, alguns pontos a nível molecular devem ser considerados, como por exemplo, a metilação pode não ser o mecanismo principal envolvido na regulação da atividade deste gene no sangue. Em segundo lugar, as regiões analisadas, embora cuidadosamente escolhidas, podem não ser cruciais para a regulação da expressão do gene. Assim, o impacto dos níveis de metilação no gene *ADRB3* e sua relação com variáveis de perfil lipídico e estresse oxidativo pode ser melhor elucidado através de estudos adicionais de expressão gênica.

Algumas limitações do presente estudo são relevantes. Quanto à ausência de relações com perfil lipídico, estresse oxidativo e consumo alimentar, provavelmente não ocorreram devido à alta prevalência de indivíduos eutróficos, da baixa prevalência de obesidade a partir do grau III, e do status de todas as variáveis estudadas situado em torno de 90% nos valores de referência na amostra total. E como o grupo de obesos foi composto majoritariamente por indivíduos com obesidade leve e moderada (grau I e II), não houve um grupo representativo de obesidade grave (grau III e IV) (n=5) no presente estudo. Em adição, não foi realizada a estratificação por estado nutricional de acordo com o sexo, refletindo os níveis de metilação do gene *ADRB3* em leucócitos baseados em uma população representativa adulta de ambos os sexos.

5. Conclusões

Conclui-se que há relação entre os níveis de metilação do gene *ADRB3* com níveis séricos de ácido fólico nos indivíduos adultos eutróficos, bem como com o gênero independente de IMC, no entanto, não observou-se relação com perfil lipídico, estresse

oxidativo e variáveis de consumo alimentar nos indivíduos distribuídos nas três categorias de IMC.

No que diz respeito à ausência de relação dos níveis de metilação do gene *ADRB3* nas categorias de sobrepeso e obesidade leve e moderada, provavelmente a resposta está na quantidade insuficiente de gordura corporal para iniciar os processos inflamatórios e de estresse oxidativo com impacto direto nos níveis de metilação, que diferentemente encontra-se na maioria das vezes em níveis exacerbados na obesidade grave.

Referências

1. WHO (World Health Organization). Fact sheet: obesity and overweight. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. 2016.
2. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *Lancet*. 2016;387(10026):1377–96.
3. Ghosh S, Bouchard C. Convergence between biological, behavioural and genetic determinants of obesity. *Nat. Rev. Genet.* 2017;18(12):731-48.
4. Kasinska MA, Drzewoski J, Sliwinska A. Epigenetic modifications in adipose tissue - relation to obesity and diabetes. *Arch Med Sci.* 2016;12(6):1293-1301.
5. Wahl S, Drong A, Lehne B, Loh M, Scott WR, Kunze S, et al. Epigenome-wide association study of body mass index, and the adverse outcomes of adiposity. *Nature*. 2017;541(7635):81–6.
6. Park HJ, Bailey LB, Shade DC, Hausman DB, Hohos NM, Meagher RB, et al. Distinctions in gene-specific changes in DNA methylation in response to folic acid supplementation between women with normal weight and obesity. *Obes Res Clin Pract.* 2017;11(6):665-676.
7. González-Muniesa P, Martínez-González MA, Hu FB, Després JP, Matsuzawa Y, Loos RJF, et al. Obesity. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 2017;3:17034.
8. Crujeiras AB, Diaz-Lagares A, Sandoval J, Milagro FI, Navas-Carretero S, Carreira MC, et al. DNA methylation map in circulating leukocytes mirrors subcutaneous adipose tissue methylation pattern: a genome-wide analysis from non-obese and obese patients. *Sci Rep.* 2017;7:41903.
9. Kurylowicz A, Jonas M, Lisik W, Jonas M, Wicik ZA, Wierzbicki Z, et al. Obesity is associated with a decrease in expression but not with the hypermethylation of thermogenesis-related genes in adipose tissues. *J Transl Med.* 2015;13:31.

10. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Contagem da população 2010. Rio de Janeiro: Ministério do Planejamento, 2010.
11. Kac G, Sichieri R, Gigante DP. Epidemiologia Nutricional. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz/ Editora Atheneu, 2007. 580p.
12. Cochran WG. Sampling Techniques. 3ed New York: Walter A. Shewhart. 1977:448.
13. Silva AHA, Moraes RM, Costa MJC. 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 2016.
14. WHO (World Health Organization). Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. World Health Organization. 2000;894:11–253.
15. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, et al. 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(4):198–203.
16. WHO (World Health Organization). Definition, diagnostics and classification of diabetes mellitus and its complications. Reports of a WHO consultation. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1999.
17. Ashwell M, Gibson S. Waist-to-height ratio as an indicator of ‘early health risk’: simpler and more predictive than using a ‘matrix’ based on BMI and waist circumference. BMJ Open. 2016;6:1-7.
18. Lima RPA, do Nascimento RAF, Luna RCP, Persuhn DC, da Silva AS, da Conceição Rodrigues Gonçalves M, 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. 2017;9:110.
19. R Development Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, 2009. Available online: <http://www.r-project.org> (accessed on 16 October 2017).
20. Maffetone PB, Rivera-Dominguez I, Laursen PB. Overfat Adults and Children in Developed Countries: The Public Health Importance of Identifying Excess Body Fat. Front Public Health. 2017;5:190.
21. Fradin D, Boëlle PY, Belot MP, Lachaux F, Tost J, Besse C, et al. Genome-Wide Methylation Analysis Identifies Specific Epigenetic Marks In Severely Obese Children. Sci Rep. 2017;7:46311.

22. Guay SP, Brisson D, Lamarche B, Biron S, Lescelleur O, Biertho L, et al. ADRB3 gene promoter DNA methylation in blood and visceral adipose tissue is associated with metabolic disturbances in men. *Epigenomics*. 2014;6(1):33-43.
23. Kurokawa N, Young EH, Oka Y, Satoh H, Wareham NJ, Sandhu MS, et al. The ADRB3 Trp64Arg variant and BMI: a meta-analysis of 44 833 individuals. *Int. J. Obes. (Lond.)*. 2008;32(8):1240-49.
24. Costa LA, da Silva ICB, Mariz BALA, da Silva MB, Freitas-Ribeiro GM, de Oliveira NFP. Influence of smoking on methylation and hydroxymethylation levels in global DNA and specific sites of KRT14, KRT19, MIR-9-3 and MIR-137 genes of oral mucosa. *Arch Oral Biol*. 2016;72:56-65.
25. Bendre M, Comasco E, Checknita D, Tiihonen J, Hodgins S, Nilsson KW. Associations between MAOA-uVNTR genotype, maltreatment, MAOA methylation and alcohol consumption in young adult males. *Alcohol Clin Exp Res*. 2017. doi: 10.1111/acer.13578. [Epub ahead of print].
26. Callahan CL, Bonner MR, Nie J, Han D, Wang Y, Tao MH, et al. Lifetime exposure to ambient air pollution and methylation of tumor suppressor genes in breast tumors. *Environ Res*. 2018;161:418-424.
27. Da Silva Melo AR, Barroso H, Uchôa De Araújo D, Ruidomar Pereira F, De Oliveira NF. The influence of sun exposure on the DNA methylation status of MMP9, miR-137, KRT14 and KRT19 genes in human skin. *Eur J Dermatol*. 2015;25(5):436-43.
28. Li X, Lu J, Teng W, Zhao C, Ye X. Quantitative Evaluation of MMP-9 and TIMP-1 Promoter Methylation in Chronic Periodontitis. *DNA Cell Biol*. 2018. doi: 10.1089/dna.2017.3948. [Epub ahead of print].
29. Li S, Zhang J, Huang S, He X. Genome-wide analysis reveals that exon methylation facilitates its selective usage in the human transcriptome. *Brief Bioinform*. 2017. doi: 10.1093/bib/bbx019. [Epub ahead of print].

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela 3. Análise de regressão múltipla dos níveis de metilação do gene *ADRB3* com variáveis de consumo alimentar dos indivíduos adultos eutróficos (n = 114).

	Níveis de Metilação		Statistics t	p-Value
	Coefficient	CI 95%		
Calorias (kcal)	0,01	[-0,0014;0,0191]	0,86	0,3980
Folato (mcg)	-0,01	[-0,0410;0,0225]	-0,29	0,7740
Gorduras monoinsaturadas (g)	-0,47	[-1,6880;0,7504]	-0,38	0,7050
Oléico (g)	-0,54	[-2,4909;1,4087]	-0,28	0,7840
Ômega 3 (g)	-4,81	[-11,8135;2,1888]	-0,69	0,5000
Ômega 6 (g)	3,00	[1,1749;4,8296]	1,64	0,1170
Gorduras saturadas (g)	-0,01	[-0,7547;0,7357]	-0,01	0,9900
Colesterol (mg)	-0,08	[-0,2323;0,0662]	-0,56	0,5850
Gorduras trans (g)	3,18	[-5,7526;12,1124]	0,36	0,7260

Tabela 4. Análise de regressão múltipla dos níveis de metilação do gene *ADRB3* com variáveis de consumo alimentar dos indivíduos adultos com sobrepeso (n = 95).

	Níveis de Metilação		Statistics t	p-Value
	Coefficient	CI 95%		
Calorias (kcal)	0,00	[-0,0033;0,0074]	0,38	0,7048
Folato (mcg)	0,00	[-0,0278;0,0236]	-0,08	0,9349
Gorduras monoinsaturadas (g)	0,10	[-0,5882;0,7917]	0,15	0,8836
Oléico (g)	0,49	[-0,3924;1,3809]	0,56	0,5808
Ômega 3 (g)	-4,79	[-12,3345;2,7628]	-0,63	0,5302
Ômega 6 (g)	0,49	[-0,2519;1,2397]	0,66	0,5121
Gorduras saturadas (g)	-0,25	[-0,6603;0,1621]	-0,61	0,5485
Colesterol (mg)	-0,18	[-0,2785;-0,0871]	-1,91	0,0644
Gorduras trans (g)	-1,94	[-8,0941;4,2085]	-0,32	0,7540

Tabela 5. Análise de regressão múltipla dos níveis de metilação do gene *ADRB3* com variáveis de consumo alimentar dos indivíduos adultos obesos (n= 53).

	Níveis de Metilação		Statistics t	p-Value
	Coefficient	CI 95%		
Lipídeos (g)	0,00	[-0,1987;0,2087]	0,02	0,9808
Calorias (kcal)	0,00	[-0,0065;0,0056]	-0,07	0,9418
Folato (mcg)	-0,05	[-0,0944;-0,0085]	-1,20	0,2466
Vitamina B12 (mcg)	0,88	[-2,2099;3,9724]	0,29	0,7788
Gorduras monoinsaturadas (g)	0,20	[-0,7909;1,1951]	0,20	0,8410
Oléico (g)	-0,19	[-1,1437;0,7726]	-0,19	0,8486
Ômega 3 (g)	1,43	[-4,5825;7,4493]	0,24	0,8144
Ômega 6 (g)	-0,24	[-1,0214;0,5469]	-0,30	0,7657
Gorduras saturadas (g)	0,67	[-0,0557;1,4028]	0,92	0,3679
Colesterol (mg)	0,04	[-0,1034;0,1821]	0,28	0,7859
Gorduras trans (g)	-2,17	[-7,2626;2,9210]	-0,43	0,6749