

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

KEYLHA QUERINO DE FARIAS LIMA

**NÍVEIS DE METILAÇÃO DO GENE *MTHFR* E SUA RELAÇÃO COM NÍVEIS
GLICÊMICOS, ESTRESSE OXIDATIVO E ESTILO DE VIDA EM INDIVÍDUOS
ADULTOS: UM ESTUDO DE BASE POPULACIONAL**

JOÃO PESSOA
2018

KEYLHA QUERINO DE FARIAS LIMA

**NÍVEIS DE METILAÇÃO DO GENE *MTHFR* E SUA RELAÇÃO COM NÍVEIS
GLICÊMICOS, ESTRESSE OXIDATIVO E ESTILO DE VIDA EM INDIVÍDUOS
ADULTOS: 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 Epidemiológica Aplicada à Nutrição.

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

**João Pessoa
2018**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

L732n Lima, Keylha Querino de Farias.

Níveis de Metilação do Gene MTHFR e sua Relação com Níveis Glicêmicos, Estresse Oxidativo e Estilo de Vida em Indivíduos Adultos: Um estudo de base populacional / Keylha Querino de Farias Lima. - João Pessoa, 2018.
97 f. : il.

Orientação: Maria José de Carvalho Costa Costa.
Dissertação (Mestrado) - UFPB CCS/PPGCN Nutrição.

1. Epigenética. Metilação do DNA. Gene MTHFR. I. Costa, Maria José de Carvalho Costa. II. Título.

UFPB/BC

KEYLHA QUERINO DE FARIAS LIMA

NÍVEIS DE METILAÇÃO DO GENE *MTHFR* E SUA RELAÇÃO COM NÍVEIS GLICÊMICOS, ESTRESSE OXIDATIVO E ESTILO DE VIDA EM INDIVÍDUOS ADULTOS: 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: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA



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

Orientadora titular

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



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

Membro interno – Titular

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

Prof.^o Dr.^o Aléssio Tony Cavalcanti de Almeida

Membro externo- Suplente

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

Prof^ª. Dr^ª. Flávia Emília Leite de Lima Ferreira

Membro interno – Suplente

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

Prof.^o Dr.^o Alcides da Silva Diniz

Membro externo- Suplente

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

João Pessoa
2018

Dedico este trabalho a **Deus**, como forma de gratidão por tão grande amor e infinita graça derramada sobre mim, suprimindo todas as minhas necessidades e me encorajando a prosseguir. Aos meus familiares por todo apoio e compreensão e a professora Maria José de carvalho Costa por todo carinho, inspiração e direcionamento.

AGRADECIMENTOS

Sobre todas as coisas agradeço a **Deus** por me conduzir a experiências, tais como esta, que jamais imaginei vivenciar. Sou grata pelo seu infinito amor, demonstrado diariamente, expresso nos pequenos detalhes.

Agradeço aos meus pais *Adamilton Moreira de Farias* e *Maria Lindomar Querino de Farias*, que com toda humildade e simplicidade sempre cuidaram e me educaram com muito zelo, carinho e dedicação. Muito obrigada, amo vocês!

Aos meus avós *Josefa Soares da Costa* e *José Severino da Silva*, por toda ajuda, e cumplicidade em todos os momentos em que necessitei de ajuda. Meus sinceros agradecimentos.

Ao meu irmão *Adamilton Querino de Farias* externo minha gratidão por todo o apoio, incentivo, ajuda e acima de tudo por acreditar que eu seria capaz de concluir mais esta etapa.

Agradeço a minha cunhada *Melissa Karoline* por todo o apoio e encorajamento, você é muito especial para mim. Muito obrigada.

Agradeço a *Alex Tiago Gomes dos Santos*, que mesmo distante alguns muitos quilômetros, esteve me apoiando, me incentivando e cuidando de mim. Obrigada meu amor.

Agradeço a *Thiago Fabrício* pelo apoio, incentivo e ajuda durante determinada etapa desse processo. Obrigada.

Agradeço a minha orientadora, a professora Dr^a *Maria José de Carvalho Costa* pelo carinho, pelos ensinamentos, pela amizade, pela disponibilidade, pela paciência e acima de tudo por ser um ícone das Ciências da Nutrição, brilhante em tudo que executa. Minha inspiração!

Externo minha gratidão a amiga *Raquel Ataíde*, por ter sido essencial na execução de todas as etapas deste trabalho, mesmo antes do mestrado sempre me incentivou e acreditou que eu seria capaz, por ter um coração que não cabe no peito, sempre disponível a ajudar. Admiro-te muito!

Não poderia de maneira alguma deixar de mencionar o quanto sou grata pela vida das minhas amigas *Nadjeanny Ingrid* e *Jéssica Lisboa*, que nos momentos mais difíceis sempre

estiveram do meu lado. Obrigada por poder confiar em vocês, amizade que nasceu no mestrado e que quero levar por toda vida.

A todas as minhas amigas do NIESN, *Marina Ramalho, Thamires Chaves, Jéssica Vicky, Erika Sousa* e finalmente todas. Obrigada meninas por todas as experiências e momentos compartilhados com vocês.

Agradeço a minha amiga *Raelma Leandro* por estar sempre presente na minha vida, por todo o apoio durante esta etapa e em diversas circunstâncias da minha vida. Obrigada Girl!

As queridos professores *Maria da Conceição Rodrigues Gonçalves, Aléssio Tony Cavalcanti de Almeida, Flávia Emília Leite de Lima Ferreira* e Alcides da Silva Diniz por aceitarem gentilmente o convite de participar desta banca, e por contribuírem com sugestões valiosas e pertinentes a esta pesquisa. Meu muitíssimo obrigada!

A toda a equipe de coordenadores, professores, alunos e instituições executoras e financiadoras do Projeto II DISANDNT/PB por tornar possível a concretização desta pesquisa por meio de investimentos e incentivos a pesquisa científica.

A enfermeira *Surama Silva*, e a doutoranda *Mussara Monteiro* pela disponibilidade em coletar as amostras de sangue dos indivíduos participantes desta pesquisa. A doutora *Rafaella Pordeus* por ajudar na análise estatística e revisão do artigo, e serem essas pessoas maravilhosas. Obrigada!

Ao *Laboratório de Treinamento Físico Aplicado ao Desempenho e a Saúde*, na pessoa do prof. Alexandre Sergio Silva, a equipe do Laboratorio - Labim, em especial a *Rayner Ferreira, Mayara Karla*.

Ao *Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição*, a todos os professores do programa por contribuírem com o meu crescimento profissional e pela atenção. Aos funcionários do curso de Pós-Graduação, *Carlos e Marcos*, pela paciência e ajuda de sempre. Obrigada!

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

Mas os que esperam no Senhor renovarão as suas forças, subirão com asas como águias, correrão e não se cansarão, caminharão e não se fatigarão.

Isaías 40:31

RESUMO

Após a conclusão do projeto genoma, surgiram novas linhas de pesquisa, dentre elas a nutrigenômica, cujo objetivo é relacionar os componentes dietéticos com o genoma humano. A partir deste advento pesquisas estão sendo desenvolvidas para analisar mecanismos epigenéticos, que podem estar envolvidos no metabolismo de diversos nutrientes e participam da etiologia de diferentes morbidades. A metilação do DNA é o mecanismo epigenético mais conhecido e participa da regulação transcricional da expressão gênica, e tem sido associada a diversas desordens metabólicas e de saúde. Alterações na metilação do gene *MTHFR*, acarretam em modificações no ciclo da homocisteína e do ácido fólico. Além do que a enzima metilenotetra- hidrofolato redutase codificada por este gene pode doar grupos metil para a metilação do DNA. Com base nestes fatos esta pesquisa teve como objetivo avaliar os níveis de metilação do gene *MTHFR* e relacionar com níveis glicêmicos, estresse oxidativo e estilo de vida em indivíduos adultos. Trata-se de um estudo epidemiológico transversal de base populacional, envolvendo 265 indivíduos adultos na faixa-etária de 20 a 59 anos de ambos os gêneros, representativo das Zonas Leste e Oeste do município de João Pessoa/ PB. 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”. Os dados foram obtidos por meio da aplicação nos domicílios dos questionários de caracterização socioeconômica e demográfica, caracterização epidemiológica, estilo de vida (consumo de álcool), avaliação do consumo alimentar e do estado nutricional. A partir de amostras sanguíneas as concentrações séricas de capacidade de antioxidante total, malondealdeído, perfil lipídico, ácido fólico, vitamina b12 e homocisteína, foram analisadas. As análises dos níveis de metilação do DNA nos promotores do gene *MTHFR* foi realizada através do método de PCR em tempo real. Para a análise estatística foi utilizado o modelo de regressão linear múltipla, utilizando o *STATA* 13. Os níveis de metilação do gene *MTHFR* foi de $34.14\% \pm 17.41$. Ocorreu relação positiva entre níveis de metilação com níveis de glicemia em jejum, observando-se que quando a glicemia de jejum aumenta 1mg/dl os níveis de metilação aumentam em 0,050% e relação com o consumo eventual de mais de seis doses de bebida alcoólica em ocasiões especiais, ou seja, quando os indivíduos ingerem mais de seis doses de álcool os níveis de metilação aumentam em 4.47%. Já quanto ao consumo de Folato, a relação foi inversa, ou seja, à medida que o consumo de folato diminui em 1mg os níveis de metilação aumentam em 0.05%. Conclui-se que os dados demonstram uma associação positiva entre a metilação no gene *MTHFR*, glicemia de jejum e consumo de álcool em ocasiões eventuais, e negativo com o consumo de Folato.

Palavras-chave: Epigenética. Metilação do DNA. Gene *MTHFR*. Glicemia de jejum. Consumo de álcool. Folato.

ABSTRACT

After the completion of the genome project, new research lines emerged, among them a nutrigenomics, whose objective is to relate the dietary components to the human genome. From this report you should be ready to analyze the epidemic mechanisms, which are developing and are not metabolizable. DNA methylation is the most sensitive and participatory mechanism of transcriptional transmission of gene expression, with variables related to metabolic and health disorders. Changes in methylation of the *MTHFR* gene lead to changes in the homocysteine and folic acid cycle. In addition, the enzyme methylenetetrahydrofolate reductase is encoded by this gene can make methyl groups for a methylation of DNA. The aim of this study was to evaluate the methylation levels of the *MTHFR* gene and to correlate glycemic levels, oxidative stress and lifestyle in adult individuals. This is a population-based cross-sectional epidemiological study involving 265 adult individuals in the age range of 20 to 59 years of both genders, representative of the East and West Zones of the city of João Pessoa / PB. Population-based research entitled "II Cycle of Diagnosis and Intervention of Food, Nutrition and Non-Communicable Diseases of the Population of the Municipality of João Pessoa / PB". The data were newborns through epidemiological applications, lifestyle, evaluation of food consumption and nutritional status. From the blood samples were found serum concentrations of total antioxidant capacity, malondealdehyde, lipid profile, folic acid, vitamin b12 and homocysteine, were analyzed. DNA methylation levels analyzes in the promoters of the *MTHFR* gene were performed by the real-time PCR method. For statistical analysis, linear regression using STATA 13 was used. The methylation levels of the *MTHFR* gene were $34.14\% \pm 17.41$. The equilibrium between the methylation class with fasting blood glucose levels, when fasting blood glucose increases 1mg / dl, methylation levels increased by 0.050% and the relation with the eventual consumption of more than six doses of alcoholic beverage in the most generic is the larger size compared to serum levels of methylation increased by 4.47%. It was already used for folate consumption, a low to reverse, that is, as folate consumption decreased by 1mg, methylation levels increased by 0.05%. It is concluded that the data demonstrate a positive association between methylation of the *MTHFR* gene, fasting glucose and alcohol consumption in a series of events, and negative for folate consumption.

Keywords: Epigenetics. Methylation of DNA. *MTHFR* gene. Fasting glycemia. Alcohol consumption. Folate.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS DA DISSERTAÇÃO

Figura 1 Nutrigenômica e as chamadas ciências “ômicas”	16
Figura 2 Epigenética Metilação do DNA	19
Figura 3 Metabolismo do folato	22
Figura 4 A homocisteína (Hcy)/ciclo da metionina.....	23
Figura 5 Representação esquemática dos mecanismos de hiperhomocisteinemia (HHcy) desencadeando modificações epigenéticas após AVC	25
Figura 6 Mitocôndria, organela celular	27
Figura 7 Mapa utilizado no sorteio de quadras, João Pessoa/PB	36
Figura 8 Diagrama dos cálculos para definição da amostra da zona leste do município de João Pessoa.....	40
Figura 9 Diagrama dos cálculos para definição da amostra da zona oeste do município de João Pessoa	41
Figura 10 Fluxo de coleta de dados	42
Figura 11 Processo de coleta e isolamento do DNA a partir dos leucócitos	47

QUADROS DA DISSERTAÇÃO

Quadro 1 Critérios para estratificação final da amostra	37
Quadro 2 Estratificação dos bairros por renda com desvio-padrão.....	38
Quadro 3 Cálculo de estimativa do tamanho da amostra, por zona	38
Quadro 4 Amostra de quadras por bairro, número de quadras sorteadas por bairro e Zonas visitadas	39

TABELAS DO ARTIGO

Tabela 1 Relação entre os níveis de metilação do gene <i>MTHFR</i> com estilo de vida, medida antropométrica, valores glicêmicos e estresse oxidativo em indivíduos adultos. João Pessoa/ Paraíba/ Brasil.	83
Tabela 2 Relação entre níveis de metilação do gene <i>MTHFR</i> com variáveis de consumo alimentar em indivíduos adultos. João Pessoa/ Paraíba/ Brasil.	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

ABESO Associação Brasileira para Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica

CAT Capacidade Antioxidante Total

CC Circunferência da Cintura

CCS Centro de Ciências da Saúde

CNPq Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CpG (Cytosine Phosphate Guanine) Citosina Fosfato Guanina

CT Colesterol Total

DAC Doença Arterial Coronária

DCNT Doenças Crônicas não Transmissíveis

DCV Doença Cardiovascular

DHGNA Doença Hepática Gordurosa não Alcoólica

DM2 Diabetes Mellitus Tipo 2

DNA (Deoxyribonucleic Acid) Ácido Desoxirribonucleico

DNAMTs (DNA Methyltransferases) DNA Metiltransferases

EPIC European Prospective Investigation into Câncer and Nutrition

EROS Espécies Reativas de Oxigênio

FAPESQ Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba

GSH (Reduced Glutathione) Glutathione Redutase

GPx Glutathione Peroxidase

Hcy (Homocysteine) Homocisteína

HDL (High-Density Protein) Lipoproteína de alta densidade

HHcy Hiperhomocisteinemia

H₂O₂ Peróxido de Hidrogênio

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IMC Índice de Massa Corporal

LDL (Low-Density Protein) Lipoproteína de baixa densidade

MDA (Malondialdehyde) Malondialdeído

MS Ministério da Saúde

MSM (Method Source Multiple) Método de Múltiplas Fontes

MSP (Methylation Specific PCR) Metilação Específica PCR

MTHFR Metilenotetrahidrofolato Redutase

Nrf2 (Nuclear Transcription Factor) Fator de Transcrição Nuclear

NOD (Starting Diabetes) Diabetes de Início

OMS Organização Mundial de Saúde

O₂⁻ (Ânion Superóxido) Superoxide Ions

OH[•] (Radical Hydroxy) Radical Hidroxila

PPGCN Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição

R24h Recordatório de 24 horas

RCQ Relação Cintura-Quadril

RNAs (Ribonucleic Acid) Ácido Ribonucleico

ROS (Oxygen-reactive Specie) Espécies Reativas de Oxigênio

RNS (Reactive Nitrogen Species) Espécies Reativas de Nitrogênio

SAM (S-adenosine) S-adenosina

TBAS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) Ácido tiobarbiturico

TCLE Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TG Triglicerídeos

TGSH (Total Glutathione Reduced) Glutathione Redutase Total

UFPB Universidade Federal da Paraíba

USDA (United States Department of Agriculture) Departamento de Agricultura dos Estados Unidos

WHO World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 Aspectos da Nutrigenômica e Epigenética	16
2.2 Gene <i>MTHFR</i>	21
2.3 Estresse Oxidativo e Epigenética	26
2.4 Níveis Glicêmicos e Genética	32
3 ABORDAGEM METODOLÓGICA	34
3.1 Caracterização do estudo	34
3.2 Questões Éticas	34
3.3 População e Amostra	34
3.3.1 Critérios de inclusão	35
3.3.2 Critérios de exclusão.....	35
3.4 Protocolo Amostral	36
3.5 Coleta de dados	41
3.6 Avaliação Antropométrica	42
3.7 Avaliação do Consumo Alimentar	43
3.8 Estilo de Vida	44
3.9 Análises Bioquímicas	44
3.9.1 Capacidade Antioxidante Total - CAT	45
3.9.2 Malonaldeído (MDA)	45
3.9.3 Homocisteína	45
3.9.4 Ácido Fólico	46
3.9.5 Vitamina B12	46
3.10 Isolamento do DNA e Análise dos Níveis de metilação	46
3.10.1 Obtenção da Amostra e Extração do DNA a partir do Sangue	46
3.10.2 Conversão do DNA pelo Bisulfito de Sódio	48
3.10.3 Níveis de Metilação	48
3.11 Tratamento Estatístico	49
REFERÊNCIAS	50
APÊNDICE	65
APÊNDICE A- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO	66
ANEXO	67
ANEXO A- CERTIDÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	68
ANEXO B- IDENTIFICAÇÃO DO DISTRITO, NÚMERO DO CASO E USF	69
ANEXO C- CARACTERIZAÇÃO SOCIOECONÔMICA E DEMOGRÁFICA	70
ANEXO D- CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA	71
ANEXO E- RECORDATÓRIO ALIMENTAR	72
ANEXO F- AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA	73
ARTIGO	74

INTRODUÇÃO

A epigenética é definida como o estudo das alterações na regulação da atividade e expressão de genes, sem alterações na sequência do DNA (ROMANOSKI et al., 2015), embora sua definição esteja em constante atualização, três aspectos principais estão estabelecidos: inalteração na sequência do DNA, hereditariedade, plasticidade e reversibilidade (ZHENG et al., 2014).

A metilação do DNA é a marca epigenética mais conhecida (SCHUBELER, 2015), e é catalisada por enzimas DNA metiltransferases: DNMT1, DNMT3A e DNMT3B em dinucleótidos citosina fosfato guanina (CpG) para gerar 5-metilcitosina (LAW; JACOBSEN, 2010), com isso uma nova metilação do DNA é mediada por enzimas DNMT3A e DNMT3B, principalmente durante o desenvolvimento embrionário, já a DNMT1 mantém padrões de metilação do DNA durante sua replicação (VELSZIC et al., 2015).

Embora a metilação do DNA geralmente esteja relacionada à inativação do gene, e normalmente ocorre em dinucleotídeos (CpG), a mesma em locais de ligação com o fator de transcrição que bloqueia a ligação de proteínas repressoras pode, paradoxalmente levar a ativação de genes. Ocorre nos dinucleotídeos CpG, que quando metilados são distribuídos ao longo do genoma e grande parte agrupados como ilhas de CpG nas extremidades 5' de vários genes (GUO et al., 2015).

A enzima MTHFR atua na regulação das reações de metilação, desempenhando uma atividade catalisadora na conversão do 5,10 metilenotetrahidrofolato para 5-metiltetrahidrofolato, sendo considerada a principal forma circulante de folato, necessária para que ocorra a remetilação da homocisteína (Hcy) para metionina, uma importante reação que leva a síntese de S-adenosilmetionina (SAM), o maior doador de metil para reações de metilação do DNA. Tanto o folato quanto a S-adenosilmetionina participam do ciclo da metionina, sendo o mesmo intimamente relacionado com o estado oxidativo da célula (COLSON et al., 2017). Alterações no gene *MTHFR* tem sido relacionadas com o risco para diversas patologias dentre elas o câncer, doenças cardiovasculares e diabetes de início (BRADSHAW et al., 2015; LIEW; GUPTA, 2015; QIN et al., 2015), mas a relação entre os níveis de metilação do gene em estudo com alterações glicêmicas, ainda é pouco compreendida.

A glicemia de jejum é obtida através de um exame realizado após um jejum de pelo menos 8 horas sem que haja o consumo de qualquer alimento ou bebida. Os valores de referência da glicemia em jejum são: normal (< 110mg/dl), prediabetes (110mg/dl –

125mg/dl) e diabetes (≥ 126 mg/dl) (ADA, 2017).

A dieta também desenvolve um importante e complexo papel na determinação destes estados epigenéticos, onde alguns componentes alimentares tem ação direta ou indireta nestes mecanismos (DHASARATHY; ROEMMICH; CLAYCOMBE, 2016).

Esta pesquisa se justifica por seu caráter inovador visto que não existem estudos que abordem a relação entre o perfil de metilação do gene *MTHFR*, estresse oxidativo, estilo de vida e variáveis socioeconômicas em adultos, considerando que a metilação do DNA pode desempenhar um papel importante na incidência de doenças metabólicas, caracterizando o primeiro estudo de base populacional relacionado com o mencionado gene na literatura.

Desta forma, este estudo tem como objetivo principal avaliar os níveis de metilação do gene *MTHFR* e relacionar com níveis glicêmicos, estresse oxidativo e estilo de vida em indivíduos adultos e como objetivos específicos: analisar os níveis de metilação do gene *MTHFR* na população de adultos, valores de Malondealdeido (MDA), Capacidade de Antioxidante Total (CAT), marcadores bioquímicos, avaliação das características sócioeconômicos e de estilo de vida da população relacionando-os com a presença de metilação do gene *MTHFR*.

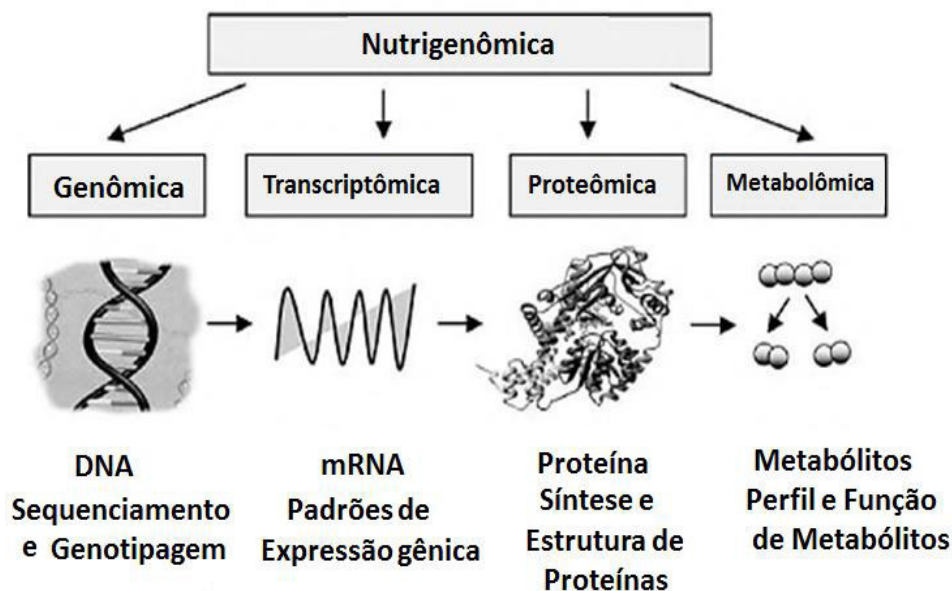
2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos da Nutrigenômica e Epigenética

Após a conclusão do Projeto Genoma Humano, surgiram novas linhas de pesquisa na área da saúde, mas precisamente na ciência da nutrição, que está vivendo a era pós-genoma. Através da relação existente entre os nutrientes e o genoma humano originou-se a nutrigenômica, cujo objetivo principal é conhecer o funcionamento e a interação do genoma com os componentes dietéticos, e com base nesse conhecimento prescrever dietas personalizadas para promover saúde e compreender as várias respostas obtidas através de uma determinada dieta aplicada entre grupos populacionais ou indivíduos (CONTI, 2010; SALES; PELEGRINI; GOERCH, 2014; MECDONALD; GLUSMAN; PRICE, 2016).

Paralelamente originaram-se as tecnologias genômicas, com o intuito de avaliar outras biomoléculas (Figura 1), como por exemplo, marcadores epigenéticos, proteômicos para proteínas e peptídeos e metabolômicas. As pesquisas que envolvem associações ômicas são semelhantes visto que procuram biomarcadores ômicos que se relacionem com o fenótipo (TEBANI et al., 2016).

Figura 1. Nutrigenômica e as chamadas ciências “ômicas”.



Fonte: Rimbach; Pascual-Teresa (2005).

Um dos principais focos da nutrigenômica está voltado na prevenção de doenças crônicas que são mediadas, em parte, pela exposição permanente a certos componentes

dietéticos (NUNO; HEUBERGER, 2014), logo a nutrigenômica poderá auxiliar na prevenção de doenças relacionadas com a alimentação, bem como a elaboração de estratégias nutricionais e colaborar para o conhecimento dos efeitos adversos ou benéficos de alguns alimentos ou nutrientes. A Nutrição personalizada será o futuro em termos de concepção e prescrição de uma dieta para os indivíduos com base no seu genoma e suas variações genéticas, ainda nessa complexa interação entre gene e dieta que pode ser benéfica ou não ao organismo, entra a participação da epigenética (WATERLAND, 2006; PAVLIDIS et al., 2012; NOECKER; BORESTEIN, 2016).

A Epigenética é definida como o estudo das modificações que ocorrem no genoma resultantes de alterações na estrutura da cromatina sem alterar a sequência nucleotídica (MATHERS, 2008; LANGEVIN; KELSEY, 2013; LIZCANO; VARGAS, 2016), sendo os padrões epigenéticos vulneráveis a modificações do ambiente podendo levar a mudanças fenotípicas que podem ser transmitidas para as próximas gerações (PRAY, 2004; JARAMILLO; CAMACHO; NARANJO, 2013; LOPOMO; BURGIO; MIGLIORE, 2016).

Os mecanismos epigenéticos de regulação e expressão gênica são influenciados e estimulados por fatores internos tais como: alterações na estrutura da cromatina, vias metabólicas, balanço neuroendócrino, atividades hormonais e fatores externos como nutrientes ou componentes alimentares bioativos, medicação, tabaco, radiação, organismos infecciosos e estresse (REMELY et al., 2015).

Algumas características diferenciam a epigenética dos mecanismos genéticos convencionais: a reversibilidade, os efeitos de posicionamento e a habilidade de agir em distâncias maiores do que um único gene. Embora a definição de epigenética esteja sendo atualizada continuamente, algumas características principais são conservadas: como a manutenção da sequência de DNA, hereditariedade, plasticidade e reversibilidade (FEINBERG, 2001; ZHENG et al., 2014).

Atualmente o termo tomou maiores proporções e abrange diversos mecanismos que participam na regulação da expressão gênica, sendo eles metilação do DNA, modificações pós traducionais em histonas, RNAs não codificantes, entre outros. A epigenética desperta muito interesse nos pesquisadores pelo fato de que seus processos são potencialmente reversíveis, diferente de alterações genéticas estruturais, e conseqüentemente são passíveis de tratamento (YANG et al., 2010), logo o campo da epigenética nutricional consegue desvendar a natureza das interações dos nutrientes com os genes, dando assim mais suporte à nutrigenômica na compreensão da aquisição de novos fenótipos (KANG, 2013).

Os fenômenos epigenéticos possuem características como reversibilidade e hereditariedade. Diferente do genoma, o epigenoma pode ser modificado, desta forma alguns marcadores de risco epigenético tem o potencial para ser invertido. Essas modificações ocorrem por meio de medicamentos, dieta ou exposições ambientais (CHONG; WHITELAW, 2004; ANWAY et al., 2005; FRANKS; LING, 2010; BISHOP; FERGUSON, 2015).

As marcas epigenéticas sofrem mudanças desde o desenvolvimento fetal, perdurando durante a vida adulta e envelhecimento ou serem revertidas pela ação de diferentes fatores. Estas alterações desempenham um importante papel no estabelecimento e regulação na programação de genes. Parte dessas mudanças ocorrem devido a interação do ambiente com o genoma (TORAÑO et al., 2016).

A expressão gênica é regulada de maneira positiva ou negativa pela metilação, desempenhando importantes funções. É conclusivo que algumas modificações epigenéticas do DNA podem surgir como consequência de mudanças ambientais, incluindo nutrição e exercício, podendo alterar a expressão gênica de maneira estável e hereditária, influenciando em desordens metabólicas, comportamentais e de saúde. Sendo assim estes fatores tornam a epigenética um mecanismo patogênico importante em desordens complexas, tais como a obesidade (BRAY et al., 2016).

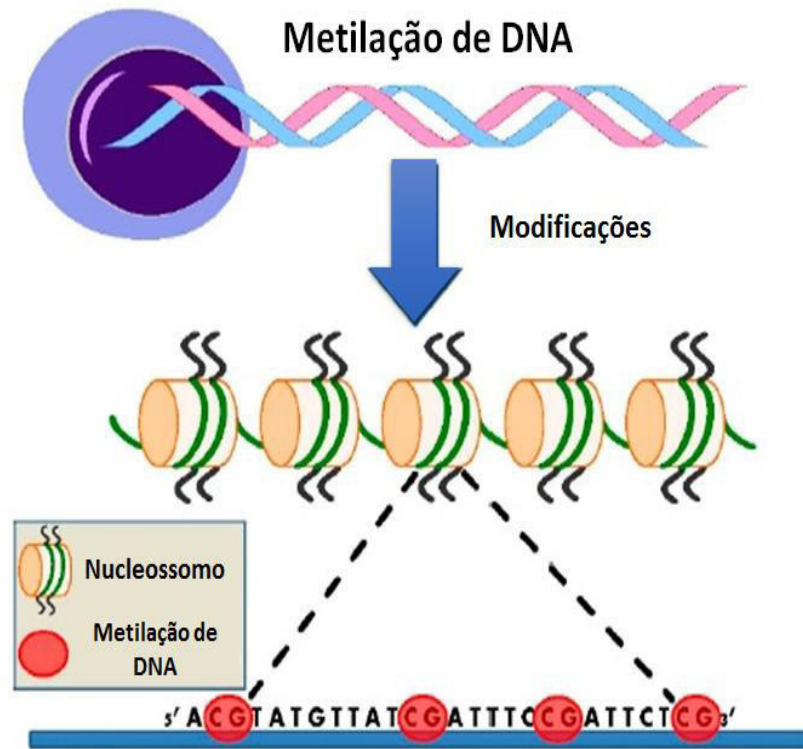
A metilação do DNA ocorre na região promotora do gene, em ilhas CpG promovendo o efeito de silenciamento transcricional da expressão gênica (AUCLAIR; WEBER, 2012), em mamíferos é estabelecida durante a embriogênese (OKANO; XIE; LI, 1998; BESTOR, 2000) e os padrões de metilação mudam de acordo com as fases de desenvolvimento das células (EHRLICH et al., 1982; LAURENT et al., 2010).

Importantes classes de enzimas denominadas DNA metiltransferases (DNMTs) estão envolvidas nos mecanismos de metilação do DNA e atuam na manutenção do genoma humano (RAE, 2017). Identificou-se quatro grupos principais de DNMTs na espécie humana, descritas como DNMT1, DNMT3A, DNMT3B e DNMT3L, mediadoras nos processos de metilação. A DNMT1 mantém padrões de metilação do DNA durante sua replicação, mantendo os padrões da fita original. A DNMT3A e DNMT3B mediam uma nova metilação do DNA por fim a DNMT3L atua como um co-fator singular na metilação dos gametas expressos (HAGGARTY, 2015).

A metilação do DNA (Figura 2) é a marca epigenética mais conhecida, que envolve a ligação de um grupo metil com o carbono 5 do anel de citosina. Ocorre principalmente em

ilhas CpG resultando na inibição da transcrição do gene, principalmente se ocorrer na região promotora do mesmo (SCHUBELER, 2015; WISE; CHARCHAR, 2016).

Figura 2. Epigenética Metilação do DNA.



Fonte: Wise; Charchar (2016).

Estudiosos recentemente sugeriram que a metilação do DNA deve ser julgada como uma forma mais dinâmica, na qual está determinada pela atividade local de DNA metiltransferases (DNMTs), DNA desmetilases, e enzimas de replicação do DNA, sendo vital para diversos processos de desenvolvimento, através da regulação da expressão do gene e herança epigenética (BIRD, 2002; JAENISCH; BIRD, 2003; GUO et al., 2015).

Segundo Kirchner et al. (2016), o aumento da glicólise hepática e da neo lipogênese estão relacionados a hipometilação do DNA, uma vez que observou-se no fígado de indivíduos obesos que a hipometilação do motivo de ligação (ATF) do fígado obeso desbloqueia as vias glicolíticas e lipogênicas, onde há uma elevada produção de piruvato não sendo utilizado para a produção de ATP no ciclo do TCA, e por fim é convertido em ácidos graxos. Tais fatores ativam a proteína quinase C que também sofre hipometilação. Sugerindo assim que determinadas rotinas alimentares podem tornar em longo prazo o fígado destes indivíduos resistentes à insulina, desencadeando diabetes mellitus tipo 2 e esteatose hepática.

Alterações nos padrões de metilação podem levar a alterações na regulação gênica. Baixos níveis de metilação do DNA (hipometilação) associam-se com a elevação da atividade do gene, enquanto que níveis elevados de metilação (hipermetilação) estão associados com o silenciamento gênico (YU et al., 2015).

O silenciamento dos genes comumente está associado à hipermetilação de ilhas CpGs, levando em consideração que o epigenôma pode ser modificado, estas alterações são reversíveis, através de agentes hipometilantes como antioxidantes dietéticos naturais, desmetilando ilhas CpGs, permitindo a expressão gênica inclusive do *MTHFR* (KARACA et al., 2016).

Price et al. (2016), ao avaliarem a metilação do DNA em tecidos humanos objetivando esclarecer se havia uma relação entre defeitos do tubo neural com deficiência no ciclo do metabolismo do carbono (processo que fornece uma unidade de carbono para metilação do DNA), sugeriram que mecanismos como a expressão gênica e deficiência de vitaminas envolvidas no metabolismo do carbono são linhas de investigações que podem fornecer pistas quanto à etiologia do problema.

A relação entre modificações epigenéticas, incluindo a metilação do DNA, no desenvolvimento de doenças crônicas é cada vez mais evidente, elucidando o aumento destas patologias dentre elas o diabetes, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas e câncer. Sugere-se que a obesidade e suas complicações estejam ligadas a fatores externos advindos de um ambiente denominado obesogênico, da microbiota intestinal e do desequilíbrio nutricional, acarretando em alterações epigenéticas que resultam no ganho de peso (LOPOMO; BURGIO; MIGLIORE, 2016).

Volkov et al. (2016), destacaram a influência das interações genômicas entre modificações genéticas e epigenéticas e sua função no metabolismo humano, identificando relações metabólicas intermediadas por metilação do tecido adiposo, entre o genótipo e o fenótipo. Chegou - se a conclusão que variantes genéticas podem causar efeitos sobre as características metabólicas, devido alterações na metilação do DNA no tecido adiposo humano.

A obesidade é um dos fatores de risco para síndrome metabólica e como forma de prevenção, os indivíduos em risco podem ser rastreados a partir do seu histórico familiar. Uma vez que esta síndrome está fortemente ligada ao estilo de vida, recomenda-se ainda como forma de prevenção o abandono de hábitos não saudáveis, considerados como fatores de risco não apenas para o indivíduo, mas também para os seus descendentes como por

exemplo o tabagismo que contribui para o retardo intra-uterino e modificações epigenéticas que podem levar à obesidade na fase adulta (HAN; LEAN, 2016).

2.2 Gene *MTHFR*

O gene *MTHFR* é responsável pela codificação da enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) que participa da conversão da homocisteína em metionina e é fundamental no metabolismo do ácido fólico. A atividade ineficiente da MTHFR acarreta à hiperhomocisteinemia aumentando o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, visto que esta disfunção enzimática afeta os vasos sanguíneos e o coração (FROSST et al., 1995; KLERK et al., 2002; MOLL; VARGA, 2015).

Quando ocorre a metilação na região promotora do gene *MTHFR*, a expressão do mesmo é reduzida, prejudicando a produção da enzima metilenotetrahidrofolato redutase, tendo como uma das consequências modificações no metabolismo da homocisteína. Estas alterações levam a uma série de variações patológicas (GE et al., 2015).

Dentre as alterações patológicas, há evidências de que o aumento da metilação do DNA do promotor do gene *MTHFR* ocorreu na análise do sêmen de homens com infertilidade (ROTONDO et al., 2012), no DNA de tecidos de indivíduos com câncer (BOTEZATU et al., 2013), em indivíduos com doenças cardiovasculares e doença renal (GHATTAS et al., 2014; WEI et al., 2015) e no sangue placentário de mulheres com pré-eclâmpsia (GE et al., 2015).

Alterações no gene *MTHFR*, assim como nas proteínas DNMT têm sido associadas ao estado epigenético, uma vez que este codifica fatores que controlam processos epigenômicos, desempenhando diversas funções biológicas (HAGGARTY, 2015).

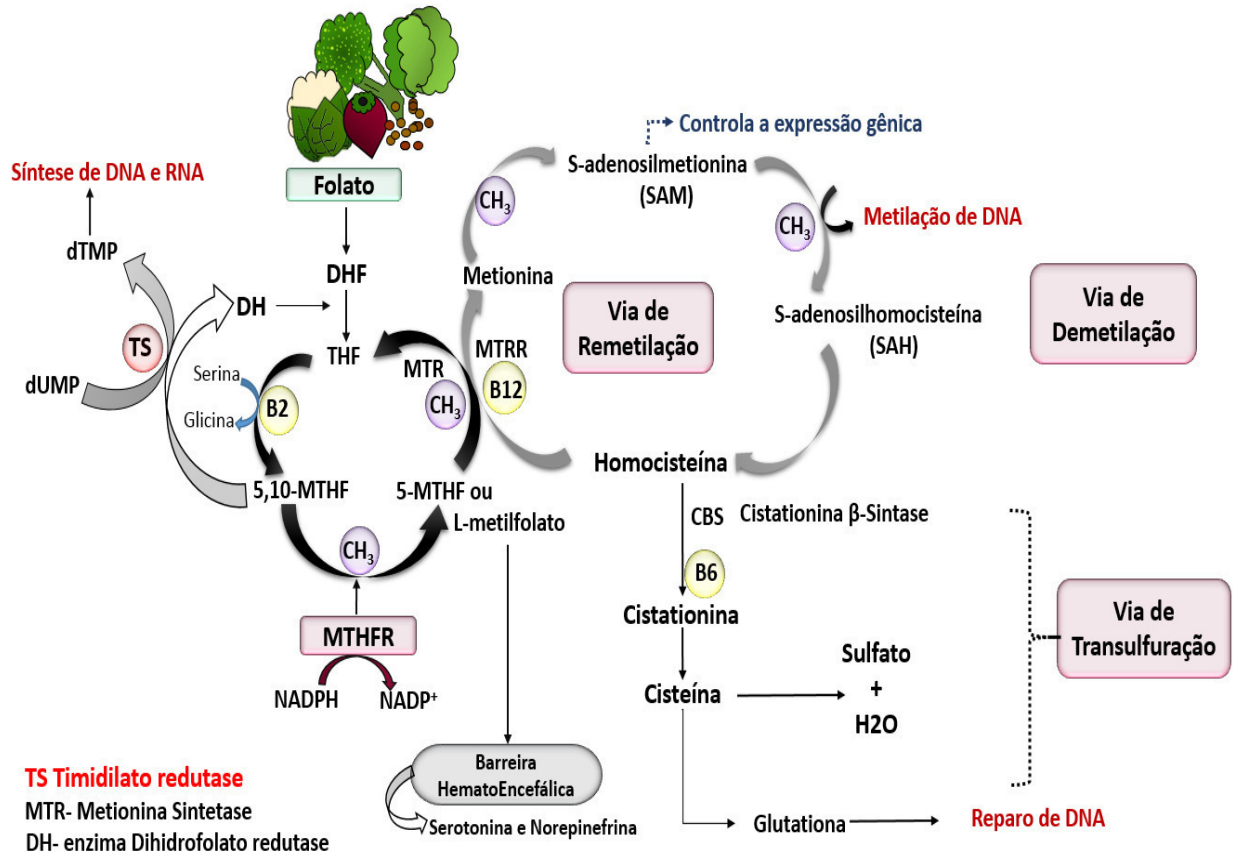
Sabe-se que não são apenas as mutações (polimorfismos) dos genes envolvidos no metabolismo do folato, dentre eles o *MTHFR*, que contribuem para a instabilidade metabólica, genômica e para o surgimento de diversas doenças, mas também as alterações epigenéticas (metilação), contribuem para modificações no epigenoma (COPPEDÉ et al., 2016).

Em estudos nutricionais e epidemiológicos observa-se que a deficiência de folato e vitamina B12, levam a diminuição da remetilação de homocisteína à metionina, elevando os níveis de homocisteína (POMILIO et al., 2016).

Modificações no metabolismo do folato (Figura 3) podem levar a deficiências congênitas, doenças cardiovasculares, osteoporose e câncer. Além do que o folato é essencial na síntese do DNA e participa das reações de metilação. Por estes motivos é necessário que haja uma regulamentação precisa e mecanismos de adaptação destas complexas reações,

essenciais para conversão do folato dietético em suas formas ativas (ORTBAUER et al., 2016).

Figura 3. Metabolismo do folato.



Fonte: Sharp; Little (2004), ilustrado por Lisboa (2016).

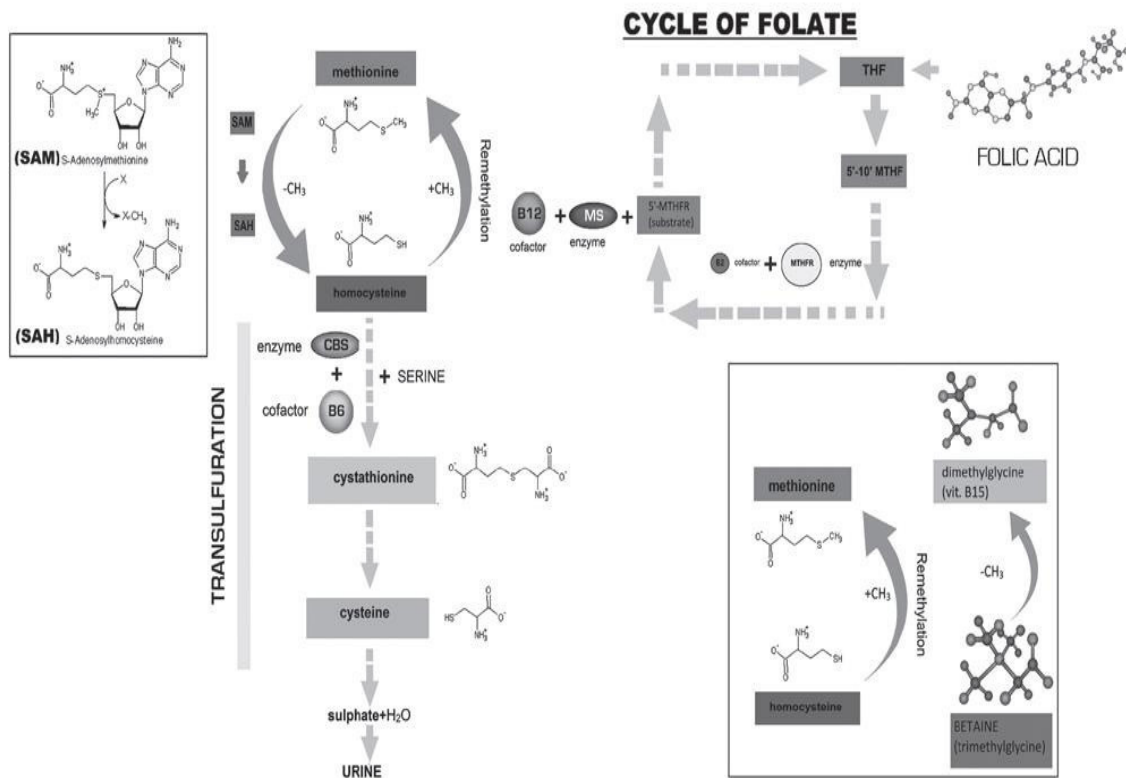
O folato está relacionado aos níveis de expressão gênica, cuja ingestão insuficiente aumenta a probabilidade de instabilidade genômica (MACFARLANEAS et al., 2015). Os padrões dietéticos vêm mudando rapidamente e substancialmente, trazendo consigo consequências como alterações epigenéticas, que podem acarretar em danos à saúde da geração atual como também das gerações futuras. (HAGGARTY, 2015).

Para que ocorra a conversão da homocisteína em metionina é necessário o auxílio de cofatores como vitamina B6, B12 e folato, do contrário, havendo um déficit destas vitaminas, a conversão não ocorre, acarretando em níveis séricos de homocisteína elevados (MOLL; VARGA, 2015).

O folato tem um importante papel no bom funcionamento da metileno-tetra-hidrofolato redutase (MTHFR), uma vez que a mesma necessita desta vitamina para catalisar a reação que produz 5-metili-tetra-hidrofolato, por metabolização do 5,10-metilenotetra-hidrofolato (Figura

4). O 5-metilenotetrahidrofolato doa um grupo metilo para a conversão de homocisteína em metionina numa reação catalisada pela metionina redutase. Sendo a metionina a precursora da metionina S-adenosil, que por sua vez atua como doador de grupo metilo para a maioria das reações biológicas de metilação, como a metilação do DNA (PARK et al., 2012; PEEDICAYIL, 2012; SHORTER; FELDER; VRANA, 2015).

Figura 4. A homocisteína (Hcy) / ciclo da metionina.



Fonte: Dell'edera et al. (2013).

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

Devlin et al. (2004), concluíram que a hiperhomocisteinemia em ratos, induzida por dieta está associada com a diminuição da capacidade de metilação, estando de acordo com observações em seres humanos que são homozigotos para o polimorfismo *MTHFR* 677C. Concluiu-se que o polimorfismo do gene da *MTHFR* pode afetar os níveis de metilação do DNA (TURUNEN; AAVICK; YLA-HERTTUADA, 2009; GREISSEL; CULMES; NAPIERALS, 2015).

Corroborando com os achados de Dell'edera et al. (2013) onde os indivíduos que são homozigotos para o códon 677 polimorfismo (TT) demonstram hipometilação do DNA em

leucócitos do sangue periférico, sendo este resultado particularmente encontrado quando os níveis de folato apresentaram-se baixos.

Recentemente, Xuefeng et al. (2016), objetivando esclarecer a relação entre polimorfismo do gene *MTHFR* e o nível de metilação do genoma, compararam o nível de metilação em linha-1 em diferentes genótipos. Comprovando uma correlação entre estes níveis e o polimorfismo *MTHFR* C6667T, demonstrando ainda que os níveis de metilação do genótipo TT e CT foram inferiores aos do genótipo CC.

Ho et al. (2016) investigaram a articulação dos efeitos genéticos (polimorfismos) e epigenéticos, ao avaliarem os polimorfismos *DNMT3B* c.26-1045G>T, *MTHFR* c.665C>T e c.1286A>C e a metilação do DNA de 66 e 28 locais CPG do *DNMT3B* e *MTHFR*, respectivamente, que são associados ao risco de adenoma colorretal. Chegaram à conclusão que não houve associações significativas entre o polimorfismo do gene *MTHFR* e risco de adenoma colorretal e que a média de representações da metilação do DNA dos referidos genes também não foi associada com o risco de adenoma colorretal, onde apenas os níveis de metilação do DNA no gene *DNMT3B* foram associados a um aumento da probabilidade de adenomas colorretais.

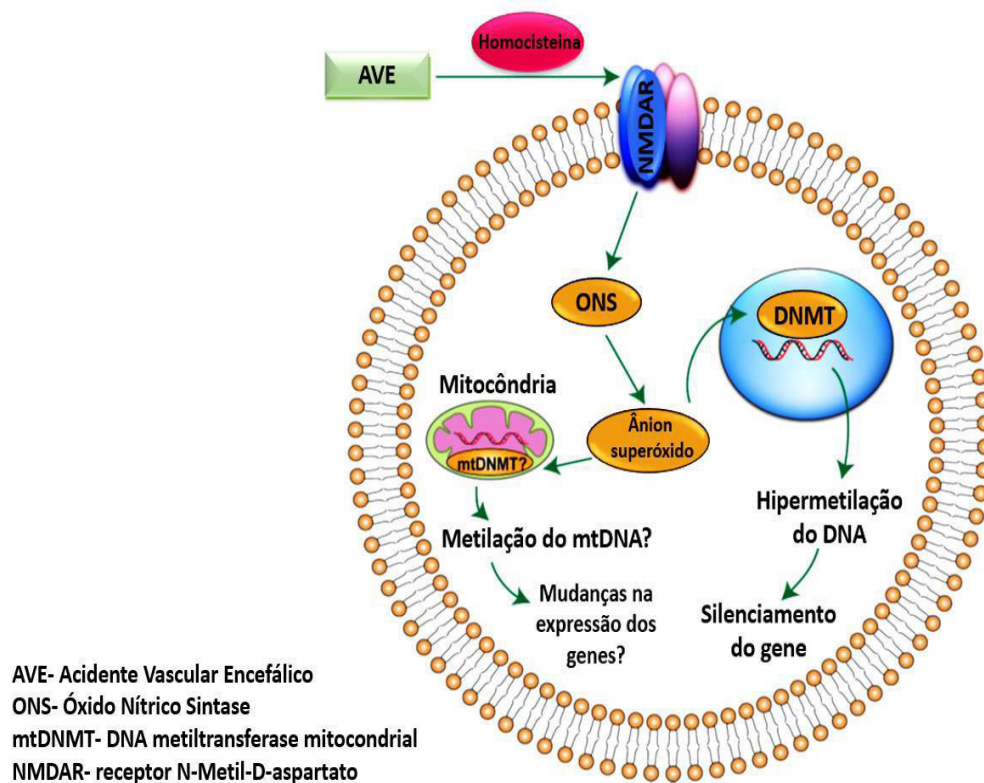
Os estudos de variação genética humana referentes ao ciclo doador de metila tem em grande parte o foco na metilenotetrahidrofolato redutase (*MTHFR*) (ANDERSON et al., 2013).

No estudo realizado por Morais et al. (2015), de caráter transversal com 115 adolescentes com sobrepeso e obesidade, ao investigarem possíveis relações entre polimorfismo no gene *MTHFR* (metilenotetrahidrofolato redutase), níveis de homocisteína, ácido fólico, vitaminas B6 e B2 e perfil lipídico, observaram uma prevalência significativa de hiperhomocisteinemia, alterações no perfil lipídico, bem como baixos níveis de vitamina B6. Sendo a presença do alelo T do *MTHFR* C677T um fator que influenciou nas concentrações plasmáticas de vitamina B6 e colesterol LDL.

Zhao et al. (2016), apresentaram um painel de estudos descrevendo eventos epigenéticos correlacionados ao pós Acidente Vascular Cerebral Isquêmico, incluindo os mecanismos epigenéticos induzidos por Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), e Hiperhomocisteinemia (HHcY). O N-metil D-aspartato (NMDAR) é mediador do estresse oxidativo relacionado à HHcY, fator chave para a regulação epigenética da cadeia vascular neural, após o acidente vascular cerebral isquêmico (DINIZ et al., 2016).

A (figura 5) ilustra a junção de recentes pesquisas epigenéticas e a descoberta de proteínas idênticas às histonas nas mitocôncrias e os autores sugerem novas e promissoras áreas para a mito-epigenética, tendo em vista que esta organela desempenha um papel crucial após a lesão isquêmica decorrente da geração expressiva de ROS, que por sua vez danificam as células neurais. Sendo assim a mito-epigenética relacionada com a HcY durante a isquemia sugere ser uma área terapêutica promissora (ZHAO et al., 2016).

Figura 5. Representação esquemática dos mecanismos propostos de hiperhomocisteinemia (HHcy) desencadeando modificações epigenéticas após AVC.



Fonte: Zhao et al. (2016).

Alguns genes desempenham um importante papel frente à inflamação e ao estresse oxidativo tais como, *CD14*, *Et-1*, *iNOS*, *HERV-w* e *TNF α* . Sendo assim com base na avaliação das alterações na metilação dos mesmos, induzidas por nutrientes da dieta, juntamente com parâmetros sanguíneos de colesterol total (CT), lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL), triglicerídeos (TG) e homocisteína (HCY), os pesquisadores sugerem uma associação positiva entre a metilação do gene *TNF α* com o colesterol LDL, com a relação CT/ HDL e LDL/ HDL. Bem como a associação positiva e significativa entre metilação do *HERV-w* e ingestão de β -caroteno e carotenoides, componentes considerados antioxidantes (BOLLATI et al., 2014).

O estresse oxidativo surge de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, decorrentes da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção dos mesmos. Tal processo leva a modificações oxidativas de proteínas, lipídios e DNA que conseqüentemente conduz a perda de suas funções biológicas e desequilíbrio homeostático, cujo resultado é o potencial dano oxidativo contra células e tecidos (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004; QIHAN; XIAOHUA, 2015).

O estresse oxidativo participa da fisiopatologia de diversas doenças, incluindo a diabetes, câncer, doenças cardiovasculares e doenças neurodegenerativas (DAWARE; PANDIT, 2012; ELAHI et al., 2014), podendo ser modulado através de mudanças nos padrões de metilação, que levam ao estado de obesidade (YARA; LAVOIE; LEVY, 2015).

Buscando haver uma provável relação entre o estresse oxidativo e danos no DNA e RNA, Cejvanovic et al. (2016), investigaram uma população constituída de indivíduos do sexo masculino, distribuídos em três grupos. Destes 63 eram obesos hipertensos, 40 eram obesos normotensos e 27 apresentavam-se magros e normotensos. A análise foi feita a partir da excreção urinária de 24 horas de marcadores de estresse oxidativo para o DNA e RNA, e concluíram que a obesidade esta associada a danos no RNA, com níveis de oxidação aumentados em 30%, não apresentando diferenças nos valores de estresse oxidativo para DNA ou RNA nos indivíduos com ou sem hipertensão.

O sistema de defesa antioxidante tem como função primordial, manter o processo oxidativo dentro dos limites fisiológicos e passíveis de regulação, evitando que os danos oxidativos se alastrem, sendo que os mecanismos de geração de radicais livres ocorrem, principalmente, nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma (BARBOSA et al., 2010).

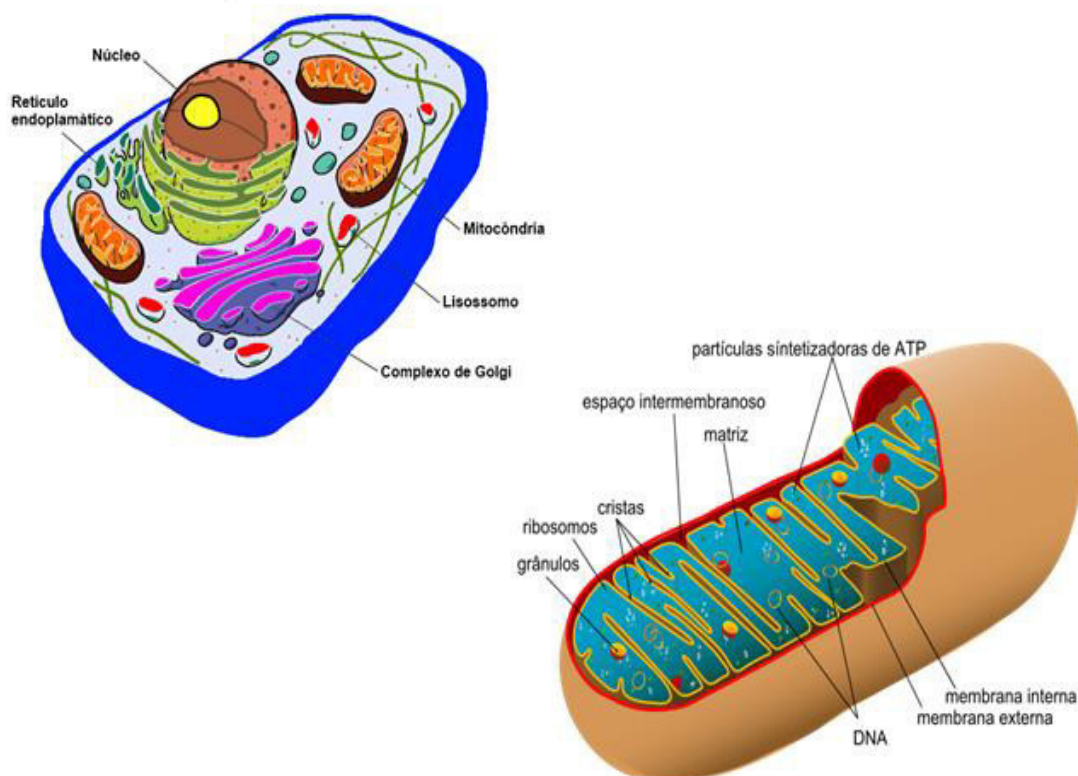
2.3 Estresse Oxidativo e Epigenética

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

A mitocôndria (Figura 6), é considerada a principal organela celular envolvida no metabolismo oxidativo, nela atua uma variedade de enzimas que catalisam as etapas desse

processo. Em resposta a cada uma dessas etapas há a formação de subprodutos que, em grande parte têm efeitos benéficos. A menor parte desses subprodutos que corresponde aproximadamente a 5%, quando em altas concentrações podem ser tóxicos para as células. Quando ocorre o transporte de elétrons na mitocôndria o oxigênio é reduzido, gerando espécies reativas de oxigênio (EROS), denominadas ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^-) (SILVA; JASIULIONIS, 2014).

Figura 6. Mitocôndria, organela celular.



Fonte: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAFqUAD/principais-organelas>.

Lane et al. (2014), induziram quimicamente o estresse oxidativo de espermatozoides em modelos animais, através da exposição do esperma a 1.500 μM de H_2O_2 , objetivando investigar se essa exposição era prejudicial a saúde do embrião, se gerava complicações durante o período gestacional e se afetava a saúde da prole. Concluíram que o tratamento do esperma com o H_2O_2 gerou um déficit no desenvolvimento embrionário, sendo mais notável na prole do gênero feminino. Como também, ganharam significativamente mais tecido adiposo e tornaram-se intolerantes a glicose, quando comparadas com a prole controle.

As espécies reativas de oxigênio (ROS) e reativas de nitrogênio (RNS) possuem níveis

elevados de reatividade, podendo desempenhar dupla função biológica ocasionando efeitos benéficos ou prejudiciais aos sistemas vivos. Contudo existem mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos atuantes na eliminação dos efeitos deletérios das ROS (SUZEN; GURER-ORHAN; SASO, 2017).

O sistema enzimático inclui as enzimas superóxido desmutase (SOD), glutatona peroxidase (GPX) e catalase (CAT). Estas enzimas estão envolvidas em mecanismos de prevenção, controlando e impedindo a formação de radicais livres e a ocorrência de danos oxidativos (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004). Já o sistema não enzimático inclui os compostos de origem dietética com destaque para: vitaminas, minerais e compostos fenólicos (PRASAD et al., 2007).

O desequilíbrio homeostático entre os mecanismos de geração de radicais livres e a ação dos agentes do sistema de defesa antioxidante contribuem para a formação de peróxidos e radicais livres. A produção de peróxidos e radicais livres geram comprometimentos na fisiologia e função celular, o que implica em alterações genéticas podendo levar ao surgimento de doenças crônicas não transmissíveis tais como câncer, diabetes, fibrose cística e doenças cardiovasculares, como também a síndrome metabólica (YARA; LAVOIE; LEVY, 2015).

A proteína reguladora do estresse oxidativo (p53) participa da estabilidade do sistema redox, sendo regulada por alterações transcricionais, de tradução, eventos envolvendo mRNA e modificações pós- traducionais como metilação, fosforilação e acetilação. Estes mecanismos pós-traducionais aliados a outros fatores que se ligam a p53, ajudam na sua modulação e estabilidade. Dependendo da ocorrência destes eventos a p53 pode diminuir ou aumentar os níveis de estresse oxidativo, considerando assim um fator de impacto sobre o controle ou progressão da obesidade, síndrome metabólica e diabetes (SPAHIS; BORYS; LEVY, 2017).

Níveis elevados de espécies reativas de oxigênio (ROS), quando excedem a capacidade antioxidante desencadeiam o estresse oxidativo, que por sua vez está envolvido nas diversas e principais etapas da carcinogênese. A epigenética, assim como o estresse oxidativo, exerce influência significativa no surgimento do câncer através da metilação do DNA, modificações de histonas pós-tradução e alterações pós-transcrição mediadas por miRNA (LI et al., 2016).

Segundo Mahalingaiah; Ponnusamy; Singh, (2016), alterações epigenéticas nos mecanismos de metilação do DNA desempenham um importante papel no desenvolvimento

de câncer renal. Por se tratar de mecanismos reversíveis, compreender a regulação epigenética na transformação das células epiteliais renais, servirá para elaborar estratégias de prevenção, assim como para tratar nos estágios iniciais o carcinoma de células renais.

Os estudiosos acima citados objetivaram avaliar o papel das alterações epigenéticas na transformação maligna induzida pelo estresse oxidativo em culturas celulares *in vitro*, bem como em modelos animais. Através da análise de alterações na expressão de genes envolvidos na metilação do DNA destas células, por meio da PCR quantitativa em tempo real, observaram um aumento estatisticamente significativo na expressão do DNMT1, DNMT3a e MBD4 em células alteradas OT-HK2-2 e células adaptadas ao estresse oxidativo AO-HK-2.

Alguns componentes dietéticos como por exemplo os polifenóis funcionam como quimioprotetores e moduladores epigenéticos, invertendo e prevenindo alterações no epigenoma, inerentes ao câncer, segundo resultados encontrados em um painel de estudos. Concluindo que a via desintoxicante mediada pelo fator de transcrição nuclear 2 (Nrf2), pode sofrer intervenções epigenéticas de inativação, assim como outros genes que atuam na prevenção do câncer, contudo os fitoquímicos têm a finalidade de modular mecanismos epigenéticos e ativar o fator Nrf2 (LI et al., 2016).

Os biomarcadores utilizados para avaliar o estresse oxidativo *in vivo*, cada vez mais nos últimos anos têm sido alvo de interesse de diversos pesquisadores, tendo em vista o importante papel que desempenham no que diz respeito ao estilo de vida, na gênese de enfermidades e na avaliação de diferentes tratamentos. O fato de que os radicais livres são biomoléculas que possuem meia-vida curta (da ordem de poucos segundos), sua medição *in vivo* é encarada como sendo um procedimento desafiador. Em contrapartida os derivados de oxiradicais (peróxido de hidrogênio ou hidroperóxido de lipídeos) são considerados estáveis e com meia-vida longa podendo ser medidos e monitorados repetidamente (CZERSKA et al., 2015).

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

A capacidade antioxidante total (CAT) resulta da soma de antioxidantes endógenos e exógenos, fornecendo um panorama completo da capacidade antioxidante. Tornando-se um marcador bioquímico de grande importância quando comparado com parâmetros antioxidantes individual, tendo em vista que os antioxidantes têm ação simultânea sistêmica

no combate aos danos oxidativos causados por radicais livres (RANI; MYTHILI, 2014). Diferentes abordagens são utilizadas para determinar a CAT, são elas espectrofotometria, em nosso caso, espectroscopia de quimioluminescência, a espectroscopia de fluorescência, e técnicas cromatográficas relacionada (TIRAWATTANAKOSON et al., 2016).

O CAT é um dos marcadores do estresse oxidativo mais utilizados para avaliar o equilíbrio radical-antioxidante, a partir da análise de um substrato oxidável como por exemplo plasma, saliva, sêmen, lipídios e sondas fluorescentes, com um oxidante, a fim de se obter um nível máximo de oxidação, seja na ausência ou na presença da amostra antioxidante a ser avaliada. O grau da inibição oxidativa irá definir o quantitativo da amostra antioxidante que oferece um determinado grau de proteção. A CAT é aplicada ainda em bebidas, alimentos e diversos produtos biológicos (FRAGA; OTEIZA; GALLEANO, 2013).

A capacidade antioxidante total é utilizada para medir a taxa de redução de ferro (Fe^{3+}) em sua forma ferrosa (Fe^{2+}), na presença de antioxidantes. Se houver aumento da capacidade intrínseca de absorção, indica também um aumento da capacidade antioxidante. Desta forma um estudo de caso-controle foi realizado buscando estabelecer uma associação entre o selênio, estresse oxidativo e composição corporal em indivíduos recém descobertos com DM2 (Diabetes tipo 2) e um grupo controle saudável, onde utilizaram a CAT como biomarcador do estresse oxidativo (OTHMAN et al., 2016).

Os estudiosos acima descritos concluíram que quanto à composição corporal o menor IMC, CC, gordura visceral e estado de gordura corporal foram observados no primeiro tercil de selênio plasmático (38,65-80,90 g / L), já em relação aos danos oxidativos ao DNA, no segundo tercil de selênio foram significativos nos pacientes com DM2, por fim o estado de estresse oxidativo apresentou-se menor no primeiro tercil de selênio em ambos os grupos.

Estudiosos investigaram a influência de variações epigenéticas nos níveis de marcadores do estresse oxidativo relacionados ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares e diabetes mellitus 2, através da análise da metilação do DNA em células sanguíneas e de dez marcadores do estresse oxidativo, dentre estes a capacidade antioxidante total. Mapearam o genoma de 966 indivíduos na faixa etária dos 70 anos, participantes de uma coorte prospectiva e observaram 66 sítios citosina-guanina associados com um ou mais marcadores do estresse oxidativo (HEDMAN et al., 2016).

Com base nos estudos acima descritos a metilação do DNA em nove CPGs foi significativamente associada aos níveis de homocisteína, havendo ainda associação entre os padrões de metilação e glutatona total (TGSH) e glutatona reduzida (GSH), 18 e 25 CPGs

significativos, respectivamente. Já em relação à capacidade oxidante total, neste caso, não houve associação significativa.

O malondialdeído (MDA) é considerado um marcador determinante do estresse oxidativo, amplamente utilizado devido a elevada reatividade e toxicidade. Amplamente utilizado em situações clínicas sendo uma biomolécula importante e útil em investigações biomédicas (AYALA; MUÑOZ; ARGUELLES, 2014).

O MDA é uma molécula de aldeído de baixo peso, trata-se de um produto intermediário da peroxidação lipídica, utilizado com bastante frequência como um marcador na formação de radicais livres (ONCUL et al., 2017).

Mostafa et al. (2016), investigaram a relação de Mirna seminal, marcadores apoptóticos seminais e estresse oxidativo em 220 indivíduos, agrupados da seguinte forma normozoospermico (nº52), normozoospermico fértil com varicocele (nº43), oligoastenoteratozoospermia inférteis sem varicocele (nº62) e oligoastenoteratozoospermia inférteis com varicocele (nº 63). A expressão de miRNAs foi realizada usando o método de PCR quantitativa em tempo real. Constataram que a expressão do miRNA -122 seminal, miRNA-181 e miRNA- 34c5, da enzima glutatona peroxidase (GPx) e da proteína BCL2 considerada um marcador apoptótico, foi significativamente reduzida enquanto que o MDA seminal e a enzima BAX marcador apoptótico apresentaram-se significativamente aumentadas em homens oligoastenoteratozoospermia inférteis com varicocele, quando comparados aos demais grupos.

Estudiosos sugerem que o desequilíbrio do sistema antioxidante resulta no estresse oxidativo levando a infertilidade masculina. Desta forma objetivou-se identificar clinicamente o estresse oxidativo no sêmen e em frações do DNA espermático, a fim de elaborar estratégias de tratamento da infertilidade masculina. Os participantes foram divididos em dois grupos, homens férteis e inférteis, submetidos à análise dos parâmetros espermáticos, peroxidação lipídica e atividade de enzimas antioxidantes (DOROSTGHOAL et al., 2017).

Com relação aos resultados do estudo descrito acima os níveis de malondialdeído no plasma seminal foram significativamente maiores nos pacientes, quanto à atividade de superóxido dismutase e glutatona peroxidase no plasma seminal, foram significativamente menores nos homens inférteis. Já os fragmentos de DNA mostraram-se maiores em homens inférteis e significativamente correlacionados com os níveis de MDA e SOD e GPx

Hernández-Trejo et al. (2017), avaliaram biomarcadores do estresse oxidativo, a atividade de enzimas envolvidas e sua relação com os níveis de citocinas em mulheres

grávidas eutróficas, com sobrepeso, obesidade, bem como diabéticas e não diabéticas estendendo a avaliação aos seus respectivos neonatos. Concluíram que níveis plasmáticos elevados de MDA materno foi associado a níveis mais elevados de interleucinas (IL-6 e IL-7) na prole. Os marcadores de estresse oxidativo divergiram entre os da mãe e dos filhos, influenciando nos níveis de citocinas e predisposição ao estresse oxidativo e programação imunológica no metabolismo fetal, além do que a obesidade, diabetes e estresse oxidativo materno representou um efeito negativo no crescimento fetal.

2.4 Níveis Glicêmicos e Genética

Quando ocorre a metilação na região promotora do gene *MTHFR*, a expressão do mesmo é reduzida ou inibida, tendo como uma das consequências modificações no metabolismo da homocisteína. Estas alterações podem desencadear uma série de variações patológicas (GE et al., 2015).

Estudiosos avaliaram a relação do polimorfismo 677CT do gene *MTHFR* com níveis sanguíneos de homocisteína, taxa de filtração glomerular e diabetes de início em uma coorte com 2.422 indivíduos não diabéticos. Neste estudo o diabetes de início (NOD) foi definido como glicemia plasmática em jejum ≥ 126 mg/dl, onde o genótipo TT foi fortemente associado ao desenvolvimento do NOD em mulheres com maior índice de massa corporal e baixos níveis de HDL-C (QIN et al., 2015).

Pesquisadores vêm correlacionando polimorfismos do gene *MTHFR* com o risco para diversas patologias dentre elas o câncer, doenças cardiovasculares e diabetes de início (BRADSHAW et al., 2015; LIEW; GUPTA, 2015; QIN et al., 2015), mas a relação entre os níveis de metilação do gene em estudo com alterações glicêmicas, ainda é pouco compreendida.

A glicemia de jejum é obtida através de um exame realizado após um jejum de pelo menos 8 horas sem que haja o consumo de qualquer alimento ou bebida. Os valores de referência da glicemia em jejum são: normal (< 110 mg/dl), prediabetes (110mg/dl – 125mg/dl) e diabetes (≥ 126 mg/dl) (ADA, 2017).

Níveis glicêmicos elevados são causados por resistência ou produção insuficiente de insulina, podendo levar a diversos agravos à saúde tais como, doenças cardiovasculares, insuficiência renal, amputação de membros, morte prematura e depressão (WHO, 2016).

Alguns fatores genéticos, como a metilação do DNA, exercem influência na expressão gênica levando a suscetibilidade a hiperglicemia e doenças correlacionadas (WANG et al.,

2010). A exposição prolongada a altos níveis de glicose sanguínea pode afetar as assinaturas epigenômicas, desencadeando mudanças significativas na metilação do DNA de células alvos em todos os órgãos simultaneamente (JEON et al., 2017).

Pinzon-Cortes1 et al. (2017), ao compararem a metilação e hidroximetilação do DNA em células sanguíneas e a expressão gênica em importantes tecidos envolvidos no contexto patológico de indivíduos com DM2 controlados com um grupo controle saudáveis, observaram que os níveis de metilação e hidroximetilação do DNA mostrou-se aumentados no grupo dos DM2 descompensados, sendo correlacionados com a porcentagem de hemoglobina glicada, indicando impacto diretos da hiperglicemia nestas alterações.

Levando em consideração que as alterações epigenéticas como a metilação do DNA pode ser um dos mecanismos que avaliam a relação entre as exposições ambientais e o desencadear de diversas patologias, Soriano-Tárraga et al. (2015), tiveram como objetivo identificar novos sítios CPGs metilados associados à níveis glicêmicos alterados e diabetes mellitus, de tal modo que constataram uma associação entre o gene *TXNIP* e hiperglicemia, através de fatores epigenéticos.

Sendo assim, evidências atuais sugerem a potencial relação entre mecanismos epigenéticos e alterações glicêmicas, uma ligação entre a predisposição genética e influências dos fatores ambientais. No entanto as evidências são limitadas, sugerindo a necessidade de maiores investigações para determinar essas influências (MUKA et al., 2016).

3 ABORDAGEM METODOLÓGICA

3.1 Caracterização do estudo

Trata-se de um estudo de caráter transversal vinculado a uma pesquisa de base populacional intitulado “II Ciclo de Diagnóstico e Intervenção da Situação Alimentar, Nutricional e das Doenças não Transmissíveis mais Prevalentes da População do Município de João Pessoa/PB” (II DISANDNT/PB) (COSTA et al., 2014/2016), financiado pela FAPESQ/MS/CNPQ, aprovado através do edital 001/2013, que foi conduzida no período de maio de 2015 a maio de 2016 gerando um banco de dados representativo da população das zonas leste e oeste de João Pessoa para todas as faixas etárias e níveis socioeconômicos. Para tanto foram preenchidos formulários contendo informações sobre as características socioeconômicas, demográficas e epidemiológicas, hábitos de vida, consumo alimentar através de recordatórios alimentares, dados de avaliação antropométrica e exames hematológicos e bioquímicos.

3.2 Questões éticas

O protocolo de pesquisa do II DISANDNT/PB, 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).

Após a identificação das quadras sorteadas do município de João Pessoa e posterior identificação dos domicílios, 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. Para que fosse válida a participação dos indivíduos residentes nos domicílios selecionados, estes deram o seu consentimento mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A).

3.3 População e amostra

Para realização da presente dissertação, 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; BUSSAB, 2005):

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

Logo:

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

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

Considerando que a média da renda dos indivíduos adultos das zonas leste e oeste foram obtidas dos dados do I DISANDNT/JP (07/2008-01/2010), que foi de R\$ 2.213,26, com 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 desta dissertação de 265 adultos.

3.3.1 Critérios de inclusão

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

3.3.2 Critérios de exclusão

- Indivíduos com diagnóstico de distúrbios neuropsiquiátricos;

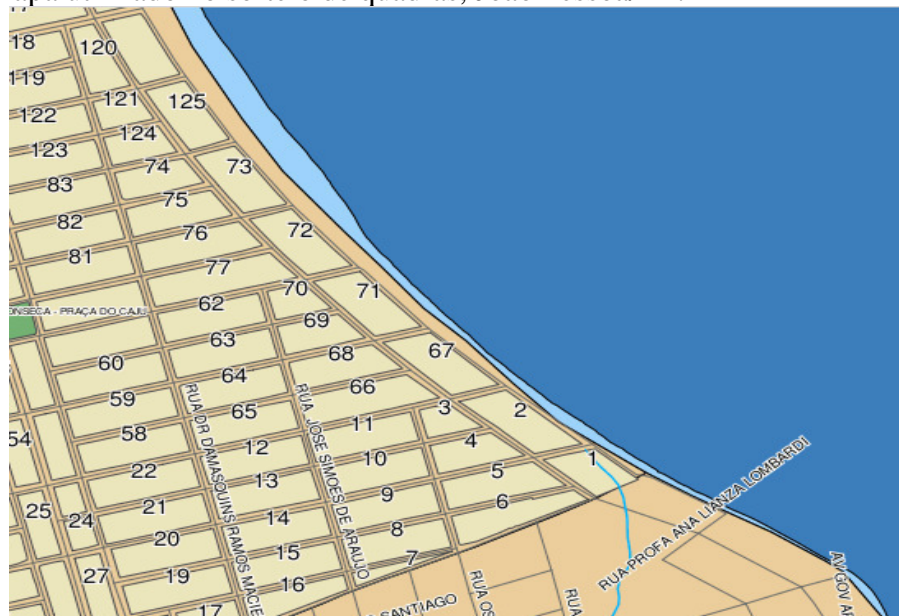
- Indivíduos usuários de suplemento de polivitamínicos, minerais, anorexígenos e anabolizantes;
- Gestantes e lactentes

3.4 Protocolo amostral

A amostra representativa dos indivíduos adultos foi selecionada nas regiões leste e oeste do município de João Pessoa com base em informações fornecidas pela prefeitura, como mapa do município, número de quadras por bairro (Figura 8) e dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010).

O cálculo da casuística foi baseado em um procedimento amostral único, composto em níveis. Devido a presença de heterogeneidade sobre a variável "renda" e a relação existente entre renda, prevalência de doenças e nutrição (KAC et al., 2007), utilizou-se uma amostragem estratificada (COCHRAN, 1953) 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 7. Mapa utilizado no sorteio de quadras, João Pessoa/PB.



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

Quadro 1. Critérios para estratificação final da amostra.

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

Fonte: II DISANDNT/JP, 05/2015-05/2016. *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 distribuindo a amostra proporcionalmente, conforme quadro 4, onde obteve-se o n de quadras por zona de acordo com seu estrato. Para obter o peso de cada estrato utilizou-se a seguinte fórmula (SILVA; 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	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

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

Como observa-se no quadro 2, na zona leste nenhum bairro se enquadrou no estrato 1 e na zona oeste nenhum bairro se enquadrou no estrato 4.

Assim, o total de bairros que foram visitados correspondentes as 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, 05/2015-05/2016.

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 9 e 10.

As equipes treinadas, após reconhecerem a quadra sorteada, foram instruídas a selecionar todos os domicílios da quadra a serem visitados.

As quadras que não apresentaram residências, as residências em que os responsáveis não aceitaram participar da pesquisa e a quantidade de indivíduos que não aceitaram participar nas residências sorteadas foram computadas e realizado um novo sorteio de quadras aleatoriamente, 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 do consumo alimentar, antropometria, avaliação bioquímica e marcas epigenéticas.

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

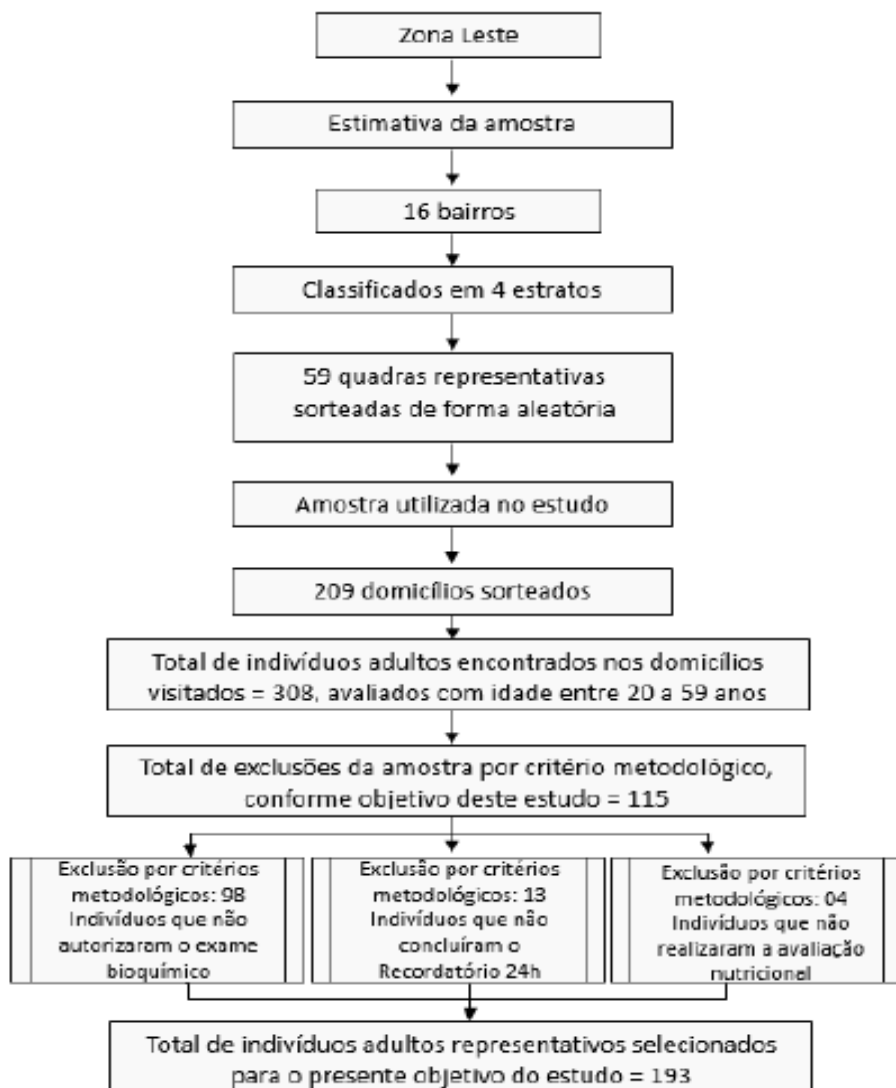
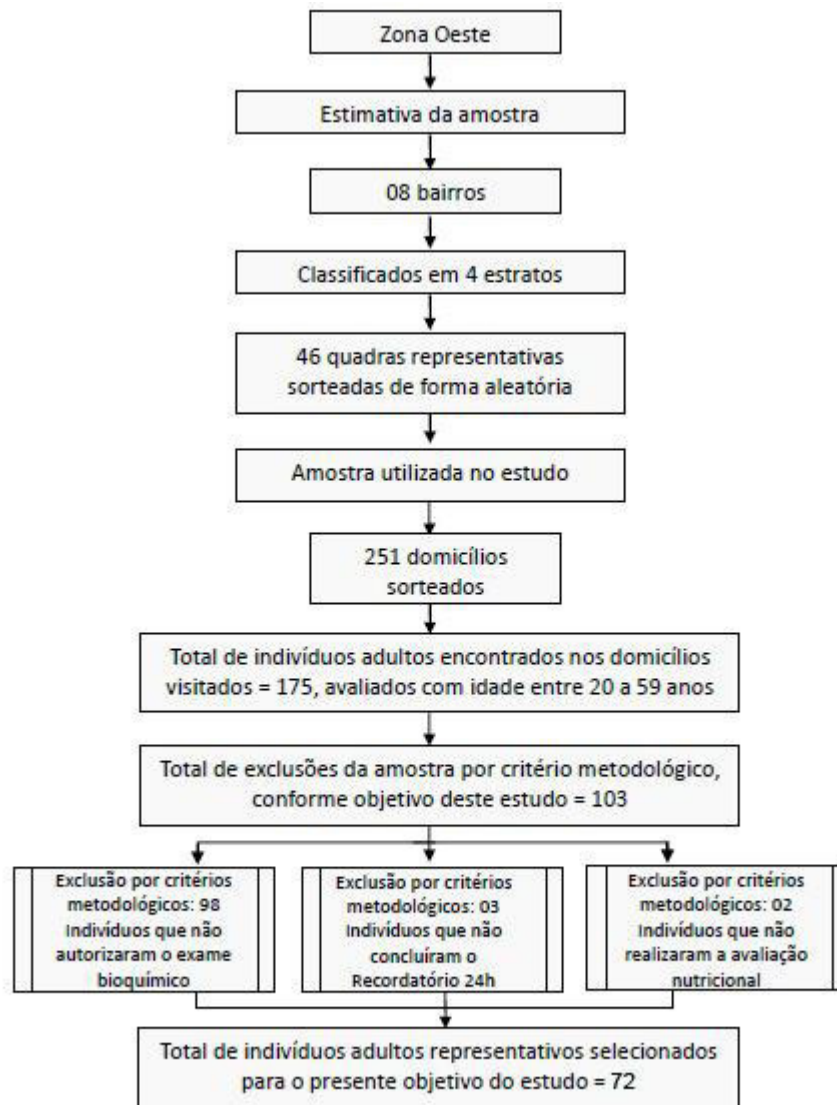


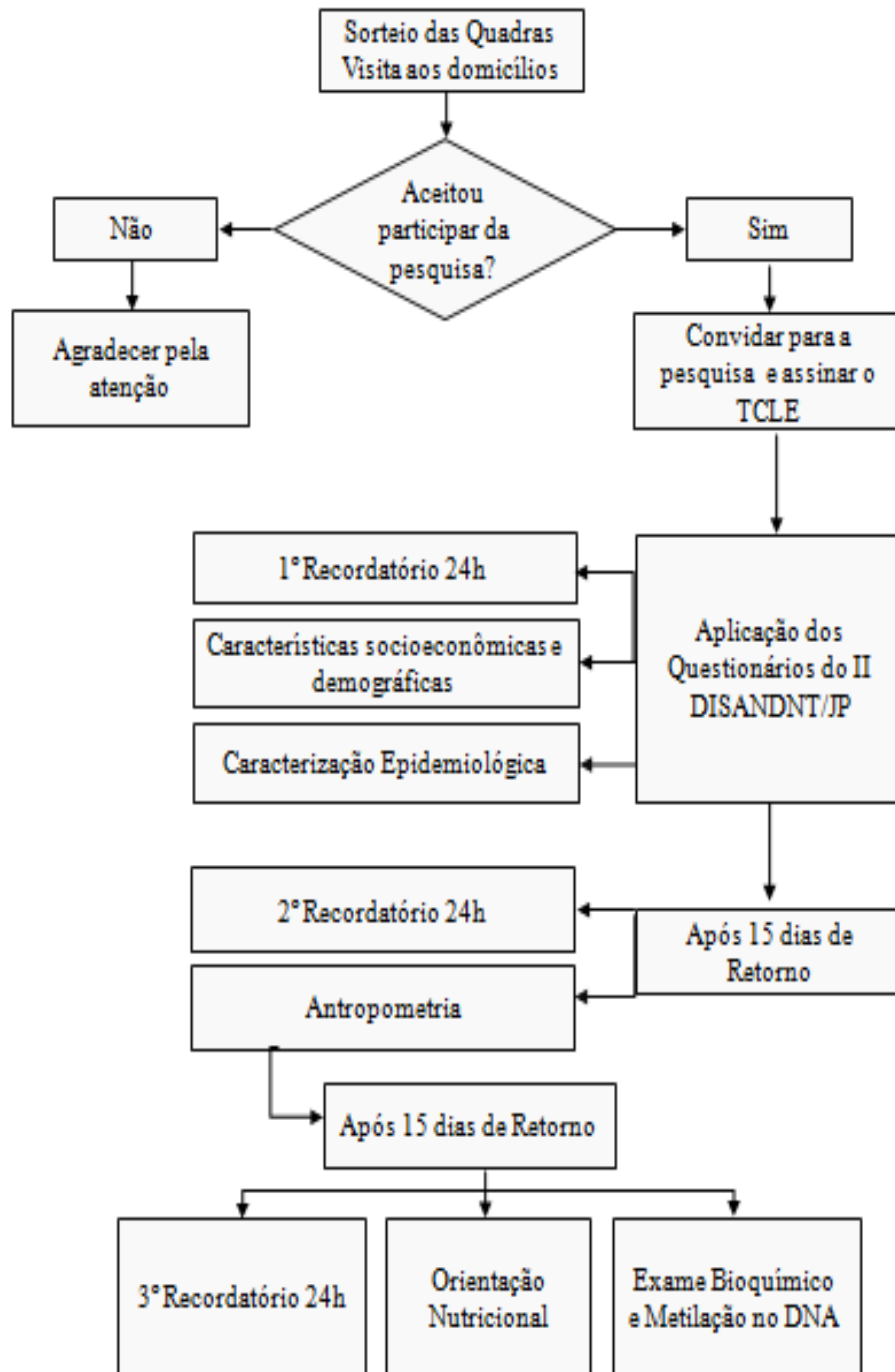
Figura 9. Diagrama dos cálculos para definição da amostra da Zona oeste do município de João Pessoa.



3.5 Coleta de dados

As visitas domiciliares e a aplicação dos questionários da pesquisa foram realizadas por equipes de pesquisadores graduandos do Curso 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 e após realização do estudo piloto, seguindo o protocolo descrito na figura 11.

Figura 10. Fluxograma da coleta de dados.



3.6 Avaliação antropométrica

As medições de peso e altura foram realizadas em triplicado, e utilizou-se a média dos três valores. A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda os seguintes pontos de índice de massa corporal de corte para classificar o estado de peso em adultos de 20 a 59 anos de idade: <math> < 18,5 \text{ kg} / \text{m}^2 </math> (baixo peso), $18,5\text{-}24,9 \text{ kg} / \text{m}^2$ (peso normal), $25,0\text{-} 29,9 \text{ kg} / \text{m}^2$

(excesso de peso), 30.0-39.9 kg / m² (obesidade), e ≥ 40 kg / m² (extremamente obesas) (WHO, 2000).

Os indicadores utilizados para determinar o estado de obesidade abdominal foram circunferência da cintura e relação cintura / quadril (RCQ). A Associação Americana do Coração recomenda pontos de corte da circunferência da cintura de determinação do estatuto da obesidade abdominal como ≥ 102 cm em homens e ≥ 88 cm em mulheres (GRUNDY; CLEEMAN; DANIELE, 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).

3.7 Avaliação do consumo alimentar

A avaliação do consumo alimentar foi realizada utilizando o Recordatório 24 Horas (R24h). Este inquérito alimentar foi aplicado três vezes no intervalo de quinze dias, tendo sido contemplado um dia do final de semana. Para preenchimento do R24h, os indivíduos referiram dados que incluem: hora, identificação do alimento ou bebidas consumidas; as características detalhadas dos alimentos como o tipo, ingredientes que compõem as preparações, marca, forma de preparo e identificação da quantidade consumida, de acordo com o tamanho da porção e medidas caseiras.

Com o auxílio de 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), foram aplicados os recordatórios 24 horas, os alimentos mencionados nos R24h foram transcritos e padronizados em um documento auxiliar. Todos os alimentos foram convertidos em gramas com auxílio do manual de porções média em tamanho real baseado no programa Dietsys para estudo de base populacional (ASCIUTTI et al., 2005).

As preparações dos alimentos foram desmembradas segundo seus ingredientes e quantidades. Os alimentos foram avaliados pelo software de Nutrição, Dietwin 2013. 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 para o cálculo do folato, CENEXA, Alemã, Repertório Geral dos Alimentos, Fichas técnicas de receita.

Utilizou-se neste estudo, o Método de múltiplas fontes (Multiple Source Method -

MSM), on line, disponível no site (<https://msm.dife.de/tps/msm/>). O MSM é uma técnica estatística proposta pela European Prospective Investigation into câncer and Nutrition (EPIC) (MSM, 2012), esse método engloba dois modelos de regressão, um para os dados positivos de ingestão diária e outra para o caso de consumo esporádico, e é aplicável para nutrientes e ingestão de alimentos.

3.8 Estilo de vida

Para avaliação do estilo de vida foram consideradas a prática de atividade física, ingestão de álcool, hábito de fumar e morbidades. Os participantes foram questionados sobre a prática de atividade física (sim ou não), quanto à frequência desta de acordo com o número de vezes por semana, tempo da realização da atividade em minutos e a modalidade, informações sobre consumo de álcool (com que frequência se consumia 6 porções ou mais de bebida alcoólica em uma ocasião) (COSTA et al., 2014/2016).

Em relação ao tabagismo, os indivíduos foram indagados quanto ao hábito de fumar, ou seja, se eram fumantes (sim ou não) se fumou até os últimos seis meses, ou ex-fumantes e quando deixaram de fumar; caso fumantes, o número de cigarros consumidos por dia, semana ou mês.

Perguntou-se também sobre as morbidades referidas (hipertensão, diabetes, obesidade, doença cardiovascular e dislipidemia), se foram diagnosticadas por médico, seja do serviço público ou privado, e se fazia uso de medicamentos, sobretudo, de interesse para esta pesquisa, o uso de anti-inflamatórios e aspirina. Todas as informações foram obtidas através do questionário de caracterização epidemiológica (ANEXO D).

3.9 Análises bioquímicas

Todos os indivíduos foram informados sobre a necessidade de jejum de 12 horas antes da coleta de sangue, por meio de ligação para realizar o agendamento do dia e horário. As coletas sanguíneas foram realizadas nos domicílios por enfermeira com plena experiência em coleta sanguínea. Esta foi realizada nos indivíduos adultos de ambos os sexos, ao término da aplicação do terceiro recordatório.

Para a coleta das amostras sanguíneas foram utilizados em tubos estéreis 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.

3.9.1 Capacidade de antioxidante total (CAT)

A avaliação da capacidade antioxidante total foi feita por meio de DPPH (1,25 mg diluído em 100ml de etanol e mantido sob proteção de luz). Para análise, 100 μ l de plasma foram adicionados a 3,9 ml de solução DPPH, agitado em vórtex, colocado em repouso por 30 minutos e em seguida centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos a 20° C. O sobrenadante foi usado para leitura em espectrofotômetro em 515 nm de comprimento de onda, usando água destilada como branco. O resultado é expresso em percentual de atividade antioxidante (0 – 100%). Sendo estas análises realizadas no Laboratório de Estudos do Treinamento Físico aplicado ao desempenho e a saúde, do Departamento de Educação Física da Universidade Federal da Paraíba.

3.9.2 Malondealdeído (MDA)

A atividade oxidante foi quantificada por meio da reação do ácido tiobarbitúrico (TBARS) com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos, conforme método descrito por Ohkawa; Ohishi; Yagi (1979). Para isso, 250 μ l do plasma foi adicionado a KCl e incubado em banho maria a 37° C por 60 minutos. Em seguida, a amostra foi precipitada com ácido perclórico AA 35% e centrifugada a 14000 rpm por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi transferido para novos microtubos onde foi adicionado 400 μ l de ácido tiobarbitúrico a 0,6% e incubado de 95° - 100° C por 30 minutos. Após resfriamento, o material foi lido em espectrofotômetro ultravioleta (Bioespectro, modelo SP 22, Brasil) a um comprimento de onda de 532nm. O valor de referência é de 2,3 a 4,0 μ mol/L. Sendo estas análises realizadas no Laboratório de Estudos do Treinamento Físico aplicado ao desempenho e a saúde, do Departamento de Educação Física da Universidade Federal da Paraíba.

3.9.3 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 alto desempenho (HPLC – *high performance liquid chromatography*) com detecção fluorimétrica e eluição isocrática .

Esse método consiste na separação do plasma através do uso de anticoagulante EDTA na coleta de sangue e posterior centrifugação. O plasma é tratado com agente redutor tris-carboxietilfosfina (TCEP) para separação da homocisteína em duas moléculas de Hcy e daquelas ligadas a proteínas plasmáticas, permitindo a quantificação da Hcy total. Após a

interrupção da reação e precipitação das proteínas com ácido tri-cloro acético (TCA), centrifuga-se novamente para separação das proteínas. O sobrenadante é transferido para outro recipiente para reagir com o agente 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulfonato (SBD-F), específico para marcação fluorescente do átomo de enxofre. Após incubação, o produto é injetado em um HPLC utilizando coluna de fase reversa, ocorrendo à 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).

3.9.4 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.

3.9.5 Vitamina b12

O método de Quimioluminescência foi utilizado para os procedimentos de análise das concentrações séricas de ácido fólico, cujo valor de referência > 3.10 ng/mL e a sensibilidade analítica de 0.5 ng/mL, realizadas no Laboratório Clínico Roseanne Dore. As concentrações séricas de vitamina B12 foram avaliadas através por imunoensaio de electroquimioluminescência com valor de referência de 180 pg/mL a 914 pg/mL.

3.10 Isolamento do DNA e análise dos níveis de metilação

3.10.1 Obtenção da amostra e Extração do DNA a partir do sangue

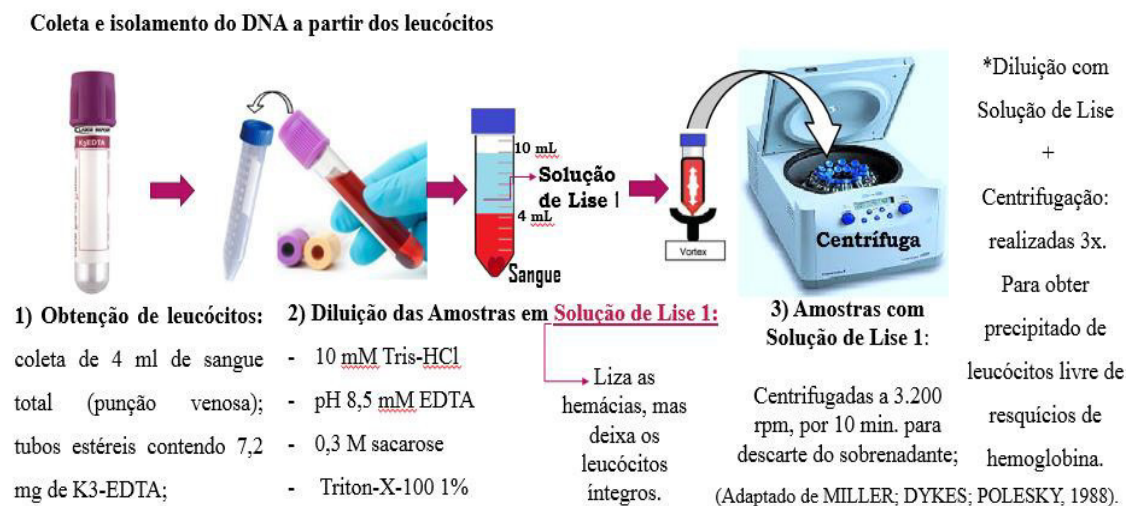
A etapa inicial de extração do DNA foi realizada no Laboratório de Genética Molecular Humana do Departamento de Biologia Molecular da Universidade Federal da Paraíba (CCEN/UFPB).

Com o auxílio de um *Vacutainer*® com EDTA, 5mL de sangue total foi obtido por indivíduo. As amostras foram diluídas em uma primeira solução de lise, contendo 10mM Tris-HCl pH 8,5 mM EDTA, 0,3 M sacarose, Triton-X-100 1% afim de lisar as hemácias deixando, no entanto, o conteúdo dos leucócitos íntegros. Em seguida foram centrifugadas à 3.000 rpm para descarte do sobrenadante. Esse processo foi repetido diversas vezes até ser obtido um precipitado de leucócitos livre de resquícios de hemoglobina. O precipitado foi suspenso novamente em solução de lise contendo 10 mM Tris-HCl pH8,5 dodecil sulfato de sódio (SDS), 5mMEDTA, 0,2 µg de proteinase K (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e

incubado a 55°C em banho –Maria.

Após 7 horas de incubação adicionou-se 500 µl de uma solução aquosa de 1 mM EDTA e 7,5 M acetato de amônio. A mistura foi centrifugada por 10 min a 14.000g a 4°C, sendo 700 µl do sobrenadante transferido para novo tubo, no qual foi realizada precipitação do DNA com 540 µl de isopropanol. Logo após o precipitado de DNA foi lavado com 70% etanol, centrifugado (12.000g por 5 min), seco e ressuscitado em tampão Tris-EDTA pH 8,0 (MILLER: DYKES; POLESKY, 1988). De acordo com a figura 12. O DNA genômico foi quantificado Qubit™ 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 11. Coleta e isolamento do DNA a partir dos leucócitos.



Coleta e isolamento do DNA a partir dos leucócitos

O precipitado de leucócitos livre de resquícios de hemoglobina será:

4) Ressuscitado em Solução de Lise 2 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);

5) Incubado a 55°C em banho-maria por 7 horas;

6) Adicionou-se 500 µl de uma solução aquosa de 1 mM EDTA e 7,5 M acetato de amônio;



7) A mistura será centrifugada por 10 min a 14.000g a 4°C;

9) O precipitado de DNA será lavado com etanol a 70%, centrifugado (12.000 força g por 5min), seco e ressuscitado em tampão Tris-EDTA

pH 8,0.

8) 700 µl do sobrenadante será transferido para novo tubo onde será realizada precipitação do DNA com 540 µl de isopropanol.

(Adaptado de MILLER; DYKES; POLESKY, 1988).

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

3.10.2 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 Epiect (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de DNA diluídas em RNA-freewater (20 µl), 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 Epiect (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 500 µl de Buffer BD (desulfonation buffer) e duas com 500 µl 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.

3.10.3 Níveis de metilação

As amostras de sangue foram obtidas às 08:30 am \pm 10 (min) em todos os indivíduos para evitar um efeito potencial de amostragem. O ADN foi isolado utilizando TRIS-HCl 10 mM, de acordo com o protocolo descrito e adaptado (19). O ADN genómico foi modificado por bissulfito do kit de conversão de bissulfito Cells-to-CpG™ (Applied biosystems, Life Technologies, Califórnia) de acordo com as instruções do fabricante. A amplificação por PCR e a análise de High Resolution Melting (HRM) foram realizadas sequenciamento no software Applied Biosystems 7500 Fast System.

A PCR foi realizada num volume total de 20 contendo: 1x tamp, 4 mM Mg + 2, 200 de cada dNTP (Qiagen), 250 nM de cada iniciador com as sequências dos primers para o gene *MTHFR* (Forward: F- 5'-GGTCAGAAGCATATCAGTCATGAG3' e Reverse: 5'CTGGGAAGAACTCAGCGAACTCA), 5 µM de SYTO®, 9Dye (INVITROGEN), 1U de polimerase de ADN HotstarTaq (Qiagen) e 1 µl de ADN genómico convertido em bissulfito.

O programa qPCR consistiu de uma ativação enzimática inicial a 95 ° C por 10 min, seguido por 50 ciclos de 45 s a 95 ° C, 45 s a 58 ° C e 45 s a 72 ° C e uma extensão final a 72 ° C por 10 min. As curvas de fusão foram normalizadas pelo cálculo da 'linha de melhor

ajuste' entre duas regiões de normalização antes e após a diminuição da fluorescência principal representando a fusão do produto de PCR usando o software fornecido com o HRM, PCR em tempo real rápido Applied Biosystems 7500 Software do Sistema v 2.0.

3.11 Tratamento estatístico

Para alcançar os objetivos propostos, foi realizada inicialmente uma análise descritiva das características da amostra representada pela frequência simples utilizando medidas de tendência central e de dispersão (média e desvio padrão). Os dados foram avaliados quanto à normalidade utilizando o teste de Lilliefors, que é um derivado do teste de Kolmogorov-Smirnov (SIEGEL, 1977). A análise estatística foi desenvolvida através do Software STATA 13. Para identificar a existência de relação no que diz respeito aos níveis de metilação do gene *MTHFR* foram propostos os seguintes modelos de regressão linear múltipla.

Modelo 1: Análise de regressão múltipla e relação dos níveis de metilação do gene *MTHFR* com estilo de vida e marcadores bioquímicos.

Níveis de metilação = $\beta_0 + \beta_1 * \text{sexo} + \beta_2 * \text{idade} + \beta_3 * \text{fumo} + \beta_4 * \text{bebida alcoólica} + \beta_5 * \text{atividade física} + \beta_6 * \text{IMC} + \beta_7 * \text{glicemia de jejum} + \beta_8 * \text{homocisteína} + \beta_9 * \text{CAT} + \beta_{10} * \text{MDA} + \beta_{11} * \text{ácido fólico} + \beta_{12} * \text{vitamina B12}$.

Modelo 2: Análise de regressão múltipla e relação dos níveis de metilação do gene *MTHFR* com variáveis de consumo alimentar.

Níveis de metilação = $\beta_0 + \beta_1 * \text{carboidrato} + \beta_2 * \text{proteínas} + \beta_3 * \text{gorduras} + \beta_4 * \text{folato (vitamina B9)} + \beta_5 * \text{riboflavina (vitamina B2)} + \beta_6 * \text{biotina (vitamina B8)} + \beta_7 * \text{cobalamina (vitamina B12)} + \beta_8 * \text{retinol (vitamina A)} + \beta_9 * \text{tocoferol (vitamina E)} + \beta_{10} * \text{ácido ascórbico (vitamina C)}$.

O nível de significância adotado foi de 5%

REFERÊNCIAS

ADA. American Diabetes Association. **High blood glucose**. Disponível em: <
<http://www.diabetes.org/are-you-at-risk/lower-your-risk/highbg.html?loc=atrisk-slabnav>>.
 Acesso em: outubro, 2017.

ANDERSON, M.A. C.; BERESFORD, A. A.S.; MCLERRAN, D., LAMPE, W. J.; DEEB, S.; FENG, Z.; MOTULSKY, G. A. Response of serum and red blood cell folate concentrations to folic acid supplementation depends on methylenetetrahydrofolate reductase C677T genotype: results from a crossover trial. **Molecular Nutrition Food Research**, v.57, p. 637-644, 2013.

ANWAY, D. W.; CUPP, S. A.; UZUMCU, M.; SKINNER, K. M. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. **Science**, v. 308, p.1466–1469, 2005.

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

ASSUNÇÃO, W. A.; ARTMANN, M.; AARESTRUP, R. J. Nutrigenômica: a ciência da nutrição na era pós-genoma. **Food Ingredientes Brasil**, v. 4, n. 2, p. 13-20, 2014.

AUCLAIR, G.; WEBER, M. Mechanisms of DNA methylation and demethylation in mammals. **Biochimie**, v. 94, p. 2202-2211, 2012.

AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGUELLES, S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 1, p. 1-31, 2014.

BARBOSA, F. B.K. ; COSTA, B. M. N.; ALFENAS G. C. R.; DE PAULA, O. S.; MINIM, R. P. V.; BRESSAN, J. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Revista de Nutrição**, v. 23, p. 629-643, 2010.

BERGER, L. S.; KOUZARIDES, T.; SHIEKHATTAR, R.; SHILATIFARD, A. An operational definition of epigenetics. **Genes Development**, v. 23, p. 781-783, 2009.

BESTOR, H. T. The DNA methyltransferases of mammals. **Human Molecular Genetics**, v. 9, p. 2395–2402, 2000.

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

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

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

BOTEZATU, A.; SOCOLOV, D.; IANCU, L. V.; HUICA, I.; PLESA, A.; UNGUREANU, C.; ANTON, G. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and promoter methylation in cervical oncogenic lesions and cancer. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 17, n. 4, p. 543-549, 2013.

BRADSHAW, G.; SUTHERLAND, G. H.; CAMILLERI, T. E.; LEA, A. R.; GRIFFITHS, R. H. M. L. Genetic and epigenetic variants in the *MTHFR* gene are not associated with non-Hodgkin lymphoma. **Meta Gene**, v. 6, p. 91-95, 2015.

CEJVANOVIC, V.; ASFERG, C.; KJÆR, L. K.; ANDERSEN, U. B.; LINNEBERG, A.; FRYSTYK, J.; HENRIKSEN, T.; FLYVBJERG, A.; CHRISTIANSEN, M.; WEIMANN, A.; JEPPESEN, J.; POULSEN, H. E. Markers of oxidative stress in obese men with and without hypertension. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 76, n. 8, p. 1-7, 2016.

CHONG, S.; WHITELAW, E. Epigenetic germline inheritance. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 14, p. 692–696, 2004.

COCHRAN, W. G. **Sampling Techniques**. Editora Walter A. Shewhart. New York, 1953
COLSON, N. J.; NAUG, H. L.; NIKBAKHT, E.; ZHANG, P.; MCCORMACK, J. The impact of MTHFR 677 C/T genotypes on folate status markers: a meta-analysis of folic acid intervention studies. **European Journal of Nutrition**, v. 56, n. 1, p. 247-260, 2017.

CONTI, A; Nutrigenômica: a ciência da nutrição na era pós-genoma. **Food Ingredientes Brasil**, 2010.

COPPEDÉ, F.; DENARO, M.; TANNORELLA, P.; MIGLIORE, L. Increased MTHFR promoter methylation in mothers of Downsyndrome individuals. **Mutation Research**, v. 787, n. 2016, p. 1-6, 2016.

COSTA, C.J. M.; FRANCHESCINI, S.; DINIZ, S. A.; PERSUHN, C. D.; LIMA, L. E.F.; SILVA, A.; SILVA, A. J.; ASCIUTI, R. S. L.; RIVERA, A. A. M.; GONÇALVES, R. C.M.; CERQUEIRA, O. M. M.; LIMA, T. R.; MORAIS, M. R.; SAMPAIO, C. F.; FILIZOLA, G. R.; VERAS, C. R.; ALMEIDA, C. T. A.; JÚNIOR, A. T. I.; LIMA, A. P. R. **Segundo ciclo sobre diagnóstico e intervenção da situação alimentar, nutricional, serviços de saúde de doenças não- transmissíveis mais prevalentes da população do município de João Pessoa/PB**, 2014/2016.

CZERSKA, M.; MIKOŁAJEWSKA, K.; ZIELIŃSKI, M.; GROMADZIŃSKA, J.; WĄSOWICZ, W. Today's oxidative stress markers. **Medycyna Pracy**, v. 66, n. 3, p. 393-405, 2015.

DAWANE, S. J.; PANDIT, A V. Understanding redox homeostasis and its role in cancer. **Journal of Clinical & Diagnostic Research**, v.6, p. 1796–1802, 2012.

DELL'EDERA, D.; TINELLI, A.; MILAZZO, G. N.; MALVASI, A.; DOMENICO, C.; PACELLA, E.; PIERLUIGI, C.; GIUSEPPE, T.; MARCELLO, G.; FRANCESCO, L.; EPIFANIA, A. A. Effect of multivitamins on plasma homocysteine in patients with the 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase C677T homozygous state. **Molecular Medicine Reports**. v. 8, p. 609-612, 2013.

DEVLIN, M. A; ARNING, E.; BOTTIGLIERI, T.; FARACI, M. F.; ROZEN, R.; LENTZ, R. S. Effect of *MTHFR* genotype on diet-induced hyperhomocysteinemia and vascular function in mice. **Blood Journal**, v. 103, n. 7, p. 2664-2629, 2004.

DIJK, S. J. V.; MOLLOY, P. L.; VARINLI, H.; MORRISON, J. L.; MUHLHAUSLER, B. S. Epigenetics and human obesity. **International Journal of Obesity**, v. 39, p. 85-97, 2015.

DOROSTGHOAL, M.; KAZEMINEJAD, S. R.; SHAHBAZIAN, N.; POURMEHDI, M.; JABBARI, A. Oxidative stress status and sperm DNA fragmentation in fertile and infertile men. **First International Journal of Andrology**, p. 1-9, 2017.

EHRlich, M.; GAMA-SOSA, A. M.; HUANG, L.; MIDGETT, M. R.; KUO, C. K.; MCCUNE, A. R.; GEHRKE, C. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. **Nucleic Acids Research**, v.10, p. 2709–2721, 1982.

ELAHI, M.M.; CHUANG, A.; MATATA, M. B. **Overview of oxidative stress and cardiovascular disease**. In Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants; Laher, I. Geemany: Editora, Springer Berlin Heidelberg, p. 719-764, 2014.

FEINBERG, P. A. Cancer epigenetics take center stage. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.98, p.392-94, 2001.

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

FRANKS, W. P.; LING, C. Epigenetics and obesity: the devil is in the details. **Bio Med Central Medicine**, v. 8, n. 88, p. 1-5, 2010.

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.

FROSST, P.; BLOM, J. H.; MILOS, R.; GOYETTE, P.; SHEPPARD, A. C.; MATTHEWS, G. R.; BOERS, H. J. G.; DEN HEIJER, M.; KLUIJTMANS, J. A. L.; VAN DEN HEUVEL, P. L.; ROZEN, R. A candidate genetic risk factor for vascular disease. **Nature Genetics**, p.111-113, 1995.

GE, J.; WANG, J.; ZHANG, F.; DIAO, B.; SONG, Z. F.; SHAN, L. L.; WANG, W.; CAO, H. L.; LI, X. Q. Correlation between MTHFR gene methylation and pre-eclampsia, and its clinical significance. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 3, p. 8021-8028, 2015.

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

GHATTAS, M.; EL-SHAARAWY, F.; MESBAH, N.; ABO-ELMATTY, D. DNA methylation status of the methylenetetrahydrofolate reductase gene promoter in peripheral blood of end-stage renal disease patients. **Molecular Biology Reports**, v. 41, n. 2, p. 683-688, 2014.

GREISSEL, A.; CULMES, M.; NAPIERALSKI, R. Alternation of histone and DNA methylation in human atherosclerotic carotid plaques. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 114, p. 390-402, 2015.

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

GUO, X.; WANG, L.; LI, J.; DING, Z.; XIAO, J. YIN, X.; HE, S.; SHI, P.; DONG, L.; LI, G.; TIAN, C.; WANG, J.; CONG, W.; XU, Y. Structural insight into autoinhibition and histone H3-induced activation of DNMT3A. **Nature**, v. 517, p. 640-644, 2015.

HAGGARTY, P. Genetic and metabolic determinants of human epigenetic variation. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 18, n. 4, p. 334-338, 2015.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 231-255, 2004.

HAN, T. S.; LEAN, M. E. A clinical perspective of obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. **Journal of the Royal Society of Medicine Cardiovascular Disease**, v. 5, p. 1-13, 2016.

HEDMAN, A. K.; ZILMER, M.; SUNDSTRÖM, J.; LIND, L.; INGELSSON, E. DNA methylation patterns associated with oxidative stress in an ageing population. **Bio Med Central Medical Genomics**, v. 9, n. 72, p. 1-12, 2016.

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

HERNÁNDEZ-TREJO, M.; MONTOYA-ESTRADA, A.; TORRES-RAMOS, Y.; ESPEJEL-NÚÑEZ, A.; GUZMÁN-GRENFELL, A.; MORALES-HERNÁNDEZ, R.; TOLENTINO-DOLORES, M.; LARESGOITI-SERVITJE, E. Oxidative stress biomarkers and their relationship with cytokine concentrations in overweight/obese pregnant women and their neonates. **Bio Med Central Immunology**, v. 18, n.3, p. 1-11, 2017.

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

HO, V.; ASHBURY, J. E.; TAYLOR, S.; VANNER, S.; KING, W. D. Genetic and Epigenetic Variation in the DNMT3B and MTHFR Genes and Colorectal Adenoma Risk. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 57, p. 261-268, 2016.

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

JAENISCH, R.; BIRD, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. **Nature Genetics**, v. 33, p. 245-254, 2003.

JARAMILLO, P. L.; CAMACHO, P. A.; NARANJO, L. F. The role of environment and epigenetics in hypertension. **Expert Review of Cardiovascular Therapy**, v.11, p. 1455-1457, 2013.

JEON, J.; KOH, I.; CHOI, N.; KIM, B.; HAN, B.; LEE, S. Differential DNA methylation of *MSI2* and its correlation with diabetic traits. **Plos One**, v. 12, n. 5, p. 1-15, 2017.

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

KANG, X. J. Frontiers of Nutritional Intervention. **Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics**, v. 6, p. 1-2, 2013.

KARACA, M. Z.; KONAC, E.; YURTERI, B.; BOZDAG, G.; SOGUTDELEN, E.; BILEN, C. Y. Association between methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) gene promoter hypermethylation and the risk of idiopathic male infertility. **First International Journal of Andrology**, p. 1-6, v. 49, 2016.

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

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

KIRCHNER, H.; SINHA, I.; GAO, H.; RUBY, M. A.; SCHÖNKE, M.; LINDVALL, J. M.; BARRÈS, R.; KROOK, A.; NÄSLUND, E.; DAHLMAN-WRIGHT, K.; ZIERATH, J. R. Altered DNA methylation of glycolytic and lipogenic genes in liver from obese and type 2 diabetic patients. **Molecular Metabolism**, v. 5, p. 171-183, 2016.

KLERK, M.; VERHOEF, P.; CLARKE, R.; BLOM, J. H.; KOK, J. F.; SCHOUTEN, G. E. *MTHFR* 677C3T polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis. **Journal of the American Medical Association**, v.288, n. 16, p. 2023-2031, 2002.

KUO, K.; CALE, S.; McDOWELL, I. Standardization (External and Internal) of HPLA Assay for Plasma Homocysteine. **Clinical Chemistry**, v. 43, n. 9, p. 1653-1669, 1997.

LANE, M.; MCPHERSON, N. O.; FULLSTON, T.; SPILLANE, M.; SANDEMAN, L.; XIAN KANG, X. W.; ZANDER-FOX, L. D. Oxidative Stress in Mouse Sperm Impairs Embryo Development, Fetal Growth and Alters Adiposity and Glucose Regulation in Female Offspring. **Plos One**, v. 9, n. 7, p. 1-9, 2014.

LAURENT, L.; WONG, E.; LI, G.; HUYNH, T.; TSIRIGOS, A.; ONG, T. C.; LOW, M. H.; SUNG, K. W. K.; RIGOUTSOS, I.; LORING, J.; WEI, C. Dynamic changes in the human methylome during differentiation. **Genome Research**, v. 20, p. 320–331, 2010.

LAW, A. J.; JACOBSEN, E. S. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. **Nature Reviews Genetics**, v.11, p. 204-220, 2010.

LIEW, S.; GUPTA, D. E. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: Epidemiology, metabolism and the associated diseases. **European Journal of Medical Genetics**, v. 58, n.1, p. 1-10, 2015.

LIMA, A. P. R.; NASCIMENTO, F. A. R.; LUNA, P. C. R.; PERSUHN, C. D.; SILVA, S. A.; GONÇALVES, R. C. M.; ALMEIDA, C. T. A.; MORAES, M. R.; JUNIOR, V. E.; FOUILLOUX-MEUGNIER, E.; VIDAL, H.; PIROLA, L.; MAGNANI, M.; OLIVEIRA, P. F. N.; PRADA, O. P.; COSTA, C. J. M. 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

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

LI, W.; GUO, Y.; ZHANG, C.; WU, R.; YANG, A. Y.; GASPAR, J.; KONG, A. T. Dietary Phytochemicals and Cancer Chemoprevention: A Perspective on Oxidative Stress, Inflammation, and Epigenetics. **Chemical Research in Toxicology**, v. 29, n. 12, p. 2071-2095, 2016.

LING, C.; GROOP, L. Epigenetics: A Molecular Link Between Environmental Factors and Type 2. **Diabetes**, v.58, p. 2718–2725, 2009.

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.

MACFARLANEAS, A. J. M.; BEHANA, N. A.; FIELD, M. S.; WILLIAMS, A.; STOVER, P. J.; YAUKC, C. L. Dietary folic acid protects against genotoxicity in the red blood cells of mice. **Mutation Research**, v. 779, p. 105-111, 2015.

MAHALINGAIAH, P. K. S.; PONNUSAMY, L.; SINGH, K. P. Oxidative stress-induced epigenetic changes associated with malignant transformation of human kidney epithelial cells. **Oncotarget**, p. 1-17, 2016.

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

MEANEY, M. A DRD4 gene by maternal sensitivity interaction predicts risk for overweight or obesity in two independent cohorts of preschool children. **Journal of Child Psychology and Psychiatry**, p. 2-9, v. 58, 2016.

MECDONALD, D.; GLUSMAN, G.; PRICE, N. D. Personalized nutrition through big data. **Nature Biotechnology**, v. 43, p. 152-154, 2016.

MILAGRO, I. F.; CAMPION, J.; CORDERO, P.; GOYENECHEA, E.; GOMEZ-URIZ, M. A.; ABETE, I.; ZULET, A. M.; MARTINEZ, A. J. A dual epigenomic approach for the search of obesity biomarkers: DNA methylation in relation to diet-induced weight loss. **The FASEB Journal**, v. 25, n.04, p.1378-1389, 2011.

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.

MOLL, S.; VARGA, E. A. Homocysteine and MTHFR Mutations. **Circulation**, v.132, n. 1, p. 6-9, 2015.

MOODIE, L. M.; GORTMAKER, L. S. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. **The Lancet**, v.378, p. 804–814, 2011.

MORAIS, C. C.; ALVES, M. C.; AUGUSTO, E. M.; ABDALLA, D. S. P.; HORST, M. A.; COMINETTI, C. The *MTHFR* C677T Polymorphism Is Related to Plasma Concentration of Oxidized Low-Density Lipoprotein in Adolescents with Cardiovascular Risk Factors. **Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics**, v. 8, p. 105-113, 2015.

MOSTAFA, T.; RASHED, L. A.; NABIL, N. I.; OSMAM, I.; MOSTAFA, R.; FARAG, M. Seminal miRNA Relationship with Apoptotic Markers and Oxidative Stress in Infertile Men with Varicocele. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1-9, 2016.

MUKA, T.; NANO, J.; VOORTMAN, T.; BRAUN, E. V. K.; LIGTHART, S.; STRANGES, S.; BRAMER, M. W.; TROUP, J.; CHOWDHURY, R.; DEGHAN, A.; FRANCO, H. O. The role of global and regional DNA methylation and histone modifications in glycemic traits and type 2 diabetes: A systematic review. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 26, n. 7, p. 553-566, 2016.

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

NOECKER, C.; BORENSTEIN, E. Getting personal about nutrition. **Trends in Molecular Medicine**, v. 22, p. 83-85, 2016.

NUNO, N.B.; HEUBERGER, R. Nutrigenetic associations with cardiovascular disease. **Reviews in Cardiovascular Medicine**, v. 15, p. 217-225, 2014.

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.

OKANO, M., XIE, S.; LI, E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. **Nature Genetics**, v. 19, p. 219-220, 1998.

OLLATI, V.; FAVERO, C.; ALBETTI, B.; TARANTINI, L.; MORONI, A.; BYUN, H.; MOTTA, V.; CONTI, D. M.; TIRELLI, A. S.; VIGNA, L.; BERTAZZI, P. A.; PESATORI, A. C. Nutrients Intake Is Associated with DNA Methylation of Candidate Inflammatory Genes in a Population of Obese Subjects. **Nutrients**, v. 6, p. 4625-4639, 2014.

ONCUL, S.; KARABIYIK, L.; COSKUN, E.; KADIOGLU, E.; GULBAHAR, O. Comparisons of the effects of the sevoflurane and propofol on acute ischemia reperfusion and DNA damages in rabbits. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 67, n. 1, p. 35-41, 2017.

Organization WH. Global Report on Diabetes. Geneva. 2016.

ORTBAUER, M.; RIPPER, D.; FUHRMANN, T.; LASSI, M.; AUERNIGG-HASELMAIER, S.; STIEGLER, C.; KONIG, J. Folate deficiency and over supplementation causes impaired folate metabolism: Regulation and adaptation mechanisms in *Caenorhabditis elegans*. **Molecular Nutrition & Food Research**. v. 60, p. 949-956, 2016.

OTHMAN, F. B.; MOHAMED, H. J. B. J.; SIRAJUDEEN, K.N.S.; FAIRULNIZAL, M.; NOH, M.; RAJAB, N. F. The influence of selenium status on body composition, oxidative DNA damage and total antioxidant capacity in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus: A case-control study. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 41, p. 1-7, 2016.

PARK, L. K.; FRISO, S.; CHOI, S. Nutritional influences on epigenetics and age-related disease. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 71, n. 1, p. 75-83, 2012.

PAVLIDIS, C.; KARAMITRI, A.; BARAKOU, A.; COOPER, D.N.; POULAS, K.; TOPOUZIS, S., PATRINOS, P. G. Ascertainment and critical assessment of the views of the general public and healthcare professionals on nutrigenomics in Greece. **Personalized Medicine**, v. 9, p. 201–210, 2012.

PEEDICAYIL, J. Role of epigenetics in pharmacotherapy, psychotherapy and nutritional management of mental disorders. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 37, n. 5, p. 499–501, 2012.

PINZON-CORTES, A. J.; PERNA-CHAUX, A.; NICOLAS STEVEN ROJAS VILLAMIZAR, S. N.; DIAZ-BASABE, A.; POLANIA-VILLANUEVA, C. D.; JACOME, F. M.; MENDIVIL, O. C.; GROOT, H.; VALERIANO LOPEZ- SEGURA, V. Effect of diabetes status and hyperglycemia on global DNA methylation and hydroxymethylation. **Endocrine Connections**, v. 6, n. 8, p. 1-36, 2017.

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

POMILIO, A. B.; VITALE, M. G.; OLLIVIER, J. O. C.; VITALE, A. A. Implicancias clínicas de metiltransferasas de moléculas pequeñas. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, v.50, n. 1, p. 77-98, 2016.

PRAY, A. L. Epigenetics: Genome Meet you renvironment. **The Scientist**, v. 1p. 14-20, 2004.

PRASAD, A. S.; BECK, F. W. J.; BAO, B.; FITZGERALD, J. T.; SNELL, D. C.; STEINBERG, J. D.; CARDOZO, L. J. Zinc supplementation decreases incidence of infections in the elderly: effect of zinc on generation of cytokines and oxidative stress. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 85, n. 3, p. 837-844, 2007.

PRICE, E. M.; PEÑAHERRERA, M. S.; PORTALES-CASAMAR, E.; PAVLIDIS, P.; ALLEN, M. I. V.; MCFADDEN, D. E.; ROBINSON, W. P. Profiling placental and fetal DNA methylation in human neural tube defects. **Epigenetics & Chromatin**, v. 9, n. 6, p. 1-14, 2016.

QIHAN, W.; XIAOHUA, N. ROS-Mediated DNA Methylation Pattern Alterations in Carcinogenesis. **Current Drug Targets**, v. 16, n.1, p. 13-19, 2015.

QIN, X.; LI, Y.; YUAN, H.; XIE, D.; TANG, G.; WANG, B.; WANG, X.; XU, X.; XIPING XU, X.; HOU, F. Relationship of MTHFR Gene 677C!T Polymorphism, Homocysteine, and Estimated Glomerular Filtration Rate Levels With the Risk of New-Onset Diabetes. **Medicine**, v. 94, n. 7, p. 1-6, 2015.

RAE, W. Indications to Epigenetic Dysfunction in the Pathogenesis of Common Variable Immunodeficiency. **Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis**, v.65, n.2, p. 101-110, 2017.

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

REMELY, M.; LOVRECIC, L.; DE LA GARZA, A. L.; MIGLIORE, L.; PETERLIN; B.; MILAGRO, F. I.; MARTINEZ, J. A.; HASLBERGER, A. G. Therapeutic perspectives of epigenetically active nutrients. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, p. 2756-2768, 2015.

RIMBACH, G.; PASCUAL-TERSA, S. Application of Nutrigenomics to Analyse the Role of Oxidants and Antioxidants in Gene Expression. In: RIMBACH, G.; FUCHS, J.; PACKER, L. **Nutrigenomics**. Edição Ilustrada. Boca Raton: CRC Press. 2005. Cap. 1, p. 1-12.

ROMANOSKI, E. C.; GLASS, K. C.; STUNNENBERG, G. H.; WILSON, L.; ALMOUZNI, G. Epigenomics: roadmap for regulation. **Nature**, v. 518, p. 314-316, 2015.

ROTONDO, J. C.; BOSI, S.; BAZZAN, E.; DI DOMENICO, M.; DE MATTEI, M.; SELVATICI, R.; PATELLA, A.; MARCI, R.; TOGNON, M.; MARTINI, F. Metylenetetrahydrofolate reductase gene promoter hypermethylation in semen samples of infertile couples correlates with recurrent spontaneous abortion. **Reproductive genetics**, v. 27, n. 12, p. 3632-3638, 2012.

SALES, R. M. N.; PELEGRINI, B. P.; GOERCH, C. M. Nutrigenomics: definitions and advances of this new science. **Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 2014, p. 6, 2014.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**. v. 10, n. 10, p. 308-13, 2004.

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

SHARP, L.; LITTLE, J. Polymorphisms in Genes Involved in Folate Metabolism and Colorectal Neoplasia: A Huge Review. **American Journal of Epidemiology**, v. 159, n. 5, p. 423-443, 2004.

SHORTER, R. K.; FELDER, R. M.; VRANA, B. P. Consequences of dietary methyl donor supplements: Is more always better? **Progress in Biophysics and Molecular Biology**. v. 118, n. 1-2, 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 01 nov. 2016.

SILVA, C. T.; JASIULIONIS, M. G. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. **Ciência e Cultura**, v. 66, n. 1, p. 38-42, 2014.

SORIANO-TÁRRAGA, C.; JIMÉNEZ-CONDE, J.; GIRALT-STEINHAEUER, E.; MOLA-CAMINAL, M.; ROSA M. VIVANCO-HIDALGO, M. R.; OIS, A.; RODRÍGUEZ-CAMPELLO, A.; CUADRADO-GODIA, E.; SAYOLS-BAIXERAS, S.; ELOSUA, R.; ROQUER, J. Epigenome-wide association study identifies TXNIP gene associated with type 2 diabetes mellitus and sustained hyperglycemia. **Human Molecular Genetics**, v, 25, n. 3, p. 609-619, 2015.

SPAHIS, S.; BORYS, J.; LEVY, E. Metabolic Syndrome as a Multifaceted Risk Factor for Oxidative Stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 26, n. 9, p. 445-461, 2017.

SUZEN, S.; GURER-ORHAN, H.; SASO, L. Detection of Reactive Oxygen and Nitrogen Species by Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Technique. **Molecules**, v.22, n. 181, p. 1-9, 2017.

TEBANI, A.; AFONSO, C.; MARRET, S.; BEKR, S. Review: Omics-Based Strategies in Precision Medicine: Toward a Paradigm Shift in Inborn Errors of Metabolism Investigations. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 9, p. 1555, 2016.

TIRAWATTANAKOSON, R.; RATTANARAT, P.; NGAMROJANAVANICH, N.; RODTHONGKUM, N.; CHAILAPAKUL, O. Free radical scavenger screening of total antioxidant capacity in herb and beverage using graphene/PEDOT: PSS-modified electrochemical sensor. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 767, p. 68-75, 2016.

TORAÑO, E. G.; GARCÍA, M. G.; FERNÁNDEZ-MORERA, J. L.; NIÑO-GARCÍA, P.; FERNÁNDEZ, A. F.; The Impact of External Factors on the Epigenome: In Utero and over Lifetime. **BioMed Research International**, p. 1-17, 2016.

TURUNEN, P. M.; AAVIK, E.; YLA-HERTTUALA, S. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1790, p. 886–91, 2009.

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

VOLKOV, P.; OLSSON, H. A.; GILLBERG, L.; JORGENSEN, W. S.; BRØNS, C.; ERIKSSON, F. K.; GROOP, L.; JANSSON, P.; NILSSON, E.; RÖNN, T.; VAAG, V.; LING, C. A Genome-Wide mQTL Analysis in Human Adipose Tissue Identifies Genetic Variants Associated with DNA Methylation. **Gene Expression and Metabolic Traits**, v. 2, p. 1-31, 2016.

WANG, X.; ZHU, H.; SNIEDER, H.; SU, S.; MUNN, D.; HARSHFIELD, G.; MARIA, L. B.; DONG, Y.; TREIBER, F.; GUTIN, B.; SHI, H. Mudanças de metilação relacionadas à obesidade em DNA de leucócitos de sangue periférico. **BMC Medicine**, v. 87, n.8, p. 1-8, 2010.

WATERLAND, A. R. Assessing the effects of high methionine intake on DNA methylation. **The Journal of Nutrition**, v.136, p. 1706s – 1710s, 2006.

WEI, L. K.; Sutherland, H.; Au, A.; Camilleri, E.; Haupt, L. M.; Gan, S. H.; Griffiths, L. A Potential Epigenetic Marker Mediating Serum Folate and Vitamin B12 Levels Contributes to the Risk of Ischemic Stroke. **BioMed Research International**, v.2015, p. 1-4, 2015.

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

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

WISE, I. A.; CHARCHAR, F.J. Epigenetic Modifications in Essential Hypertension. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, p. 1-14, 2016.

XUE, J.; IDERAABDULLAH, F. An assessment of molecular pathways of obesity susceptible to nutrient, toxicant and genetically induced epigenetic perturbation. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 30, p. 1-13, 2016.

XUEFENG, L.; WEI, Z.; QUN, L.; XINJUN, L.; TINGZHONG, W.; XUANMÃO, H.; AIQUN, M. Effect of MTHFR Gene Polymorphism Impact on Atherosclerosis via Genome-Wide Methylation. **Medical Science Monitor**, v.22, p. 341-345, 2016.

YANG, X.; LAY, F.; HAN, H.; JONES, A. P. Targeting DNA methylation for epigenetic therapy. Targeting DNA methylation for epigenetic therapy. **Trends in Pharmacol Sciences**, v. 31, p. 536- 546, 2010.

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.; RUSSANOVA, V. R.; GRAVINA, S. et al. DNA methylome and transcriptome sequencing in human ovarian granulosa cells links age-related changes in gene expression to genome-wide methylation and 3'-end GC density. **Oncotarget**, v. 6, n. 6, p. 3627- 3643, 2015.

ZHAO, H.; HAN, Z.; JI, X.; LUO, Y. Epigenetic Regulation of Oxidative Stress in Ischemic Stroke. **Aging and Disease**, v. 7, n. 3, p. 295-306, 2016.

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

ZHOU, S.; ZHANG, Z.; XU, G. Notable epigenetic role of hyperhomocysteinemia in atherogenesis. **Lipids in Health and Disease**, v. 13, n.134, p. 133-134, 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: _____

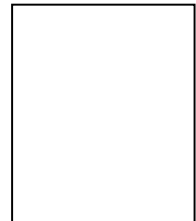
 Prof^ª. Dra. Maria José Carvalho Costa
 Responsável pela Pesquisa

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.



ANEXOS

ANEXO A- CERTIDÃO DE APROVAÇÃO 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. Eliane Marques, U. Paraíba
Coordenadora CER/CCS/UEPB
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 Asciti
Prof.^a Dr.^a Maria Amélia Amado Rivera
Prof.^a Dr.^a Maria Conceição Rodrigues Gonçalves
Prof.^a Dr.^a Mônica Maria Osório de Cerqueira
Prof. Dr. Roberto Teixeira Lima
Prof. Dr. Ronei Marcos Morais
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 SOCIOECONÔMICA E DEMOGRÁFICA

1. CARACTERIZAÇÃO SÓCIO-ECONÔMICA E DEMOGRÁFICA DAS FAMÍLIAS:

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

Caso N°: _____

N°	Nome	Grau de Parentesco (*)	Data de nascimento	Idade	Sexo 1 - M 2 – F	Escolaridade (anos completos)	Renda familiar (em R\$)	Quem recebe renda (marcar com X)	Bens de consumo da família	Observações adicionais
1	Responsável / Respondente								<input type="checkbox"/> Aparelho de som/rádio <input type="checkbox"/> Aparelho de televisão <input type="checkbox"/> Videocassete <input type="checkbox"/> DVD <input type="checkbox"/> Microcomputador de mesa <input type="checkbox"/> Microcomputador portátil <input type="checkbox"/> Automóvel <input type="checkbox"/> Geladeira <input type="checkbox"/> Freezer <input type="checkbox"/> Máquina de lavar roupa <input type="checkbox"/> Máquina de lavar louça <input type="checkbox"/> Aspirador de pó <input type="checkbox"/> Forno de microondas <input type="checkbox"/> Telefone celular <input type="checkbox"/> Telefone fixo <input type="checkbox"/> Máquina fotográfica digital <input type="checkbox"/> Aparelho de ar-condicionado Outros: <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> _____	Legenda da escolaridade: 1= Ensino básico incompleto 2= Ensino básico completo 3= Ensino fundamental incompleto 4= Ensino fundamental completo 5= Ensino médio incompleto 6= Ensino médio completo 7= Ensino superior incompleto 8= Ensino superior completo
2										
3										
4										
5										
6										
7										
8										
9										
10										
11										
12										

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

ANEXO E - RECORDATÓRIO ALIMENTAR:

[] 1º [] 2º [] 3º

Caso Nº: _____

Nome: _____

nº _____

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

ANEXO F- AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA**ADULTO (Maiores de 20 anos até 59 anos): (Nº: ____)**

Peso atual: _____ (em kg)	Altura atual: _____ (em m)
Circunferência do braço: _____ (em cm)	Dobra cutânea tricipital: _____ (em cm)

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

ARTIGO

Metilação do gene *MTHFR* e níveis glicêmicos, estresse oxidativo, consumo de álcool e de folato: um estudo de base populacional

TITULO DA REVISTA: DIABETOLOGIA

ÁREA: MEDICINA I

QUALIS: A1

ISSN: 0012-186X

FATOR DE IMPACTO: 6.080

**METILAÇÃO DO GENE *MTHFR* E NÍVEIS GLICÊMICOS, ESTRESSE
OXIDATIVO, CONSUMO DE ÁLCOOL E DE FOLATO: UM ESTUDO DE BASE
POPULACIONAL**

Keylha Querino de Farias Lima^{1*}, Erika Epaminondas de Sousa¹, Jéssica Vanessa de Carvalho Lisboa¹, Raquel Patrícia Ataíde Lima¹, Rafaella Cristhine Pordeus Luna¹, Mussara Gomes Cavalcanti Alves Monteiro¹, Yohana de Oliveira¹, Maria da Conceição Rodrigues Gonçalves¹, Alcides da Silva Diniz², Aléssio Tony Cavalcanti de Almeida³, Ronei Marcos de Moraes⁴, Naila Francis Paulo de Oliveira⁵, Roberto Texeira de Lima¹, Flávia Emília Leite de Lima Ferreira¹, Maria José de Carvalho Costa¹

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

² Programa de Pós Graduação em Ciências da Nutrição, Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Pernambuco, Recife, Brasil.

³ Programa de Pós Graduação em Economia Aplicada, Departamento de Economia, Centro de Ciências Sociais Aplicadas, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil.

⁴ Programa de Pós Graduação em Modelos de Decisão em Saúde, Departamento de Estatístico, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil.

⁵ Departamento de Biologia Molecular, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil.

* Endereço do autor correspondente; E-Mail:mjc.costa@terra.com.br; Tel. 031 83 98753-3355/
Fax:+55-83-3216-7417

Resumo: O presente estudo teve como objetivo avaliar os níveis de metilação do gene *MTHFR*, e relacionar com níveis glicêmicos, consumo de álcool, folato e estresse oxidativo e em uma população de adultos. Tratou-se de um estudo epidemiológico de caráter transversal, representativo da população de adultos das Zonas Leste e Oeste do município de João Pessoa, Paraíba/ Brasil; envolvendo 265 indivíduos adultos de 20-59 anos de ambos os sexos. Foram aplicados nos domicílios e analisados questionários referentes a estilo de vida, avaliação nutricional e consumo alimentar. Foram analisados também os níveis de metilação do DNA, glicemia de jejum, malondealdeído, capacidade antioxidante total, Homocisteína, Vitamina B12 e Ácido Fólico. Para a análise estatística foram utilizado o modelo de regressão linear múltipla, utilizando o software STATA 13. Observou-se que os níveis de metilação do gene *MTHFR* foi de $34.14 \% \pm 17.41$. Ocorreu diferença significativa entre os níveis de metilação e valores de glicemia, índice de massa corporal $p < 0,000$ e relação positiva entre níveis de metilação com glicemia em jejum. Observando-se que quando a glicemia de jejum aumenta 1mg/dl os níveis de metilação aumentam em 0,050%, relação com o consumo de bebida alcoólica, ou seja, nos indivíduos que têm o hábito de ingerir mais de 6 doses de álcool (10-14g de etanol) em ocasiões eventuais, os níveis de metilação aumentam em 4,47%. Já quanto ao consumo de Folato, a relação foi inversa, ou seja, à medida que o consumo de folato diminui em 1mg os níveis de metilação aumentam em 0.05%. Não observou-se relação entre níveis de metilação e estresse oxidativo. Os dados demonstram uma associação positiva entre a metilação no gene *MTHFR*, glicemia de jejum e consumo excessivo de álcool em ocasiões eventuais e negativo com o consumo de folato.

Palavras - Chave: Epigenética, Metilação de DNA, *MTHFR*, Glicemia de jejum, Consumo de álcool, Folato.

1. INTRODUÇÃO

Os níveis glicêmicos elevados são causados por resistência ou produção insuficiente de insulina, podendo levar a diversos agravos à saúde tais como, doenças cardiovasculares, insuficiência renal, amputação de membros, morte prematura e depressão (WHO, 2016). A exposição prolongada a altos níveis de glicose sanguínea pode afetar as marcas epigenéticas, desencadeando mudanças na metilação do DNA de células alvos em todos os órgãos simultaneamente (JEON et al., 2017).

O gene *MTHFR* é responsável pela codificação da enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) fundamental no metabolismo do ácido fólico e participa da conversão da homocisteína em metionina (MOLL; VARGA, 2015). A metionina é precursora da metionina S-adenosil que atua como doador de grupo metilo para a maioria das reações biológicas de metilação, a exemplo da metilação do DNA (SHORTER; FELDER; VRANA, 2015).

Quando ocorre a metilação na região promotora do mencionado gene, a expressão do mesmo é reduzida ou inibida, tendo como uma das consequências modificações no metabolismo da homocisteína. Estas alterações podem desencadear uma série de variações patológicas (GE et al., 2015).

Nesse sentido, alguns mecanismos epigenéticos como a metilação do DNA exercem influência na expressão gênica com suscetibilidade a hiperglicemia e doenças correlacionadas (WANG et al., 2010).

Evidências recentes sugerem a potencial relação entre mecanismos epigenéticos e alterações glicêmicas, uma ligação entre a predisposição genética e influências dos fatores ambientais. No entanto as evidências são limitadas, sugerindo a necessidade de maiores investigações (MUKA et al., 2016). Como também a realização de estudos sobre a importância da associação dos níveis de metilação de DNA com o estilo de vida (álcool, tabagismo e atividade física), valores bioquímicos e estado nutricional em indivíduos adultos deverão estimular a realização de novas pesquisas para subsidiar estratégias de intervenção no combate às Doenças Crônicas Não-Transmissíveis (DCNT) (LILLYCROP et al., 2014; DO AMARAL et al., 2014).

Fatores de estilo de vida tais como a ingestão de álcool interferem na metilação do DNA, afetando a estabilidade genômica e transcrição de supressores de tumores na etiologia de neoplasias, a exemplo (LIM; SONG, 2012). O efeito tóxico de álcool gera espécies reativas de oxigênio causando danos ao DNA (MALIK; DAVID; GOODERHAM, 2018),

como também, a ingestão de álcool pode ser um fator de risco para obesidade quando consumido em excesso, no entanto quando consumido de acordo com as recomendações, pode proteger contra o ganho de peso (TRAVERSY; CHAPUT, 2015).

Esta pesquisa se justifica por seu caráter inovador visto que não existem estudos que abordem a relação entre nível de metilação do gene *MTHFR*, glicemia de jejum estresse oxidativo, estilo de vida e variáveis socioeconômicas em adultos, considerando que a metilação do DNA pode desempenhar um papel importante na incidência de doenças metabólicas, trata-se de estudo pioneiro de base populacional relacionado com o mencionado gene na literatura.

Desta forma, este estudo tem como objetivo principal avaliar os níveis de metilação do gene *MTHFR* e relacionar com níveis glicêmicos, estresse oxidativo, consumo de álcool e de folato em indivíduos adultos.

2. MÉTODOS

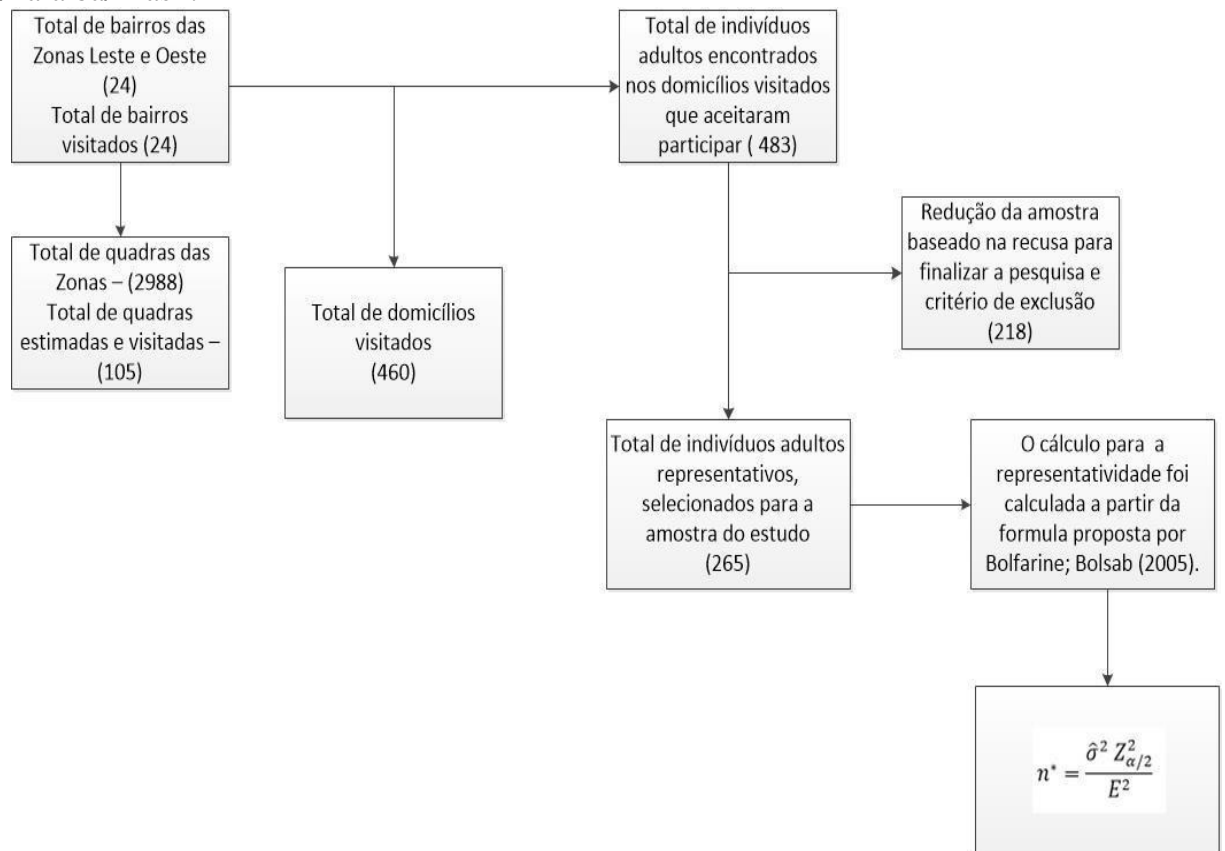
2.1. Caracterização do Estudo e Questões Éticas

Trata-se de um estudo de característica transversal e epidemiológica vinculado ao projeto intitulado: “II Ciclo de Diagnóstico e Intervenção da Situação Alimentar, Nutricional e das Doenças Não-Transmissíveis mais prevalentes da População do Município de João Pessoa/PB” (II DISANDNT/PB) (COSTA et al., 2014/2016). A cuja coleta de dados foi conduzida entre maio de 2015 a maio de 2016. O qual foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da UFPB, sob o protocolo nº 0559/2013; e todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ao aceitarem participar da pesquisa.

2.2 Amostragem

Para realização do presente estudo de base populacional e representativo das zonas Leste e Oeste do município de João Pessoa/Paraíba/Brasil, realizou-se o cálculo de uma amostragem representativa do grupo etário de adultos, conforme apresentado na figura 1.

Figura 1. Diagrama para definição da amostra – Região Leste e Oeste do Município de João Pessoa/Paraíba/Brasil.



Fonte: Costa et al. (2014/2016), II DISANDNT/JP, 05/2015-05/2016.

Para o cálculo da casuística, utilizou-se um procedimento amostral único, composto em níveis. Dada a heterogeneidade da variável "renda" e sua relação entre prevalência de doenças e nutrição (KAC et al., 2007), utilizou-se uma amostragem estratificada (COCHRAN, 1977) sobre as quadras (espaços urbanos da cidade), em primeiro nível. Neste, classificou-se os bairros das Zonas leste e Oeste do município por classe de renda em quatro estratos, segundo informações obtidos junto ao IBGE, (2010).

Após definido o número de quadras realizou-se o sorteio das mesmas, utilizando um gerador de números pseudoaleatórios, com o uso do *software* core R Development Team (2006) para o sorteio.

O presente estudo teve como critério de inclusão: Indivíduos de faixas etárias entre 20 – 59 anos de ambos os sexos; diferentes condições socioeconômicas e usuários ou não de medicamentos. Para os critérios de exclusão se considerou: indivíduos com distúrbios

neuropsiquiátricos; usuários de suplemento de polivitamínicos, minerais, anorexígenos e anabolizantes, gestantes e lactentes.

2.3 Coleta de dados

Após o sorteio das quadras os pesquisadores visitaram os domicílios relatando os objetivos do estudo. Os moradores foram convidados a participar da pesquisa por meio de aplicação dos questionários de caracterização socioeconômica e demográfica, caracterização epidemiológica e de estilo de vida (consumo de álcool), ou seja, nos indivíduos que têm o hábito de ingerir mais de 6 doses de álcool (10-14g de etanol/dose) em ocasiões eventuais, avaliação nutricional e do consumo alimentar, além da coleta do material biológico (sangue venoso).

2.4 Consumo alimentar e avaliação nutricional

Os dados da ingestão alimentar foram obtidos a partir da aplicação de três recordatórios alimentares de (24 horas) com intervalo de quinze dias, sendo obtidos a partir de dois dias úteis e um fim de semana, e a análise dos dados (de consumo alimentar) foi realizada com base no Método de Múltiplas Fontes (Multiple Source Method - MSM), on line, disponível no site (<https://msm.dife.de/tps/msm/>). O MSM é uma técnica estatística proposta pela European Prospective Investigation into câncer and Nutrition (EPIC) (MSM, 2012), sendo melhor descrita em estudo realizado anteriormente (LIMA et al., 2017).

Para a avaliação foram tomadas as medidas antropométricas realizadas conforme metodologia específica utilizada por Lima et al. (2017).

2.5 Análises Bioquímicas

A coleta de sangue foi realizada nos domicílios dos respectivos adultos participantes da pesquisa, por uma enfermeira com experiência. As análises bioquímicas foram realizadas conforme metodologia específica utilizada por Lima et al. (2017).

2.6 Níveis de Metilação do DNA

As amostras de sangue foram obtidas às 08:30 am \pm 10 (min) em todos os indivíduos para evitar um efeito potencial de amostragem. O ADN foi isolado utilizando TRIS-HCl 10 mM, de acordo com o protocolo descrito e adaptado (MILLER; DYKES; POLESKY, 1988). O ADN genômico foi modificado por bissulfito do kit de conversão de bissulfito Cells-to-

CpG™ (Applied biosystems, Life Technologies, Califórnia) de acordo com as instruções do fabricante. A amplificação por PCR e a análise de High Resolution Melting (HRM) foram realizadas sequenciamento no software Applied Biosystems 7500 Fast System.

A PCR foi realizada num volume total de 20 contendo: 1x tamp, 4 mM Mg + 2, 200 de cada dNTP (Qiagen), 250 nM de cada iniciador com as sequências dos primers para o gene *MTHFR* (Forward: F- 5'-GGTCAGAAGCATATCAGTCATGAG3' e Reverse: 5'CTGGGAAGAACTCAGCGAACTCA), 5 µM de SYTO®, 9Dye (INVITROGEN), 1U de polimerase de ADN HotstarTaq (Qiagen) e 1 µl de ADN genómico convertido em bissulfito.

O programa qPCR consistiu de uma ativação enzimática inicial a 95 ° C por 10 min, seguido por 50 ciclos de 45 s a 95 ° C, 45 s a 58 ° C e 45 s a 72 ° C e uma extensão final a 72 ° C por 10 min. As curvas de fusão foram normalizadas pelo cálculo da 'linha de melhor ajuste' entre duas regiões de normalização antes e após a diminuição da fluorescência principal representando a fusão do produto de PCR usando o software fornecido com o HRM, PCR em tempo real rápido Applied Biosystems 7500 Software do Sistema v 2.0. (LIMA et al., 2017).

2.7. Análise Estatística

Os dados foram avaliados quanto à normalidade utilizando o teste de Lilliefors, que é um derivado do teste de Kolmogorov-Smirnov (SIEGEL, 1977). A análise estatística foi desenvolvida através do Software STATA 13. Para identificar a existência de relação no que diz respeito aos níveis de metilação do gene *MTHFR* foi proposto os seguintes modelos de regressão linear múltipla.

Modelo 1: Análise de regressão múltipla e relação dos níveis de metilação do gene *MTHFR* com estilo de vida e marcadores bioquímicos.

Níveis de metilação= $\beta_0 + \beta_1 \cdot \text{sexo} + \beta_2 \cdot \text{idade} + \beta_3 \cdot \text{fumo} + \beta_4 \cdot \text{bebida alcoólica} + \beta_5 \cdot \text{atividade física} + \beta_6 \cdot \text{IMC} + \beta_7 \cdot \text{glicemia de jejum} + \beta_8 \cdot \text{homocisteína} + \beta_9 \cdot \text{CAT} + \beta_{10} \cdot \text{MDA} + \beta_{11} \cdot \text{ácido fólico} + \beta_{12} \cdot \text{vitamina B12}$.

Modelo 2: Análise de regressão múltipla e relação dos níveis de metilação do gene *MTHFR* com variáveis de consumo alimentar.

Níveis de metilação= $\beta_0 + \beta_1 \cdot \text{carboidrato} + \beta_2 \cdot \text{proteínas} + \beta_3 \cdot \text{gorduras} + \beta_4 \cdot \text{folato (vitamina B9)} + \beta_5 \cdot \text{riboflavina (vitamina B2)} + \beta_6 \cdot \text{biotina (vitamina B8)} + \beta_7 \cdot \text{cobalamina}$

(vitamina B12) + $\beta 8^*$ retinol (vitamina A) + $\beta 9^*$ tocoferol (vitamina E) + $\beta 10^*$ ácido ascórbico (vitamina C).

O nível de significância adotado foi de 5%

3. RESULTADOS

As características gerais da população sobre o nível de metilação, glicemia de jejum, estresse oxidativo, antropometria e estilo de vida foram: nível de metilação $34.14\% \pm 17.41$, 95.39 ± 35.41 mg/dl de glicemia de jejum, $41\% \pm 14$ de CAT, 2.86 ± 0.91 de MDA, valores de homocisteína 11 ± 9.8 , Ácido Fólico 14.12 ± 5.31 ng/ml e 274.26 ± 126.69 pg/ml de vitamina B12, idade média de 38.96 anos (± 12.44); 70% era do sexo feminino, 15.8 % eram consumidores de mais de seis doses de álcool em ocasiões especiais, 8.0% eram fumantes; e 75% praticavam atividade física.

Observa-se que os indivíduos com valores de glicemia em jejum < 100 mg/dl, apresentaram nível de metilação inferiores (33.9%) aos dos indivíduos com valores de glicemia em jejum entre > 100 e ≤ 125 mg/dl (41,8% de metilação). Dados não demonstrados.

A Tabela 1, apresenta a análise de regressão múltipla para verificar a existência de relação entre os níveis de metilação do gene *MTHFR*, valores de glicemia de jejum, estresse oxidativo, estilo de vida, variáveis antropométricas, e demais variáveis bioquímicas. Quando a glicemia de jejum aumenta 1mg/dl os níveis de metilação aumentam em 0.05%, sendo esse valor significativo ($p= 0.030$). Observa-se também que a relação com estilo de vida referente ao consumo de bebida alcoólica foi significativo, ou seja, quando os indivíduos ingerem em ocasiões especiais mais de seis doses de álcool, os níveis de metilação aumentam em 4.47% ($p= 0.043$).

Tabela 1. Relação entre os níveis de metilação do gene *MTHFR* com estilo de vida, medida antropométrica, valores glicêmicos e estresse oxidativo em indivíduos adultos. João Pessoa/ Paraíba/ Brasil.

Variáveis do estudo	Regressão Múltipla			
	Níveis de Metilação			
	Coefficient	CI 95 %	Statistics <i>t</i>	p-Value
Gênero (Feminino)	1.11	-3.87 ± 6.10	0.44	0.660
Idade	-0.17	-0.35 ± 0.00	-1.95	0.053
Fumo	-0.20	-8.17 ± 7.76	-0.05	0.960
Atividade física	-0.54	-5.02 ± 3.93	-0.24	0.810
Bebida Alcoólica	4.47	0.13 ± 8.81	2.03	0.043*
IMC (kg/m ²)	0.12	-0.32 ± 0.58	0.55	0.580
Glicemia/jejum (mg/dl)	0.05	0.00 ± 0.10	2.10	0.030*
Homocisteína (mol/L)	-0.02	-0.14 ± 0.10	-0.38	0.702
CAT (%)	5.13	-11.09 ± 21.37	0.62	0.533
MDA (umol/L)	-1.39	-3.63 ± 0.84	-1.23	0.221
Ácido Fólico (ng/ml)	0.25	-0.14 ± 0.66	1.25	0.214
Vitamina B12 (pg/ml)	-0.00	-0.01 ± 0.01	-0.01	0.989

*p<0,005

Na Tabela 2, observa-se os resultados da análise de regressão múltipla quanto a relação ou não entre os níveis de metilação do gene *MTHFR*, com variáveis de consumo alimentar. Quando o consumo de Folato diminui em 1 mg, os níveis de metilação aumentam em 0.05%, sendo esse valor estatisticamente significativo (p< 0.000).

Tabela 2. Relação entre níveis de metilação do gene *MTHFR* com variáveis de consumo alimentar em indivíduos adultos. João Pessoa/ Paraíba/ Brasil.

Variáveis do estudo	Regressão Múltipla			
	Níveis de Metilação			
	Coefficient	CI 95 %	Statistics <i>t</i>	p-Value
Carboidrato (g)	0.01	0.01± 0.04	0.73	0.467
Proteínas (g)	-0.03	-0.08±0.07	-0.10	0.920
Gordura (g)	-0.04	-0.13±0.05	-0.83	0.408
Folato (mcg)	-0.05	-0.75±-0.36	-5.74	0.000*
Vitamina B2 (mcg)	0.41	-0.15±0.23	0.42	0.674
Vitamina B8 (mcg)	-0.01	-0.02±0.00	-1.17	0.244
Vitamina B12 (mcg)	0.08	-1.62±1.79	0.09	0.925
Vitamina A (mcg)	0.00	-0.00±0.00	0.41	0.684
Vitamina E (mcg)	0.05	-0.17±0.28	0.50	0.620
Vitamina C (mcg)	0.00	-0.00±0.00	0.70	0.485

*p<0,005

4. DISCUSSÃO

Observou-se no presente estudo que ocorreu relação entre níveis de metilação do gene *MTHFR*, glicemia de jejum, consumo de álcool e folato em adultos de ambos os sexos da população estudada. Foi verificado também que os níveis de metilação do gene *MTHFR* dos indivíduos normoglicêmicos foram inferiores aos níveis de metilação dos indivíduos pré-diabéticos, embora não significativo.

Não foi observada relação com estresse oxidativo, provavelmente devido na amostra total 90% dos indivíduos apresentarem os resultados das variáveis analisadas de acordo com os valores de referência e apenas 9,2% tinham valores de glicemia igual ou maior que 126mg/dl. Neste sentido em estudos destinados a definir a função vascular pós - prandial observou-se que uma série de proteínas inflamatórias e moléculas de adesão também não foram afetadas mesmo diante da ingestão de suplementos ricos em α -tocoferol em adultos jovens normoglicídicos (MAH et al., 2013).

Alguns fatores genéticos, como a metilação do DNA, exercem influência na expressão gênica levando a suscetibilidade a hiperglicemia e doenças correlacionadas (WANG et al.,

2010), e a exposição prolongada a altos níveis de glicose sanguínea ao longo da vida podem lesionar células pancreáticas, afetando as assinaturas epigenômicas, desencadeando mudanças significativas na metilação do DNA de células alvos em todos os órgãos simultaneamente (JEON et al., 2017). Modificações epigenéticas relacionadas à intolerância à glicose podem tanto ser uma causa quanto uma consequência de alterações no metabolismo glicêmico, revelando mudanças significativas na metilação do DNA associada à hiperglicemia.

No presente estudo, nos indivíduos com intolerância à glicose, ou seja, em pre-diabéticos observou-se uma tendência de aumento dos níveis de metilação do gene estudado. Por constituir-se de adultos predominantemente jovens (idade média 38 anos) provavelmente se essa situação persistir com o passar dos anos, esses níveis de metilação poderão aumentar.

Não se sabe ao certo se os níveis elevados de metilação do gene *MTHFR*, foram uma causa ou consequência do aumento dos valores glicêmicos. Estudos de mecanismos fisiopatológicos melhor elucidarão essa questão. Alterações no perfil de metilação podem levar a modificações na regulação gênica. Baixos níveis de metilação do DNA (hipometilação) associam-se com a elevação da expressão gênica, enquanto que níveis elevados de metilação (hipermetilação) estão associados com o silenciamento gênico (YU et al., 2015).

Dessa forma, alterações no perfil de metilação e consequente alterações na expressão gênica podem favorecer o desenvolvimento de muitas características do fenótipo do diabetes e complicações em órgãos relacionados (RAKYAN et al., 2011; VOLKMAR et al., 2012).

O silenciamento dos genes comumente está associada à hipermetilação de ilhas CpGs, e, levando em consideração que o epigenoma pode ser modificado, ou seja, as marcas epigenéticas são reversíveis, através de agentes hipometilantes a exemplo de antioxidantes dietéticos naturais, como provavelmente ocorreu no presente estudo, com o Folato onde os níveis de metilação aumentaram quando o consumo desse nutriente diminuiu, desmetilando ilhas CpGs (KARACA et al., 2016).

Há evidências de que o aumento da metilação do gene *MTHFR* ocorreu na análise do sêmen de homens com infertilidade (ROTONDO et al., 2012), no DNA de tecidos de indivíduos com câncer (BOTEZATU et al., 2013), em indivíduos com doenças cardiovasculares e doença renal (GHATTAS et al., 2014; WEI et al., 2015) e no sangue placentário de mulheres com pré-eclâmpsia (GE et al., 2015).

Estudiosos vêm relacionando polimorfismos do mencionado gene com variações glicêmicas. De acordo com Qin et al. (2015), o polimorfismo 677CT do gene *MTHFR* pode

contribuir para o risco de diabetes de início, definido como glicemia de jejum ≥ 126 mg/dl, em estudos com mulheres da população chinesa com um estado de IMC mais alto. O que pode contribuir para elucidar os achados do presente estudo, visto que a maioria dos indivíduos participantes encontrava-se com sobrepeso e obesidade (39% e 20%) dados não apresentados, respectivamente. Alterações epigenéticas nos padrões de metilação em sítios específicos de genes candidatos, envolvidos no metabolismo da glicose também foram investigadas (HIDALGO et al., 2014). Investigações sobre metilação de genes em outros tecidos como o de ilhotas pancreáticas, mais precisamente no *PDX-1* (homeobox duodenal pancreático 1) em humanos também demonstraram que a hiperglicemia aumentada estava relacionada a níveis mais altos de metilação da *PDX-1* (YANG et al., 2012).

No entanto, segundo os achados de Keller et al. (2014), a partir da investigação da metilação no promotor do *GLUT4* em indivíduos adultos magros e obesos, pequenas mudanças nos níveis de metilação, não implicaram em alterações nos níveis de glicose.

No que se refere ao consumo de álcool, em estudo de base populacional investigou-se a relação desse consumo durante a adolescência e o risco de diabetes na fase adulta. No decorrer da adolescência, o consumo de álcool de cinco ou mais doses, durante três a sete dias por semana, aumentou consideravelmente o risco de diabetes em idade adulta jovem. Concluindo que o consumo excessivo de álcool nesta faixa etária pode aumentar o risco de diabetes na idade adulta jovem (LIANG; CHIKRITZHS, 2014).

No entanto, quando o consumo de álcool é baixo, no estudo descrito por Shai et al. (2007), analisando o consumo de 150 ml de vinho por adultos, equivalente a 13g de álcool durante três meses, foi observado um efeito positivo nos valores de glicemia de jejum, baixando de 139,6 mg/dl para 118 mg/dl.

Existem evidências de que mecanismos epigenéticos, dentre eles a metilação do DNA, sofrem alterações decorrentes da interação do genótipo com o ambiente em que o indivíduo está exposto. Um dos fatores ambientais que contribui para tal é a exposição ao álcool. Até o presente, estudiosos apontam esta relação em cérebro e sangue humano e metilação de genes específicos em modelos animais, implicados em efeitos agudos e crônicos do álcool em diversos órgãos. No entanto, a maioria das pesquisas foi realizada em modelos animais e continua sendo necessário elucidar esses efeitos em seres humanos (TULISIAK; HARRIS; IGOR, 2016).

Nesse sentido Andersen et al., 2015, relataram que as análises realizadas em tecido periférico, especificamente no sangue, proporciona a capacidade de investigar a metilação do

DNA em relação ao uso de álcool, em diferentes períodos de tempo, podendo ser considerado um biomarcador para futuros diagnósticos relacionados a complicações resultantes do uso de álcool.

Diversos genes sofrem alterações em seu perfil de metilação, sugerindo que os efeitos do consumo de álcool influenciam de diversas formas nestes mecanismos, e podem intervir celulares específicos (BASAVARAJAPPA; SUBBANNA, 2016).

Estudiosos, observaram um aumento na metilação do promotor do fator de crescimento nervoso (NGF) no sangue de homens dependentes de álcool durante a retirada da substância dentro de um intervalo de sete a quatorze dias, demonstrando que até o sétimo dia não houve mudança na metilação de NGF, já no intervalo de sétimo ao décimo quarto dia houve redução na metilação de NGF. Concluindo que durante a retirada do consumo de álcool houve uma regulação epigenética no perfil de metilação do gene em questão (HEBERLEIN et al., 2013).

De acordo com WENG et al. (2015), houve aumento na metilação no promotor de genes específicos, envolvidos na neurogênese (*NPDC1*), inflamação (*HERCS*) e alcoolismo (*ADCY9*, *CKM* e *PHOX2A*), observados no sangue de indivíduos com uso crônico de álcool. Uma das consequências da ingestão de álcool foi investigada em modelo animal, onde a exposição pré-natal ao álcool acarretou no desenvolvimento anormal do coração congênito fetal, em consequência do aumento dos níveis de acetilação de histonas, acarretando uma expressão excessiva de genes cardíacos como *DHAND* e *EHAND* (ZANG et al., 2014).

Estudiosos demonstraram que a exposição aguda ao álcool em modelo animal no período gravídico, sendo neste caso administrada duas doses de solução a 25% de etanol em intervalos de quatro em quatro horas no período de vinte e quatro horas (equivalente a seis doses), resultou em níveis elevados de acetilação de histonas, provocando lesão celular pulmonar excessiva. Observou-se ainda que a acetilação aumentou significativamente em uma hora após a administração de álcool e retornaram aos níveis basais após 12 horas (WANG et al, 2010).

Os resultados encontrados no que se refere ao consumo de álcool de três vezes a dose recomendada como saudável para homens e de seis vezes a dose recomendada para mulheres (MEMBERS et al., 2011), quantidades consideradas de risco (LARANJEIRA et al., 2007), mesmo sendo um consumo eventual em ocasiões especiais, refletem grandes preocupações para a saúde pública, no presente estudo observamos que o consumo contribuiu para o aumento dos níveis de metilação na população com esse estilo de vida.

Em suma, o aumento no perfil de metilação do gene *MTHFR* e a sua suposta diminuição da expressão pode ter diversos efeitos no organismo, uma vez que o mesmo está envolvido na síntese de nucleotídeos, na regeneração da metionina, além de gerar radical SAM, o principal doador de radical metil utilizado nas reações de metilação do DNA e histonas (MOLLOY, 2012; MOLL; VARGA, 2015; SHORTER; FELDER; VRANA, 2015), e dessa forma impactar diversas vias metabólicas bem como no perfil de metilação do DNA e histonas quando sua expressão é afetada. Embora o presente estudo não avaliou a expressão gênica, nossos dados corroboram com dados previamente publicados no tocante a relação do aumento da metilação do gene *MTHFR* com contextos de saúde comprometida (BOTEZATU et al., 2013; GHATTAS et al., 2014; WEI et al., 2015; GE et al., 2015) e infertilidade (ROTONDO et al., 2012) e aqui mostramos a relação com variáveis bioquímicas e consumo de álcool. Em adição, um estudo recente mostrou que a hipermetilação de *MTHFR* está associada com maiores níveis de colesterol, LDL e alfa-1- glicoproteína ácida em pacientes com complicações diabéticas, como retinopatia e nefropatia (NUNES et al, 2017).

Sobre esse estudo, considera-se como pontos fortes a ausência de estudos sobre a metilação do gene *MTHFR*, e sua relação com valores glicêmicos, com o eventual consumo excessivo de álcool, como também a avaliação do consumo alimentar de potenciais confundidores, utilizando-se a análise de regressão.

CONCLUSÕES

Em conclusão, os achados deste estudo envolvendo indivíduos adultos de ambos os sexos indicam que os níveis de metilação do gene *MTHFR* estão associados positivamente com valores de glicemia de jejum e com fatores de estilo de vida a exemplo de consumo de álcool e associação negativa com o consumo de Folato. Considera-se que os resultados desta investigação deverão estimular a realização de novos estudos que servirão para melhor elucidar os mecanismos epigenéticos envolvidos em doenças metabólicas.

Financiamento

Pela agência de promoção da pesquisa Coordenação para a Melhoria de

Pessoal de Educação Superior (CAPES), Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia

Desenvolvimento (CNPq) e Fundação de Pesquisa Estadual da Paraíba (FAPESQ).

Disponibilidade de dados e materiais

Os dados gerados neste estudo estão sob a coordenação da Dr. Maria José de Carvalho Costa, arquivados no Núcleo Interdisciplinar de estudos em Saúde e Nutrição da Universidade Federal da Paraíba.

Contribuição dos autores

Keylha Querino de Farias Lima contribuiu para o gerenciamento de dados e a redação do manuscrito, Erika Epaminondas de Sousa e Yohanna de Oliveira contribuíram para coleta dos dados, Raquel Patrícia Ataíde Lima coordenou as análises de metilação do DNA, análise estatística e interpretação de dados, Rafaella Cristhine Pordeus Luna, Jéssica Vanessa de Carvalho Lisboa e Mussara Gomes Cavalcanti Alves Monteiro contribuíram para o gerenciamento de dados, Alessio Tony Cavalcante Almeida e Ronei Marcos de Moraes contribuíram para o desenho do estudo e análise estatística final, Maria da Conceição Rodrigues Gonçalves e Roberto Texeira de Lima contribuíram para o gerenciamento de dados e revisão final da edição do artigo, Alcides da Silva Diniz contribuiu para análise estatística, Naila Fancis Paulo de Oliveira contribuiu com a interpretação dos dados e na revisão crítica do manuscrito, Maria José de Carvalho Costa contribuiu para a análise estatística, análise estatística, interpretação de dados e redação do manuscrito, ela coordenou a coleta de dados e na revisão crítica do conteúdo do manuscrito. Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito final.

Conflitos de Interesse

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

Limitações do estudo

Como limite do estudo pode-se destacar a ausência da análise da expressão gênica.

REFERÊNCIAS

1. ANDERSEN, M. A.; DOGAN, V. M.; BEACH, H. R. S.; PHILIBERT, A. R. Current and Future Prospects for Epigenetic Biomarkers of Substance Use Disorders. **Genes**, v. 6, n. 4, p. 991- 1022, 2015.

2. BASAVARAJAPPA, S. B.; SUBBANNA, S. Epigenetic Mechanisms in Developmental Alcohol-Induced Neurobehavioral Deficits. **Brain Sciences**, v.6, n. 12, p. 1-32, 2016.

3. BOTEZATU, A.; SOCOLOV, D.; IANCU, L. V.; HUICA, I.; PLESA, A.; UNGUREANU, C.; ANTON, G. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and promoter methylation in cervical oncogenic lesions and cancer. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 17, n. 4, p. 543-549, 2013.

4. BÖTTCHER, Y. Global DNA methylation levels in human adipose tissue are related to fat distribution and glucose homeostasis. **Diabetologia**, v. 11, n. 57, p. 2374-2388, 2014.

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

6. COSTA, C.J. M.; FRANCHESCINNI, S.; DINIZ, S. A.; PERSUHN, C. D.; LIMA, L. E.F.; SILVA, A.; SILVA, A. J.; ASCIUTI, R. S. L.; RIVERA, A. A. M.; GONÇALVES, R. C.M.; CERQUEIRA, O. M. M.; LIMA, T. R.; MORAIS, M. R.; SAMPAIO, C. F.; FILIZOLA, G. R.; VERAS, C. R.; ALMEIDA, C. T. A.; JÚNIOR, A. T. I.; LIMA, A. P. R. **Segundo ciclo sobre diagnóstico e intervenção da situação alimentar, nutricional, serviços de saúde de doenças não- transmissíveis mais prevalentes da população do município de João Pessoa/PB**, 2014/2016.

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

8. NUNES, S. K. M.; SILVA, S. A.; EVANGELISTA, Q. W. I.; FILHO, M. J.; GOMES, P. A. N. C.; NASCIMENTO, F. A. R.; LUNA, P. C. R.; COSTA, C. J. M.; OLIVEIRA, P> F. N. Hypermethylation in the promoter of the *MTHFR* gene is associated with diabetic complications and biochemical indicators. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 9, n. 84, p. 1-9, 2017.

9. GE, J.; WANG, J.; ZHANG, F.; DIAO, B.; SONG, Z. F.; SHAN, L. L.; WANG, W.; CAO, H. L.; LI, X. Q. Correlation between MTHFR gene methylation and pre-eclampsia, and its clinical significance. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 3, p. 8021-8028, 2015.
10. GHATTAS, M.; EL-SHAARAWY, F.; MESBAH, N.; ABO-ELMATTY, D. DNA methylation status of the methylenetetrahydrofolate reductase gene promoter in peripheral blood of end-stage renal disease patients. **Molecular Biology Reports**, v. 41, n. 2, p. 683-688, 2014.
11. HEBERLEIN, A.; MUSCHLER, M.; FRIELING, H.; BEHR, M.; EBERLEIN, C.; WILHELM, J.; GRÖSCHL, M.; KORNHUBER, J.; BLEICH, S.; THOMAS HILLEMACHER, T. Epigenetic down regulation of nerve growth factor during alcohol withdrawal. **Addiction Biology**, v.18, n. 3, p. 508-510, 2011.
12. HIDALGO, B.; IRVIN, J R. M.; SHA, I.; ZHI, D.; ASLIBEKYAN, S.; ABSHER, D.; TIWARI, K. H.; KABAGAMBE, K. E.; ORDOVAS, M. J.; ARNETT, K. D. Epigenome-Wide Association Study of Fasting Measures of Glucose, Insulin, and HOMA-IR in the Genetics of Lipid Lowering Drugs and Diet Network Study. **Diabetes**, v. 63, p. 801-807, 2014.
13. IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Contagem da população 2010**. Rio de Janeiro: Ministério do Planejamento, 2010.
14. JEON, J.; KOH, I.; CHOI, N.; KIM, B.; HAN, B.; LEE, S. Differential DNA methylation of *MSI2* and its correlation with diabetic traits. **Plos One**, v. 12, n. 5, p. 1-15, 2017.
15. KAC, G.; SICHIERI, R.; GIGANTE, D. P. **Epidemiologia Nutricional**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz/ Editora Atheneu, 2007. 580 p.
16. KARACA, M. Z.; KONAC, E.; YURTERI, B.; BOZDAG, G.; SOGUTDELEN, E.; BILEN, C. Y. Association between methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) gene promoter hypermethylation and the risk of idiopathic male infertility. **First International Journal of Andrology**, p. 1-6, 2016.
17. KELLER, M.; KRALISCH, S.; ROHDE, K.; SCHLEINITZ, D.; DIETRICH, A.; SCHÖN, R.; M.; GÄRTNER, D.; LOHMANN, T.; MIRIAM DREBLER, M.; TÖNJES, A.; STUMVOLL, M.; KOVACS, P.; MATHIAS FASSHAUER, M.; BLÜHER, M.;

LARANJEIRA, R.; PINSKY, I.; ZALESKI, M.; CAETANO, R. **I Levantamento Nacional sobre os padrões de consumo de álcool na população brasileira**. Brasília – DF, Secretaria Nacional Antidrogas, 2007.

18. LIANG, W.; CHIKRITZHS, T. Alcohol Consumption during Adolescence and Risk of Diabetes in Young Adulthood. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-6, 2014.

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

20. LIM, U.; SONG, M. Dietary and Lifestyle Factors of DNA Methylation. **Cancer Epigenetics**, v. 863, p. 359-376, 2012.

21. LIMA, A. P. R.; NASCIMENTO, F. A. R.; LUNA, P. C. R.; PERSUHN, C. D.; SILVA, S. A.; GONÇALVES, R. C. M.; ALMEIDA, C. T. A.; MORAES, M. R.; JUNIOR, V. E.; FOUILLOUX-MEUGNIER, E.; VIDAL, H.; PIROLA, L.; MAGNANI, M.; OLIVEIRA, P. F. N.; PRADA, O. P.; COSTA, C. J. M. 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. 1-9, 2017.

22. LING, C. Increased DNA Methylation and Decreased Expression of PDX-1 in Pancreatic Islets from Patients with Type 2 Diabetes. **Molecular Endocrinology**, v. 26, n. 7, p. 1203-1212, 2012.

23. MAH, E.; NOH, S. K.; BALLARD, K. D.; PARK, H. J.; VOLEK, J. S.; BRUNO, R. S. Supplementation of a gamma-tocopherol-rich mixture of tocopherols in healthy men protects against vascular endothelial dysfunction induced by postprandial hyperglycemia. **The Journal Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 1, p.196-203, 2013.

24. MALIK, D.; DAVID, M. R.; GOODERHAM, J. N. Ethanol potentiates the genotoxicity of the food-derived mammary carcinogen PhIP in human estrogen receptor-positive mammary cells: mechanistic support for lifestyle factors (cooked red meat and ethanol) associated with mammary cancer. **Archives of Toxicology**, v. 92, n. 540, p. 1-17, 2018.

25. MEMBERS, F. T.; REINER, Z.; CATAPANO, L. A.; BACKER, G.; GRAHAM, I.; TASKINEN, M.; OLOV WIKLUND, O.; AGEWALL, S.; EDUARDO ALEGRIA, E.; CHAPMAN, J. M.; DURRINGTON, P.; ERDINE, S.; HALCOX, J.; HOBBS, R.; KJEKSHUS, J.; FILARDI, P. P.; GABRIELE RICCARDI, G.; ROBERT F. STOREY, F. R.;

WOOD, D. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias. **European Heart Journal**. v.14, n. 32, p. 1769–1818, 2011.

26. 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.

27. MOLL, S.; VARGA, E. A. Homocysteine and MTHFR Mutations. **Circulation**, v.132, n. 1, p. 6-9, 2015.

28. MOLLOY, M. A. **Genetic Aspects of Folate Metabolism**. **Subcellular Biochemistry**, v. 56, p. 105-130, 2012.

29. MSM. The Multiple Source Method. **Departament os Epidemiology of the German Istitute of Human Nutrition Potsdam-Rehbrucke**, 2012. Disponível em: <msm.dife.de/tps/msm>. Acesso em: agosto, 2016.

30. MUKA, T.; NANO, J.; VOORTMAN, T.; BRAUN, E. V. K.; LIGTHART, S.; STRANGES, S.; BRAMER, M. W.; TROUP, J.; CHOWDHURY, R.; DEGHAN, A.; FRANCO, H. O. The role of global and regional DNA methylation and histone modifications in glycemic traits and type 2 diabetes: A systematic review. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 26, n. 7, p. 553-566, 2016.

31. Organization WH. **Global Report on Diabetes**. Geneva. 2016.

32. QIN, X.; LI, Y.; YUAN, H.; XIE, D.; TANG, G.; WANG, B.; WANG, X.; XU, X.; XIPING XU, X.; HOU, F. Relationship of MTHFR Gene 677C!T Polymorphism, Homocysteine, and Estimated Glomerular Filtration Rate Levels With the Risk of New-Onset Diabetes. **Medicine**, v. 94, n. 7, p. 1-6, 2015.

33. RAKYAN, K. V.; BEYAN, H.; DOWN, A. T.; HAWA, I. M.; MASLAU, S.; DEEQO ADEN, D.; DAUNAY, A.; BUSATO, F.; MEIN, A. C.; MANFRAS, B.; DIAS, M. K.; BELL, G. C.; TOST, J.; R. DAVID LESLIE, D. R. Identification of Type 1 Diabetes–Associated DNA Methylation Variable Positions That Precede Disease Diagnosis. **Plos Genetics**, v.7, n.9, p. 1-9, 2011.

34. ROTONDO, J. C.; BOSI, S.; BAZZAN, E.; DI DOMENICO, M.; DE MATTEI, M.; SELVATICI, R.; PATELLA, A.; MARCI, R.; TOGNON, M.; MARTINI, F. Methylenetetrahydrofolate reductase gene promoter hypermethylation in semen samples of

infertile couples correlates with recurrent spontaneous abortion. **Reproductive genetics**, v. 27, n. 12, p. 3632-3638, 2012.

35. SHAI, I.; WAINSTEIN, J.; HARMAN-BOEHM, I.; RAZ, I.; FRASER, D.; RUDICH, A.; STAMPFER, J. M. Glycemic Effects of Moderate Alcohol Intake Among Patients With Type 2 Diabetes. **Diabetes Care**, v. 30, n. 12, p. 3011-3016, 2007.

36. SHORTER, R. K.; FELDER, R. M.; VRANA, B. P. Consequences of dietary methyl donor supplements: Is more always better? **Progress in Biophysics and Molecular Biology**. v. 118, n. 1-2, p. 14-20, 2015.

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

38. TRAVERSY, G.; CHAPUT, J. Alcohol Consumption and Obesity: An Update. **Current Obesity Reports**, v. 4, n.1, p. 122-130, 2015.

39. TULISIAK, T. C.; HARRIS, A. R.; PONOMAREV, I. DNA modifications in models of alcohol use disorders. **Alcohol**, v. 60, p. 19-30, 2017.

40. VOLKMAR, M.; DEDEURWAERDER, S.; CUNHA, A. D.; NDLOVU, N. M.; DEFRANCE, M.; DEPLUS, R.; CALONNE, E.; VOLKMAR, U.; IGOILLO-ESTEVE, M.; NAAMANE, N.; DELGUERRA, S.; ASINI, M.; BUGLIANI, M.; MARCHETTI, P.; CNOP, M.; EIZIRIK, L. D.; FUKS, F. DNA methylation profiling identifies epigenetic dysregulation in pancreatic islets from type 2 diabetic patients. **The Embo Journal**, v. 31, p. 1405-1426, 2012.

41. WANG, X.; GOMUTPUTRA, P.; WOLGEMUTH, J. D. Acute Alcohol Exposure Induces Apoptosis and Increases Histone H3K9/18 Acetylation in the Mid-Gestation Mouse Lung. **Reproductive Sciences**, v. 17, n. 4, p. 384-390, 2010.

42. WANG, X.; ZHU, H.; SNIEDER, H.; SU, S.; MUNN, D.; HARSHFIELD, G.; MARIA, L. B.; DONG, Y.; TREIBER, F.; GUTIN, B.; SHI, H. Mudanças de metilação relacionadas à obesidade em DNA de leucócitos de sangue periférico. **BMC Medicine**, v. 87, n.8, p. 1-8, 2010.

43. WEI, L. K.; Sutherland, H.; Au, A.; Camilleri, E.; Haupt, L. M.; Gan, S. H.; Griffiths, L. A Potential Epigenetic Marker Mediating Serum Folate and Vitamin B12 Levels Contributes to the Risk of Ischemic Stroke. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-4, 2015.

44. WENG, T. J.; WU, S. L.; LEE, C.; HSU, W. P.; A. CHENG, A. T. A. Integrative epigenetic profiling analysis Identifies DNA methylation Changes associated with chronic alcohol consumption. **Computers in Biology and Medicine**, v. 64, p. 299 – 306, 2015.
45. YANG, T. B.; TASNIM A. DAYEH, A. T.; VOLKOV, A. P.; KIRKPATRICK, L. C.; MALMGREN, S.; JING, X.; RENSTRÖM, E.; WOLLHEIM, B. C.; NITERT, D. M.; LING, C. Increased DNA methylation and decreased expression of PDX-1 in pancreatic islets from patients with type 2 diabetes. **Molecular Encocrinology**. v. 26, n. 7, p. 1203-1212, 2012.
46. ZHANG, W.; PENG, C.; ZHENG, M.; GAO, W.; ZHU, J.; LV, T.; LIU, L.; LIU, Z.; LI, H.; XV, Y.; TIAN, J. Prenatal alcohol exposure causes the over-expression of DHAND and EHAND by increasing histone H3K14 acetylation in C57 BL/6 mice. **Toxicology Letters**, v. 228, n. 3, p. 140-146, 2014.
47. YU, B.; RUSSANOVA, V. R.; GRAVINA, S. et al. DNA methylome and transcriptome sequencing in human ovarian granulosa cells links agerelated changes in gene expression to gene body methylation and 3'-end GC density. **Oncotarget**, v. 6, n. 6, p. 3627- 3643, 2015.