

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

JÉSSICA VICKY BERNARDO DE OLIVEIRA

**NÍVEIS DE METILAÇÃO DOS GENES *LPL*, *ADRB3* E *MTHFR*,
STATUS INFLAMATÓRIO, ANTROPOMÉTRICO E ALIMENTAR EM
INDIVÍDUOS COM ESTIMATIVAS DE LDL-C CALCULADAS A
PARTIR DE DUAS EQUAÇÕES**

JOÃO PESSOA
2019

JÉSSICA VICKY BERNARDO DE OLIVEIRA

**NÍVEIS DE METILAÇÃO DOS GENES *LPL*, *ADRB3* E *MTHFR*, STATUS
INFLAMATÓRIO, ANTROPOMÉTRICO E ALIMENTAR EM
INDIVÍDUOS COM ESTIMATIVAS DE LDL-C CALCULADAS A
PARTIR DE DUAS EQUAÇÕES**

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
2019**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

O48n Oliveira, Jéssica Vicky Bernardo de.
Níveis de metilação dos genes LPL, ADRB3 e MTHFR, status inflamatório, antropométrico e alimentar em indivíduos com estimativas de LDL-C calculadas a partir de duas equações / Jéssica Vicky Bernardo de Oliveira.
- João Pessoa, 2019.
121 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Lipoproteína de baixa densidade. 2. Epigenética. 3. Metilação do DNA. 4. Doença Cardiovascular. 5. Equação de Friedewald - Equação de Martin. I. Título

UFPB/BC

JÉSSICA VICKY BERNARDO DE OLIVEIRA

**NÍVEIS DE METILAÇÃO DOS GENES *LPL*, *ADRB3* E *MTHFR*, STATUS
INFLAMATÓRIO, ANTROPOMÉTRICO E ALIMENTAR EM
INDIVÍDUOS COM ESTIMATIVAS DE LDL-C CALCULADAS A
PARTIR DE DUAS EQUAÇÕES**

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: 28 / 05 / 2019

BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Maria José de Carvalho Costa
Orientadora titular

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



Profª Drª Maria da Conceição Rodrigues Gonçalves
Membro interno – Titular

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

Profª Drª Flávia Emília Leite de Lima Ferreira

Membro Interno - Suplente

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

Profª Drª Alcides da Silva Diniz

Membro externo - Titular

(UFPE/ Departamento de Nutrição/Centro de Ciências da Saúde)

Profª Drª Naila Francis Paulo de Oliveira

Membro externo- Suplente

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

JOÃO PESSOA

2019

Dedico este trabalho a **Deus**, aos meus familiares, em especial a minha mãe Gilda Bernardo de Oliveira e a querida e amada Professora Maria José de Carvalho Costa.

AGRADECIMENTOS

À *Deus* por ser meu guia, a força que me sustenta em todos os momentos da minha vida, e por me permitir viver e aprender todos os dias durante minha jornada.

Aos meus pais *Gilda Bernardo de Oliveira* e *Orlando Oliveira dos Santos* por todo amor, dedicação e renúncia para que hoje eu pudesse estar conquistando meus sonhos. Sem vocês não teria chegado até aqui. Amo vocês incondicionalmente! Também agradeço ao meu padrasto *João de Deus do Nascimento da Silva Duarte* por toda paciência e educação em me ajudar todas as vezes que precisei.

Aos meus irmãos *Paulo Victor Bernardo Aranha* por todo carinho, apoio e atenção e ao meu irmão *João Alexandre Bernardo Aranha* pelo incentivo e preocupação em todos os momentos. Obrigada por torcerem pelo meu crescimento profissional, me apoiando com palavras e com atitudes. Estendo meu agradecimento às minhas cunhadas e meus sobrinhos: *Clara Yasmin*, *Camilly Fernandes*, *Levi Aranha* e *Joaquim Vieira*, pois sempre estão ao meu lado me fazendo muito feliz. Amo vocês!

À *Rafael de Aragão Costa Ferreira*, por seu carinho, paciência, compreensão e amor. Obrigada por estar sempre ao meu lado me apoiando em todos os momentos. Obrigada por sua alegria que me contagia e me faz ser tão feliz ao seu lado. Amo muito você!

Agradeço à minha amada orientadora, a professora Dr^a *Maria José de Carvalho Costa* que desde à graduação me acolheu e me incentivou nessa caminhada. Meus sinceros agradecimentos por todo apoio na concretização deste trabalho. Seu carinho em me passar conhecimento, sua amizade, disponibilidade e paciência me fizeram lhe admirar ainda mais. Obrigada por toda humildade em tudo o que faz e por passar com tanto amor seu conhecimento adquirido durante anos de dedicação. A Senhora sempre será um exemplo para mim. Muito obrigada por tudo!

Ao querido professor Dr^o. *Malaquias Batista Filho*, por sempre nos inspirar com todo seu conhecimento, dedicação, competência e sensibilidade. Quero ter o privilégio de continuar aprendendo com o senhor!

Aos queridos professores Doutores, *Alcides da Silva Diniz*, *Naila Francis de Paulo Oliveira*, *Maria da Conceição Rodrigues Gonçalves*, *Flávia Emília Leite de Lima Ferreira*, por tão gentilmente terem aceitado o convite para participação nesta banca, por toda atenção e pelas excelentes sugestões que ajudaram na finalização deste trabalho. A todos, meu muito obrigada!

Externo minha gratidão à *Raquel Patrícia Ataíde Lima*, por ter se dedicado na execução das análises de metilação dos genes, obrigada por toda sua disponibilidade em me ajudar e sanar

minhas dúvidas. Estendo esse agradecimento à equipe do Laboratório - Labim: *Rayner Ferreira e Mayara Karla*, que também contribuíram na execução das análises.

À Profª Drª. *Ana Hermínia Andrade e Silva* por toda sua competência em me ajudar nas análises estatísticas e a *Adenice Gomes de Oliveira Ferreira* por suas excelentes contribuições na conclusão deste trabalho.

Também quero agradecer a *Thamires Chaves, Nadjenny Ingrid, Keylha Querino, Marina Ramalho, Erika Sousa e Jéssica Lisboa* por toda atenção, carinho e ajuda neste percurso. O projetão (como convencionalmente chamamos o II DISANDNT/PB) me deu o melhor presente, que foi a amizade e o companheirismo de todas. Quero sempre ter vocês comigo. Obrigada por tudo!

À *Rafaela Cristhine Pordeus Luna* por sua disponibilidade em me ajudar no envio do artigo, à *Celso Costa da Silva Júnior* e a *Karla dos Santos Girão* pela atenção e companheirismo sempre que precisei. Quero ter sempre a amizade de vocês.

Ao Laboratório de Treinamento Físico Aplicado ao Desempenho e a Saúde, na pessoa do professor Drº Alexandre Sergio Silva.

À minha amiga *Surama Silva* e a *Mussara Monteiro* por toda dedicação e responsabilidade na condução das coletas sanguíneas em todas as etapas dessa pesquisa.

À toda equipe do projeto (coordenadores, professores e alunos), no qual me dedico desde a graduação, vocês contribuíram para a realização deste trabalho. Meu muito obrigada!

Aos participantes da pesquisa, por depositaram sua confiança na equipe e por contribuírem na concretização deste trabalho.

À coordenação, vice coordenação, professores e instituições executoras e financiadoras do Projeto II DISANDNT/PB, particularmente *UFPB, CAPES, CNPq e FAPESQ/PB*, por investir e incentivar a pesquisa científica, tornando possível a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, e a todos os professores que fazem parte do programa por terem sido fundamentais no meu crescimento e aperfeiçoamento profissional. Também agradeço aos funcionários do Programa, *Carlos e Marcos*, pela paciência e carinho, por sempre ajudarem quando precisamos.

Aos meus colegas da turma do Mestrado, por compartilharem dificuldades preocupações e desafios dessa caminhada. Agradeço em especial à *Thais Helena* e a *Caroline Severo*. Vocês são especiais!

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

Não te mandei eu? Esforça-te, e tem bom
ânimo; não temas, nem te espantes; porque
o Senhor teu Deus é contigo, por onde quer
que andares.

Josué 1:9

RESUMO

A concentração do colesterol da lipoproteína de baixa densidade tem sido considerada como um dos principais fatores de risco modificável para a doença cardiovascular e pode ser influenciada pelo *status* nutricional e por alterações no perfil de metilação de genes que estão envolvidos no metabolismo lipídico, dentre outros fatores. No entanto, existem dificuldades na obtenção das concentrações desta lipoproteína, pois os métodos diretos apresentam alto custo, sendo as equações de Friedewald e de Martin mais utilizadas para estimar suas concentrações. Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi estimar e comparar as concentrações da lipoproteína de baixa densidade estimadas pelas equações de Friedewald e de Martin e explorar a ocorrência de associação com os níveis de metilação dos genes *LPL*, *ADRB3* e *MTHFR*, *status* inflamatório, antropométrico e do consumo alimentar. Trata-se de um estudo transversal, de base populacional, envolvendo 236 adultos de ambos os sexos (37,5 anos), da zona leste e oeste do município de João Pessoa. A coleta de dados foi realizada mediante visitas domiciliares, após a realização de estudo piloto, onde foram aplicados questionários sobre caracterização socioeconômica, demográfica, epidemiológica, estilo de vida, consumo alimentar e estado antropométrico. Foram analisadas as concentrações séricas de capacidade antioxidante total, alfa-1-glicoproteína ácida, proteína C reativa, malondealdeído, perfil lipídico, ácido fólico, cobalamina e homocisteína. As análises dos níveis de metilação do DNA nos promotores dos genes *LPL*, *MTHFR*, *ADRB3* foram realizadas através do método *High Resolution Melting*. Houve diferença entre as concentrações da lipoproteína de baixa densidade em relação as duas estimativas de cálculo, sendo esses valores subestimados (10,57 mg/dL), quando calculados pela equação de Friedewald. Observou-se que o malondealdeído influenciou no aumento das concentrações da lipoproteína de baixa densidade estimada segundo as duas equações, em todos os modelos de regressão linear, com coeficientes entre 6,25 à 10,29 nmol/L e p-valor entre 0,000 à 0,020. Houve diminuição dos níveis de metilação do DNA no gene *ADRB3* e aumento dos níveis de metilação do DNA no gene *MTHFR* ($p < 0,05$) quando a lipoproteína de baixa densidade foi calculada pela equação de Martin (≥ 70 mg/dL). Verificou-se influência direta do consumo de colesterol e da homocisteína nas concentrações da lipoproteína de baixa densidade, estimados segundo Friedewald. Também encontrou-se relação positiva entre a circunferência da cintura e idade com concentrações da lipoproteína de baixa densidade, envolvendo os níveis de metilação dos três genes. Conclui-se que a variável que mais influenciou no aumento da lipoproteína de baixa densidade em todos os modelos, foi o malondealdeído, sendo o maior aumento desta, observado no modelo envolvendo o gene *MTHFR*, segundo Friedewald. Os níveis de metilação dos genes *ADRB3* e *MTHFR* foram diferentes segundo a equação de Martin, utilizando-se como ponto de corte, menores concentrações da lipoproteína de baixa densidade. Este estudo é inédito e poderá auxiliar na escolha da estimativa do cálculo da lipoproteína de baixa densidade na prática clínica em populações; como também direcionar estratégias de intervenção em relação as variáveis que influenciam no aumento das concentrações da lipoproteína de baixa densidade.

Palavras-chave: Lipoproteína de Baixa Densidade. Epigenética. Metilação do DNA. Doença Cardiovascular. Equação de Friedewald. Equação de Martin.

ABSTRACT

The concentration of low-density lipoprotein cholesterol has been considered as a major modifiable risk factor for cardiovascular disease and may be influenced by nutritional status and changes in the methylation profile of genes that are involved in lipid metabolism, among other factors. However, there are difficulties in obtaining the concentrations of this lipoprotein, since the direct methods are costly, with the Friedewald and Martin equations being used to estimate their concentrations. In this sense, the objective of the present study was to estimate and compare the concentrations of low density lipoprotein estimated by the Friedewald and Martin equations and to explore the occurrence of association with the methylation levels of the LPL, ADRB3 and MTHFR genes, inflammatory, anthropometric status and food consumption. This is a cross-sectional, population-based study involving 236 adults of both sexes (37.5 years), from the east and west areas of the municipality of João Pessoa. Data collection was performed through home visits, after conducting a pilot study, where questionnaires were applied on socioeconomic, demographic, epidemiological characterization, lifestyle, food consumption and anthropometric status. Serum concentrations of total antioxidant capacity, alpha-1-acid glycoprotein, C-reactive protein, malondealdehyde, lipid profile, folic acid, cobalamin and homocysteine were analyzed. Analyses of DNA methylation levels in the promoters of the LPL, MTHFR, ADRB3 genes were performed by the High Resolution Melting method. There were differences between the low density lipoprotein concentrations in relation to the two calculation estimates, these values being underestimated (10.57 mg / dL), when calculated by the Friedewald equation. It was observed that malondealdehyde influenced the increase of the low density lipoprotein concentrations estimated according to the two equations in all the linear regression models, with coefficients between 6.25 and 10.29 nmol / L and p-value between 0.000 and 0.020. DNA methylation levels decreased in the ADRB3 gene and increased DNA methylation levels in the MTHFR gene ($p < 0.05$) when low density lipoprotein was calculated by the Martin equation (≥ 70 mg / dL). It was verified The direct influence of cholesterol and homocysteine consumption on low-density lipoprotein concentrations, according to Friedewald. We also found a positive relationship between waist circumference and age with low density lipoprotein concentrations, involving the methylation levels of the three genes. It is concluded that the variable that most influenced the increase of low density lipoprotein in all models was malondealdehyde, the largest increase being observed in the model involving the MTHFR gene, according to Friedewald. The methylation levels of the ADRB3 and MTHFR genes were different according to Martin's equation, using lower cut-off concentrations of low-density lipoprotein. This study is unprecedented and may help in the estimation of the calculation of low density lipoprotein in clinical practice in populations; as well as to target intervention strategies in relation to the variables that influence the increase of low density lipoprotein concentrations.

Key words: Low Density Lipoprotein. Epigenetics. Methylation of DNA. Cardiovascular disease. Friedewald equation. Martin equation.

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS DA DISSERTAÇÃO

Figura 1	Mecanismo de metilação do DNA	29
Figura 2	Mapa utilizado no sorteio de quadras, João Pessoa/PB	49
Figura 3	Diagrama dos cálculos para definição da amostra da zona leste do município de João Pessoa	54
Figura 4	Diagrama dos cálculos para definição da amostra da zona oeste do município de João Pessoa	55
Figura 5	Fluxograma da coleta de dados	57
Figura 6	Coleta e isolamento do DNA a partir dos leucócitos	63

FIGURA DO ARTIGO

Figura 1	Curvas de densidade das concentrações de LDL-C distinguidas por métodos de cálculo	105
-----------------	--	-----

LISTA DE TABELAS

TABELAS DO ARTIGO

Tabela 1	Características da amostra quanto ao sexo, perfil lipídico e níveis de metilação dos genes <i>LPL</i> , <i>ADRB3</i> e <i>MTHFR</i> , segundo diferentes estimativas e pontos de corte das concentrações de LDL-C.....	106
Tabela 2	Relação entre as concentrações de LDL-C estimados com base na equação de Friedewald e de Martin com níveis de metilação dos genes <i>LPL</i> , <i>ADRB3</i> , <i>MTHFR</i> , estresse oxidativo, valores plasmáticos de vitamina B12 e folato.....	107
Tabela 3	Relação entre as concentrações de LDL-C estimadas com base na equação de Friedewald e de Martin com níveis de metilação dos genes <i>LPL</i> , <i>ADRB3</i> , <i>MTHFR</i> , e consumo alimentar habitual.....	108
Tabela 4	Relação entre as concentrações de LDL-C estimadas com base na equação de Friedewald e de Martin com níveis de metilação dos genes <i>LPL</i> , <i>ADRB3</i> , <i>MTHFR</i> , com variáveis demográficas, epidemiológicas, de estilo de vida e antropométrica.....	109
Tabela S1	Concentrações de LDL-C dos indivíduos que apresentavam alto risco cardiovascular com base no valor estimado da Pressão Arterial Sistólica de 160 mmHg (5%).....	122
Tabela S2	Concentrações de LDL-C dos indivíduos que apresentavam alto risco cardiovascular com base no valor estimado da Pressão Arterial Sistólica de 140 mmHg (3%).....	122

LISTA DE QUADROS

QUADROS DA TESE

Quadro 1	Critérios para estratificação final da amostra	49
Quadro 2	Estratificação dos bairros por renda com desvio padrão	51
Quadro 3	Cálculo da estimativa do tamanho da amostra, por zona	51
Quadro 4	Amostra de quadras por bairro, número de quadras sorteadas por bairro e zonas visitadas	52

QUADRO DO ARTIGO

Quadro 1	Desenho dos Primers	103
-----------------	---------------------------	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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”	
5mC	5-metilcitosina
EPA	<i>Eicosapentaenoic acid</i> (Ácido Eicosapentaenoico)
AGL	Ácidos Graxos Livres
AGP	Alfa-1-Glicoproteína Ácida
AGS	Ácidos Graxos Saturados
AGT	Ácidos Graxos Trans
AIT	Ataque Isquêmico Transitório
AVC	Acidente Vascular Cerebral
CAT	Capacidade Antioxidante Total
DAC	Doença Arterial Coronária
DCV	Doença Cardiovascular
DMT2	Diabetes Mellitus Tipo 2
DRIs	<i>Dietary Reference Intakes</i> (Referência de Ingestão Diária)
DHA	<i>Docosahexaenoic acid</i> (Ácido Docosahexaenoico)
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
DNMTs	DNA-Metiltransferases
FRAP	<i>Ferric Reducing Ability of Plasma</i> (Potencial Antioxidante Redutor Férrico)
FRs	Fatores de Risco
SAH	<i>S-Adenosylhomocysteine</i> (S-Adenosilhomocisteína)
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HCy	<i>Homocysteine</i> (Homocisteína)
HDL- C	<i>High Density Lipoprotein Cholesterol</i> (Colesterol Ligado a Lipoproteína de Alta Densidade)
HHCy	<i>Hiperhomocysteine</i> (Hiperhomocisteinemia)
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICC	Insuficiência Cardíaca Crônica

IMC	Índice de Massa Corporal
LDL-C	<i>Low Density Lipoprotein Cholesterol</i> (Colesterol Ligado a Lipoproteína de Baixa Densidade)
MDA	Malondialdeído
MSM	<i>Multiple Source Method</i> (Método de Múltiplas Fontes)
MTHFR	Metilenotetarhidrofolato Redutase
NCEP-ATP III	Terceiro Relatório do Painel de Especialistas do Programa Nacional de Educação sobre Colesterol, que Versa Sobre Detecção, Avaliação e Tratamento de Colesterol Elevado no Sangue em Adultos.
NHANES	<i>National Health and Nutrition Examination Survey</i> (Pesquisa Nacional de Saúde e Nutrição)
ON	Óxido Nítrico
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity (Capacidade de Absorção dos Radicais Oxigenados)
PA	Pressão Arterial
PCR	Proteína C-reativa
PCR-us	PCR Ultrassensível
R24h	Recordatório 24 horas
SAM	S-adenosilmetionina
SAH	S-adenosilhomocisteína
Se	Selênio
SM	Síndrome Metabólica
TBARS	<i>Thiobarbituric Acid Reactive Substances</i> (Ácido tiobarbitúrico)
TCA	<i>Trichloroacetic acid</i> Ácido (Tri-cloro Acético)
TCEP	<i>Tris-carboxyethylphosphine Reducing Agent</i> (Agente Redutor Tris-carboxietilfosfina)
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TAV	Tecido Adiposo Visceral
TG	Triglicérides
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor-α</i> (Fator de Necrose Tumoral- α)
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i> (Lipoproteína de Muito Baixa Densidade)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
2.1 FATORES DE RISCO CARDIOVASCULAR	20
2.2 CIRCUNFERÊNCIA DA CINTURA VERSUS DISLIPDEMIA.....	23
2.3 MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DA LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE.....	25
2.4 NUTRIGENÔMICA E EPIGENÉTICA	27
2.4.1 Metilação do DNA	28
2.4.1.1 Gene que Codifica a Lipoproteína Lipase (<i>LPL</i>)	30
2.4.1.2 Gene que Codifica o Receptor Beta-adrenérgico 3 (<i>LPL</i>).....	32
2.4.1.3 Gene que Codifica a Enzima Metilenotetrahydrofolato Redutase (<i>MTHFR</i>).....	33
2.5 EXTRESSE OXIDATIVO E INFLAMAÇÃO	34
2.6 CONSUMO ALIMENTAR	39
2.6.1 Compostos Antioxidantes	39
2.6.2 Consumo de Gorduras.....	43
3 ABORDAGEM METODOLÓGICA.....	48
3.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO	48
3.2 QUESTÕES ÉTICAS.....	48
3.3 PROTOCOLO AMOSTRAL.....	48
3.4 POPULAÇÃO E AMOSTRA	52
3.4.1 Critérios de inclusão	53
3.4.2 Critérios de exclusão.....	53
3.5 COLETA DE DADOS	56
3.6 AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA.....	56
3.7 AVALIAÇÃO DO CONSUMO ALIMENTAR.....	56
3.8 ESTIMATIVAS PARA O CÁLCULO DA LDL-C	59
3.9 AVALIAÇÃO DO RISCO CARDIOVASCULAR	59
3.10 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	60
3.10.1 Perfil Lipídico	60
3.10.2 Malondealdeído	60
3.10.3 Capacidade Antioxidante Total.....	61
3.10.4 Alfa-1-glicoproteína Ácida	61
3.10.5 Homocisteína	61
3.10.6 Ácido Fólico e Cobalamina (vitamina B12)	62
3.11 ANÁLISE DO NÍVEL DE METILAÇÃO	62
3.11.1 Obtenção da Amostra e Extração do DNA a partir do Sangue	62
3.11.2 Desenho dos Primers	64
3.11.3 Conversão do DNA pelo Bisulfito de Sódio	64
3.11.4 Níveis de Metilação	64
3.12 Tratamento Estatístico	65

REFERÊNCIAS	67
APÊNDICE.....	87
APÊNDICE A- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO	88
APÊNDICE B- DESENHO DOS PRIMERS	89
ANEXO	90
ANEXO A- CERTIDÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	91
ANEXO B- IDENTIFICAÇÃO DO DISTRITO, NÚMERO DO CASO E USF	92
ANEXO C- CARACTERIZAÇÃO SOCIOECONÔMICA E DEMOGRÁFICA	93
ANEXO D- CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA	94
ANEXO E- RECORDATÓRIO ALIMENTAR.....	95
ANEXO F- AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA.....	96
ARTIGO	97

1. INTRODUÇÃO

A doença cardiovascular (DCV) é a causa mais comum de morte global (HEDMAN et al., 2016). No Brasil, representa cerca de 30% dos óbitos e dados apontam que morrem mais pessoas anualmente por causa dessa doença do que por qualquer outra. A estimativa é que as DCVs levem à morte, ao longo do ano, cerca de 350.000 brasileiros (MALACHIAS et al., 2016; SIMÃO et al., 2017).

Nesse contexto, o colesterol da lipoproteína de baixa densidade, cuja sigla vem do inglês, *Low Density Lipoprotein* (LDL-C), tem sido considerado como um dos principais fatores de risco modificável para DCV (NCEP – ATP III- 2002; LEE et al., 2018). Ademais, os mais baixos níveis de LDL-C atingidos já foram associados à menores taxas de eventos coronarianos (SILVERMAN et al., 2016).

Acerca dessa temática, embora as diretrizes sobre Doença Cardiovascular Aterosclerótica do Colégio Americano de Cardiologia (ACC) e pela American Heart Association (AHA) (STONE et al., 2014; JACOBSON et al., 2015b) não forneça uma recomendação para ou contra alvos específicos de LDL-C, a diretriz do Painel de especialistas em detecção, avaliação e tratamento, de colesterol alto no sangue em adultos (NCEP-ATP III), determina as metas de tratamento da LDL-C para o gerenciamento do perfil lipídico (NCEP-ATP III, 2002).

Nesse sentido, em exames de saúde em larga escala, e na prática clínica em todo o mundo, a LDL-C, há mais de 40 anos, é normalmente estimada, utilizando o valor obtido a partir do cálculo realizado pela equação de Friedewald; evitando, desse modo, o uso de métodos de alto custo (STEIN, 2014; LEE; JANG; SON, 2016). No entanto, mesmo quando os níveis de triglicérides estão abaixo de 400 mg / dL - cuja imprecisão acima desse valor já tinha sido reconhecida por Friedewald; Levy; Fredrickson (1972) -, alguns estudiosos sugeriram que a LDL-C calculada por essa fórmula, subestima a LDL-C e, por esse motivo, classifica erroneamente o risco de DCV, principalmente em indivíduos com níveis altos de triglicérides (TG) (OLIVEIRA et al., 2013; MARTIN et al., 2018; LEE et al., 2018).

Por conseguinte, recentemente Martin et al. (2013) propôs, alternativamente à equação de Friedewald, uma nova equação para estimar a LDL-C em níveis de TG abaixo de 400 mg / dL. Essa nova Equação de Martin usa um fator individualizado para explicar a heterogeneidade na relação TG para Lipoproteína de Muito Baixa Densidade (VLDL-C), permitindo a melhora da precisão nas concentrações de LDL-C, principalmente em níveis baixos (WHELTON et al., 2017).

Em adição à melhora da acurácia, quanto à avaliação das concentrações de LDL-C, na orientação de decisões terapêuticas, biomarcadores do estresse oxidativo e da inflamação vascular estão intimamente relacionados com a disfunção endotelial e com danos vasculares, base para desenvolvimento da DCV (SITI; KAMISAH; KAMSIAH, 2015); com destaque para Malondialdeído (MDA) (ZHANG et al., 2018), Capacidade Antioxidante Total (CAT) (COSTA et al., 2017), Alfa-1-Glicoproteína Ácida (AGP) (BERNTSSON et al. 2016), Proteína C-Reativa (PCR) (ROHNER et al., 2017) e Homocisteína (Hcy) (ANNIWAER et al. 2018).

Nesse âmbito, níveis elevados de Hcy plasmática têm sido denominados como um dos "fatores de risco emergentes" (SELHUB, 2006; MARTÍ-CARVAJAL et al., 2009). Sobre essa questão, Rimm; Stampfer, (2011) relataram que a adição da concentração total de Hcy, no score de risco de Framingham, foi associado a uma reclassificação de aproximadamente 20% de pacientes com risco intermediário. Esses resultados indicam que pacientes com alta concentração de Hcy total no sangue estão em maior risco de desenvolver DCV (SPENCE; YI; HANKEY, 2017).

Além disso, atualmente, é consenso que quanto maior a medida da circunferência abdominal, maior o risco de anormalidades metabólicas e mortalidade por todas as causas (TRAN et al., 2018). No estudo de Zaid e Hasnain (2018), foi observado que a circunferência da cintura (CC) permite uma compreensão em relação as mudanças na LDL-C e isso pode ajudar a antecipar a redução da LDL-C que pode ser alcançada através da perda de peso que também irá contribuir para a diminuição significativa das concentrações plasmáticas de PCR e da AGP, melhorando os valores do perfil lipídico [Colesterol Total (CT), TG, LDL-C e Lipoproteína de Alta Densidade (HDL)] e de variáveis inflamatórias.

Nesse contexto, vias moleculares podem ser afetadas por fatores nutricionais - a partir de complexas interações com mecanismos epigenéticos: metilação do DNA, modificações de histonas e RNA não codificante – possibilitando uma dinâmica regulação da expressão gênica, que controla o fenótipo celular (PARK et al., 2017).

A metilação do DNA, marca epigenética mais estudada (SELHUB, 2006), regula a transcrição de muitos genes; impedindo a ligação do fator de transcrição ou promovendo a ligação de proteínas de ligação a metil, causando inibição ou diminuição da expressão gênica (PORTELA; ESTELLER, 2010). Considera-se também que modificações no perfil de metilação podem levar a alterações na expressão enzimática, passíveis de causar desregulação do metabolismo das gorduras (dos SANTOS NUNES et al., 2017), contribuindo para o perfil de risco cardiovascular (PFEIFFER et al., 2015).

Pesquisas realizadas neste campo, comprovam que o perfil hipermetilado do gene que codifica a enzima metilenotetrahidrofolato redutase (*MTHFR*), está associado a um maior nível de CT ($p = 0,0103$), e LDL-C ($p = 0,0415$) em indivíduos com Retinopatia Diabética (dos SANTOS NUNES et al., 2017). No estudo de Lima et al. (2017), realizado em mulheres com excesso de peso e obesidade, os maiores níveis de metilação do gene do receptor beta-adrenérgico 3 (*ADRB3*) foram relacionados ao menor decréscimo na LDL-C. Quanto ao gene *LPL*, este codifica a Lipoproteína Lipase (LpL), que é associada ao endotélio; sua maior metilação foi observada nas mais graves condições dos componentes da Síndrome Metabólica (SM), resultando na diminuição significativa em sua expressão (CASTELLANO-CASTILLO et al., 2018).

Nesse sentido, considerando que os padrões de metilação respondem às mudanças no *status* da nutrição, pois são altamente específicos de tecidos e células (ZHANG, 2015), e que tanto as concentrações de LDL-C quanto suas modificações terapêuticas estão associadas com futuras doenças cardiovasculares, em maior grau do que as concentrações de TG ou HDL-C (ZAID; HASNAIN, 2018), este estudo objetivou estimar e comparar as concentrações da LDL-C estimadas pelas equações de Friedewald e de Martin e explorar a ocorrência de associação com os níveis de metilação dos genes *LPL*, *ADRB3* e *MTHFR*, *status* inflamatório, antropométrico e do consumo alimentar.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 FATORES DE RISCO CARDIOVASCULAR

A Doença Cardiovascular pode ser caracterizada como um grupo de condições multifatoriais associadas a doenças como: obesidade, aterosclerose, Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) e trombose (GABOON, 2011). As DCVs são a principal causa de morte em todo o mundo (WHO, 2016). O desenvolvimento da DCV é influenciado por fatores genéticos e ambientais, que precisam ser cuidadosamente considerados para determinar intervenções individuais específicas. A determinação da aplicabilidade de modelos de previsão de risco cardiovascular para populações é vital no fornecimento de cuidados culturalmente competentes (ANCHETA et al., 2017; PLETCHER; MORAN, 2017).

É consensual, que os Fatores de Risco (FR) cardiovascular se agregam e interagem multiplicativamente para promover o risco vascular. Esse conhecimento conduziu ao desenvolvimento da previsão de algoritmos relativos à fatores de risco multivariável, que pode ser usado convenientemente para avaliação do risco geral de DCV, e do risco de eventos cardiovasculares individuais (doença arterial coronariana, cerebrovascular, periférica e insuficiência cardíaca). Nestas circunstâncias, as taxas de eventos cardiovasculares absolutos podem ser utilizadas para quantificar o risco e orientar os cuidados preventivos (D'AGOSTINO et al., 2008).

Sobre esta problemática, as pesquisas epidemiológicas desenvolvidas na cidade americana de Framingham (*Framingham Heart Study*), ao final da década de 1940, constituem o marco inicial - e um dos mais importantes avanços científicos - que estabeleceu a base de conhecimentos capaz de correlacionar FRs com a DCV, de forma inequívoca (MAHMOOD et al., 2014). Resultados importantes, pois resultaram na possibilidade de produzir intervenções estratégicas e efetiva sobre os FRs; além de reduzir a prevalência da morbimortalidade das DCV.

Nesse cenário, investigadores identificaram os principais FRs independente que representam a maior carga de DCV na comunidade. Os efeitos de fatores como: idade, HAS, diabetes, tabagismo, CT (ou LDL-C) alto e baixos níveis de HDL-C no sangue, foram utilizados na formulação de um *score* de risco, já em uso, há vários anos (KANNEL; MCGEE; GORDON, 1976). A utilização do mesmo continua sendo recomendado pelas diretrizes internacionais atuais (GRUNDY et al., 2014; ZAMBON et al., 2014; ANDERSON et al., 2016),

por ser considerada uma ferramenta simples e validada, cujo uso permite identificar sujeitos em risco de DCV (LUI et al., 2017).

A utilização de categorias de FR, foi substituída pelo modelo de valores contínuos, permitindo o uso de tabelas de pesquisa com o fim de obter estimativas de risco, cuja aferição do risco aproximado, de morbidade e mortalidade por DCV previsto para os próximos 10 anos, forneceu uma maneira conveniente de classificar indivíduos com risco baixo, intermediário ou alto, propensos ao desencadeamento de doenças coronárias (MAHMOOD et al., 2014).

Um agravante no contexto das DCV é o fato de que existe um aumento do envelhecimento global dos indivíduos, e isto sinaliza para o aumento das populações com insuficiência cardíaca crônica (ICC). Estudos recentes indicam que aproximadamente 20% das pessoas no mundo sofrerão Infarto Agudo do Miocárdio (IAM), em algum momento de sua vida (HOU et al., 2014). Nesse âmbito, o hábito de fumar é o fator de risco mais importante para DCV; todavia, a cessação do tabagismo previne a mortalidade e morbidade por DCV de forma rápida e eficaz (DESGRAZ et al., 2017).

Os fumantes representam um desafio, no que diz respeito ao cuidado, devido à forte dependência à nicotina, e, a negação do risco pessoal (viés otimista). No estudo de Desgraz et al. (2017), o *score* de Framingham foi utilizado na codificação do risco cardiovascular para cada participante. Como resultado do estudo, 12-19% dos fumantes apresentaram percepção errônea do seu risco DCV de 10 anos, sob a forma de subestimação; dado que pode dificultar a eficiência de intervenções destinadas a reduzir ou prevenir FRs da DCV; além de possibilitar o aumento da morbidade e mortalidade.

Outro agravante é a presença de diabetes mellitus tipo 2 (DMT2). Esta pode duplicar o risco de mortalidade cardiovascular, quando comparadas a indivíduos sem diabetes (MASSON et al., 2017). Na cidade de Framingham, a mortalidade cardiovascular foi 3 vezes maior para indivíduos com diabetes (MAHMOOD et al., 2014). Adicionalmente, estudiosos já observaram que o prognóstico cardiovascular de pacientes com diabetes, sem IAM, era semelhante aos pacientes sem diabetes, todavia apresentado história de IAM (JUUTILAINEN et al., 2005). Sobre essa questão, o terceiro relatório do painel de especialistas do *National Cholesterol Education Program*, que versa sobre detecção, avaliação e tratamento de colesterol elevado em adultos, considerou o paciente com diabetes como "equivalente coronário" (NCEP-ATP-III, 2002).

Os indivíduos não diabéticos têm alterações no metabolismo das lipoproteínas hepáticas devido resistência à insulina; situação que ocorre quando os níveis de glicose ainda são normais. Como essa resistência está associada ao DMT2, IAM e mortalidade geral, em sujeitos não

diabéticos, a identificação realizada de forma precoce desses processos é de extrema importância (HARADA et al., 2017).

Em contrapartida, os pacientes com diabetes, com ou sem FR adicionais ou danos aos órgãos alvos, são considerados como sendo de "muito alto risco" ou de "alto risco", respectivamente; apresentando diferentes metas de LDL-C recomendados em ambos os grupos, de acordo com as diretrizes européias para o tratamento do colesterol (PERK et al., 2012). Com base em uma meta-análise de ensaios clínicos randomizados, observou-se que uma redução de 40% na LDL-C e aumento de 30% no HDL-C, poderia reduzir o risco cardiovascular em 70% (ABDEL-MAKSoud et al., 2008).

Sabe-se que a LDL-C é um fator de risco primário para a aterosclerose, mas é também associado, de forma independente, à pressão arterial (PA), a sua elevação e desenvolvimento futuro de hipertensão (CHOUDHARY et al., 2019). Além disso, a LDL-C foi estabelecida como um importante marcador prognóstico e atua como o principal alvo terapêutico para a prevenção da doença arterial coronária (DAC). Em consequente, altas concentrações de LDL-C e baixos valores da HDL-C, foram associado ao risco de DAC (ITO et al., 2013).

Estudiosos apontam que subfrações de LDL-C pequenas e densas são mais aterogênicas do que as grandes subfrações de LDL-C, por apresentarem maior grau de penetração na parede arterial, menor afinidade por receptores de LDL, menor resistência ao estresse oxidativo e maior meia-vida circulante (MAEDA et al., 2012) .

Foi proposto que as características das subfrações são determinantes mais importantes, para as funções ateroprotetoras das LDL-C e HDL-C, do que seus níveis circulantes totais. Assim, as concentrações de LDL-C e HDL-C, por si só, podem não refletir um perfil benéfico ou de risco para DCV. De fato, o conhecimento atual sobre a biologia das lipoproteínas aponta para a existência de diferentes propriedades aterogênicas / ateroprotetoras de diferentes subfrações de lipoproteínas (COIMBRA et al., 2019). Todavia, devido ao custo elevado dessas análises, as quais realizadas de forma direta, a LDL estimada com base na Equação de Friedwald ainda é o método de cálculo mais rotineiramente utilizado na prática clínica, seja em laboratórios, seja em estudos de base populacional, seguido da equação descrita por Martin et al. (2013) (FALUDI et al., 2017).

Outro fator importante, também relacionado com a DCV, é a presença da hipertensão arterial. Sabe-se que a mortalidade por DCV aumenta progressivamente com a elevação da pressão arterial (PA), a partir de 115/75 mmHg de forma linear, contínua e independente (SIMÃO et al., 2013). Desse modo, a redução da PA proporciona proteção relativa semelhante, em todos os níveis de risco cardiovascular basal. Nesse sentido, foi demonstrado por meio de

uma meta-análise, que a redução da PA proporciona diminuições consistentes, proporcionais ao risco vascular, com maiores reduções nas pessoas com maior risco absoluto (BLOOD, 2014).

Além desses fatores, o ganho de peso precoce, induzido pela dieta rica em gordura, foi identificado como um preditor de doença cardíaca; e apontado como um dos mais sérios problemas de saúde pública. Ademais, é importante ressaltar que o risco cardiovascular aumentado em indivíduos obesos é frequentemente atribuído à FRs coexistentes, pois ocorre concomitantemente com a existência de problemas como hipertensão, lipídios elevados e diabetes (MAHMOOD et al., 2014).

2.2 CIRCUNFERÊNCIA DA CINTURA *VERSUS* DISLIPDEMIA

A presença de sobrepeso e obesidade, especialmente a obesidade central, é provavelmente a principal causa da SM, que se apresenta por meio da resistência à insulina, DMT2, HAS, síndrome da apnéia obstrutiva do sono, doença hepática gordurosa não alcoólica e dislipidemia (BODEN, 2011; ZALESIN et al., 2011).

Existem diferenças na configuração corporal e no acúmulo de gordura regional nos níveis de adiposidade, sendo a obesidade subcutânea, caracterizada pelo excesso de gordura encontrado ao redor das áreas do quadril e coxa; e obesidade visceral - que tende a ser mais perniciosa a saúde - concentrada na região abdominal, principalmente no tecido adiposo mesentérico (GONZÁLEZ-MUNIESA et al., 2017).

A obesidade visceral, também conhecida como excesso de Tecido Adiposo Visceral (TAV), leva à resistência à insulina, em parte mediada por adipocinas e ácidos graxos livres (AGL). As adipocinas, como a resistina e a proteína 4 de ligação ao retinol, diminuem a sensibilidade à insulina; enquanto a leptina e a adiponectina têm o efeito oposto. Além disso, o acúmulo de gordura visceral faz com que citocinas como Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) e Interleucina 6 sejam liberadas por macrófagos no tecido adiposo (FLOCK; GREEN; KRIS-ETHERTON, 2011).

Nesse cenário, a dislipidemia é uma característica fundamental da obesidade; amplamente reconhecida como um grande fator de risco para disfunção vascular (TSAI et al., 2018). É considerada como sendo uma desordem multifatorial, cuja existência recebe influência advindas do estilo de vida; como também de fatores genéticos e ambientais (HALCOX et al., 2017). Desse modo, as dislipidemias cobrem um amplo espectro de distúrbios lipídicos; como resultado, uma alta proporção de pacientes apresentam complexas anormalidades nos valores lipídicos (KUTKIENE et al., 2018).

A dislipidemia típica da obesidade consiste no aumento dos TG e AGL, diminuição do HDL-C e LDL-C normal ou levemente aumentado (a partir da elevação de LDL-C pequeno e denso). Nesses casos, as concentrações de apolipoproteína plasmática (apo) B também são frequentemente aumentadas; em parte devido à superprodução hepática de lipoproteínas que contém apo B (FRANSSEN et al., 2011; WANG; PENG, 2011).

No estudo realizado por Zaid e Hasnain (2018) foi identificado que indivíduos que apresentam dislipidemia apresentam valores significativamente maiores para diferentes variáveis antropométricas, em comparação com indivíduos que não manifestam este tipo de desordem. Entre estes valores estão o percentual de gordura corporal e CC. A CC, que é um indicador do acúmulo central de gordura e da quantidade de tecido adiposo intra-abdominal; quando em níveis elevados, confere risco aumentado de doença (MIYAWAKI et al., 2004).

Os índices baseados na CC, por sua vez, podem ser empregados como indicadores substitutos da obesidade visceral, com o objetivo de prever morbidade e mortalidade à nível populacional. Estes índices antropométricos são utilizados em estudos epidemiológicos voltados para vigilância populacional de fatores de risco para doenças crônicas. Isto porque podem ser facilmente medidos e possuem baixo custo (TRAN et al., 2018). Há evidência de que a CC foi mais informativa do que o Índice de Massa Corporal (IMC), na prevenção do risco de DCV, em estudo de base populacional (TRAN et al., 2018).

Nesse cenário, a compreensão quanto às mudanças na LDL-C, no que diz respeito ao aumento da CC, permite prever alterações nas concentrações de LDL-C. Essa modificação pode ser alcançada através da mudança do peso (LACRAUSTA et al., 2018). No estudo de Lacrausta et al. (2018), observou-se que a maior CC gera maiores concentrações de LDL-C, em indivíduos eutróficos e magros. Entretanto, entre pacientes obesos, a perda de peso limitada (5-10%), geralmente alcançado na prática Clínica, não fornece um benefício semelhante; por isso ressalta-se a importância do cuidado no ganho de peso desde o início desse processo.

Além do mais, foi demonstrado por Houde et al. (2015), que, em indivíduos com obesidade grave, de ambos os sexos (n = 73), as concentrações de LDL-C foram associadas com os níveis de metilação, mais especificamente no que diz respeito ao promotor do gene *LEP* e *ADIPOQ*. Esta situação sugere que a LDL-C pode regular o perfil epigenético no tecido adiposo subcutâneo e visceral. Nesse mesmo estudo, os níveis de metilação do DNA no promotor do gene *ADIPOQ*, no tecido adiposo subcutâneo, foi positivamente associado ao IMC e CC; enquanto os níveis de metilação do DNA, no gene *LEP* em células sanguíneas, foram negativamente associadas com IMC.

2.3 MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DA LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE

De acordo com a Pesquisa Nacional sobre Saúde e Nutrição, 11,7% dos adultos de 20 a 39 anos, e 41,2% dos adultos de 40 a 64 anos apresentavam níveis elevados de LDL-C (PENCINA et al., 2014). A redução da LDL-C continua a ser, portanto, o padrão de cuidado na prevenção primária e secundária da DCV (SATHIYAKUMAR et al., 2018). A Associação Norte Americana de Lipídios (JACOBSON et al., 2015a), e a Sociedade Norte Americana de Aterosclerose (GRUNDY et al., 2014) reconhecem as concentrações de LDL-C como sendo o alvo primário para a prevenção da DCV.

A LDL é uma lipoproteína, cuja função é transportar colesterol e TG, do fígado e intestino delgado às células e tecidos que necessitam destas substâncias. Em altas concentrações, acumulam-se nas paredes dos vasos sanguíneos, causando inflamação e obstrução; resultando em possível necrose, devido à falta de circulação sanguínea (IZAR et al., 2016).

Convencionalmente, um método indireto utilizado para estimar a concentração da LDL-C é a Equação de Friedwald, através da fórmula: $CT - HDL-C - (triglicerídeos / 5)$ em mg / dL. Esta equação foi baseada em uma análise completa das lipoproteínas existentes numa amostra de 448 indivíduos; feita, a partir de dados colhidos pelo Instituto Norte Americano do Coração e Pulmão, em pacientes normais, e em pacientes apresentando hiperlipoproteinemia, e com ausência de tratamento, dietético ou medicamentoso, no momento da amostragem (FRIEDEWALD; LEVY; FREDRICKSON, 1972). É relevante salientar que a maioria dos dados obtidos na pesquisa eram provenientes de pacientes que manifestavam hiperlipoproteinemia familiar e, como tal, não representam uma amostra da população geral.

Existem, no entanto, três restrições importantes para o uso do referido método. Primeira: não é aplicável a amostras do plasma contendo quilomícrons; segunda, a técnica para estimar LDL-C atribui incorretamente altos teores no paciente de caso raro, acometido de hiperlipoproteinemia do tipo III. Terceira: LDL-C nem sempre pode ser estimado com precisão, especialmente quando a concentração de TG no plasma ultrapassa 400 mg / 100 mL (FRIEDEWALD; LEVY; FREDRICKSON, 1972).

No entanto, já se sabe que aplicar um fator fixo de 5 para cada paciente é inconveniente, dada a variação na relação TG: VLDL-C, em toda a faixa dos níveis de TG e não-HDL-C. Neste sentido, Martin et al. (2013), desenvolveram e validaram uma nova equação a partir do perfil lipídico padrão. Nele, aplicaram um fator ajustável para a relação TG: VLDL-C, com base nas concentrações de TG e não-HDL-C. Outros estudos de prevalência clínica, relacionados a

pesquisa com lipídios, forneceram evidências adicionais sobre a variância, no qual a média TG: VLDL-C variou de 5,2 a 8,9 (DELONG, 1986).

É relevante destacar que o primeiro passo para avaliar a adequação da terapia cardiovascular é garantir a maior precisão possível do alvo primário de tratamento da DCV, a LDL-C. Sathiyakumar et al. (2018) encontraram pela primeira vez que apenas uma pequena porcentagem de indivíduos tem valores não-HDL-C acima dos valores recomendados para indivíduos com alto risco cardiovascular depois de usar um novo algoritmo que melhora a precisão da estimativa da LDL-C.

Essa nova abordagem integra um fator individualizado no denominador com o intento de explicar a heterogeneidade presente no triglicerídeo para fins de elevação da VLDL-C. Neste, o fator individualizado é escolhido entre 180 possíveis diferentes fatores, de acordo com as concentrações de TG e não-HDL-C (MARTIN et al., 2018). A equação de Martin, portanto, forneceu estimativas de maior fidelidade do que a equação de Friedewald, ou outros métodos equivalentes; principalmente quando utilizado para classificar os níveis de LDL-C, abaixo de 70 mg / dL, na presença de altos níveis de triglicérides (MARTIN et al., 2018). Para facilitar a sua utilização, ele pode ser livremente utilizado a partir de uma aplicação de smartphone¹. (SATHIYAKUMAR et al., 2018).

Como exemplo da EM, observa-se a seguir o que foi descrito por Sathiyakumar et al., (2018): “se o painel lipídico de um indivíduo é CT = 160 mg / dL; HDL-C = 40 mg / dL; e TG = 250 mg / dL, a relação TG: VLDL-C específica do paciente é 7,6 com base em um valor não-HDL-C de 120 mg / dL e valor de TG de 250 mg / dL”. Resulta, conforme o autor, em um “cálculo da nova LDL-C = 160 mg / dL menos 40 mg / dL menos 250 / 7,6 que é igual a 87 mg / dL”.

No estudo de Whelton et al. (2017), realizado com indivíduos apresentando alto risco cardiovascular, foi identificado que em todas as três coortes do estudo - [*National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) 2011-12 (n = 334), *Johns Hopkins* (n = 896), e *Mayo Clinic* (n = 1.151)] 15-20% - indivíduos foram classificados com uma LDL-C <70 mg / dL, que na realidade têm uma concentração ≥ 70 mg / dL pela EM. Nesse mesmo estudo, foi observado que, embora as análises enfatizem diferenças em grupos definidos com características de baixas concentrações de LDL-C, a distribuição global da LDL-C na coorte NHANES 2011-12, usando a equação de Friedwald ou a equação de Martin para o cálculo da LDL-C, foi similar.

¹ LDL Cholesterol Calculator. Disponível em: <https://www.hopkinsmedicine.org/apps/all-apps/ldl-cholesterol-calculator> Acesso em: (data).

2.4 NUTRIGENÔMICA E EPIGENÉTICA

Com o término do Projeto Genoma Humano - o qual lançou uma versão avançada do genoma humano, em 2003 -, e os avanços na biologia molecular, surgiu um novo campo de interesse, no domínio da pesquisa nutricional, intitulado nutrigenômica (LAU et al., 2008). Esta nova linha da nutrição molecular analisa a interação entre o comportamento dietético e o estilo de vida, buscando compreender como esses fatores interagem com o genoma, no que se refere aos termos de regulação de genes, considerados importantes no controle do metabolismo e na prevenção de doenças (THUNDERS; MANGAI; COOPER, 2013).

A nutrigenômica propõe terminologias, técnicas experimentais e abordagem fundamentalmente novas para pesquisa no campo da nutrição; além de tecnologias de alta eficiência, as quais permitem o estudo global da expressão gênica em células ou organismos (NEEHA; KINTH, 2013).

Este novo campo de interesse, caracteriza o impacto de todos os aspectos dos nutrientes como alimentação, limitação dietética ou agentes suplementares nutricionais, na expressão gênica. Essas orientações têm direcionado o interesse por pesquisa sobre temas a exemplo dos efeitos genéricos de nutrientes em transcriptômica, proteômica e metabolômica em células, tecidos ou organismos. Além disso, permite a possibilidade de caracterizar e confirmar os genes aptos a influenciar o risco de doenças que dependem de dieta, e também pode ser útil para entender como os nutrientes podem afetar as vias metabólicas, e ainda como esses mecanismos podem ser inibidos na fase inicial de doenças relacionadas à dieta (ELSAMANOUDY et al., 2016).

Nessa complexa interação entre gene e dieta, que pode ser benéfica ou não ao organismo, observa-se a participação da epigenética. Esta, pode ser definida como mudanças reversíveis hereditárias, na expressão fenotípica da informação genética, que não envolvem alterações na sequência do DNA (MARTINO et al., 2016). A herança epigenética é um mecanismo essencial que permite a propagação estável de estados de atividade genética de uma geração de células para as próximas (ABI KHALIL, 2014).

Os mecanismos subjacentes às alterações epigenéticas são complexos, dinâmicos e reversíveis. Envolvem metilação do DNA, modificações pós-traducionais em histonas (por acetilação, metilação, fosforilação e ubiquitinação), e regulação da expressão gênica por RNA não codificante (miRNAs) (ZHANG; REN, 2016). Muitos fatores afetam esses mecanismos, e podem modular a expressão gênica, e também afetar várias funções genéticas (SEO et al., 2015).

Tais mecanismos são influenciados e estimulados por fatores internos como: alterações na estrutura da cromatina, vias metabólicas, balanço neuroendócrino, atividades hormonais; e fatores externos como: nutrientes ou componentes alimentares bioativos, consumo de álcool, tabaco, uso de medicação, atividade física, radiação, organismos infecciosos e estresse (REMELY et al., 2015); uma vez que, a plasticidade inata, permite a adaptação celular às condições ambientais (PACCHIEROTTI; SPANÒ, 2015).

Ocorrendo a influência de fatores externos, os mecanismos epigenéticos regulam a transcrição de genes. Neste, o mesmo genoma pode fornecer diferentes e distintas características fenotípicas, sem necessariamente estar sujeito a qualquer alteração na sequência de seus nucleotídeos (KUNES et al., 2012). Nesse âmbito, estudo epidemiológico como o de Toraño et al. (2016) tem associado a exposição de fatores ambientais à mudanças epigenéticas - em sua maioria à alterações na metilação do DNA - durante o desenvolvimento “in útero”, vida adulta e envelhecimento.

Estudos epigenéticos revelaram um número significativo de modificações que afetam o desenvolvimento e a progressão da DCV (ABI KHALIL, 2014; KUMAR et al., 2014), e ainda alterações no perfil lipídico (HUBÁČEK, 2016). Dessa forma, a epigenética nutricional busca ajudar a esclarecer a forma como a nutrição poderá manter o indivíduo saudável. Para tanto, colabora na prevenção de doença, através do estudo dos efeitos dos nutrientes sobre o epigenoma; além de aconselhamento dietético específico para indivíduos com um fenótipo particular, cujo efeito pode ser mais efetivo na prevenção de doenças crônicas do que propriamente recomendações gerais sobre a dieta, destituídas de fundamentação epigenética (NIELSEN; EL-SOHEMY, 2012).

2.4.1 Metilação do DNA

Entre as possíveis modificações epigenéticas, a metilação do DNA - marca mais amplamente estudada (de la IGLESIA et al., 2013)-, desempenha papel importante na regulação da expressão de genes, pois está funcionalmente envolvida em muitas formas de repressão epigenética estável, como impressão, inativação do cromossomo X e silenciamento repetitivo de DNA (SCHÜBELER, 2015).

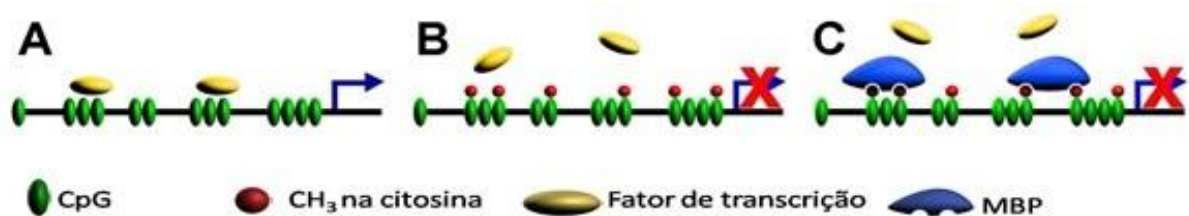
A metilação do DNA envolve a transferência de grupos metil (CH₃) da S-adenosilmetionina (SAM) para a posição 5 do anel de pirimidina, cuja reação é catalisada por DNA metiltransferases (DNMTs); resultando na formação de 5-metil-citosina (5mC) no DNA,

e de S-adenosilhomocisteína (SAH); sendo, a SAM o substrato principal que fornece o grupo -CH₃ real (ZHOU; ZHANG; XU, 2014).

Importantes classes de DNMTs estão envolvidas nos mecanismos de metilação do DNA; destas, foram identificadas quatro grupos principais em humanos (RAE, 2017). A DNMT1, cuja função é manter os padrões de metilação existentes da fita original. As DNMT3s (DNMT3a DNMT3b) que mantém relação com a regulação da metilação do DNA “*de novo*” - principal responsável pela metilação do DNA durante o desenvolvimento (diferenciação) -, e por fim, a DNMT3L a qual atua como um co-fator singular na metilação em células germinativas (HAGGARTY, 2015; SCHAPIRA; ARROWSMITH, 2016).

De forma mais frequente, a metilação ocorre em dinucleotídeo CpG ou “ilhas CpG”; estas são caracterizadas por uma citosina (C), seguida por uma guanina (G); ambas ligadas por um grupo fosfato mediador. As ilhas CpG podem ser definidas como regiões do DNA, superiores a 200 pares de bases, contendo um volume de dinucleótido C + G mais alto do que o esperado. Ilhas CpGs são freqüentemente associadas a promotores de genes, geralmente não metilados; desempenham um papel no controle da expressão gênica, especialmente em tecidos específicos (AFMAN; MÜLLER, 2012; SCHUBELER, 2015; GOEL; KARIR; GARG, 2017).

Figura 1. Mecanismo de Metilação do DNA



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

É importante destacar que a metilação apresenta efeitos distintos, os quais dependem da sua posição em relação aos genes de codificação. Neste caso, a hipometilação de ilhas CpG é geralmente associada com o aumento da expressão gênica; enquanto que a hipermetilação do promotor da ilha CpG é geralmente associada ao silenciamento da transcrição (JONES, 2012).

Sabe-se que alterações aberrantes, resultantes dos processos epigenéticos, podem desregular vias de sinalização, as quais por sua vez alteram várias funções celulares, ocasionando o desenvolvimento de diferentes doenças crônicas como DCV, metabólicas,

imunológicas, câncer, infertilidade, doenças respiratórias e patologias neurodegenerativas (ZOGHBI; BEAUDET, 2016).

No estudo de Kim et al. (2010), foi indentificado que os chineses de Singapura (n = 286), que apresentam histórico de DCV ou fatores de risco para DCV, têm maior estado global de metilação do DNA nos leucócitos; nesses casos, a inflamação sistêmica também pode levar ao aumento da metilação do DNA nos leucócitos.

Conforme estudiosos relataram, fatores de risco podem alterar diretamente o código epigenético e causar ativação permanente de mediadores inflamatórios chave; provocando produção sustentada de mediadores pró-inflamatórios (VINCI; POLVANI; PESCE, 2013). Além disso, o epigenoma também está envolvido em fatores de risco cardiovascular como o tabagismo (BURO-AURIEMMA et al., 2013), a diabetes (MAO et al., 2013), a HAS (RIVIÈRE et al., 2011), a idade e o perfil lipídico (ZHANG et al., 2013).

Pesquisadores apontam que a metilação global do DNA nas células do sangue tem sido usada como biomarcador epigenético com o fim de prever risco de doença; incluindo problemas cardiovasculares e DMT2 (KIM et al., 2010; MARTÍN-NÚÑEZ et al., 2014). Além da metilação global, estudos relataram que a metilação do DNA, em genes específicos, está relacionada às concentrações de lipídios do sangue. Nesse contexto, inclui-se a metilação em genes, os quais são conhecidos por estarem relacionados com a dislipidemia, como: *LPL*, *ADRB3* e *MTHFR* (GUAY et al., 2013; GUAY et al., 2014; BRAUN et al., 2016 CASTELLANO-CASTILLO et al., 2018).

Foi descrito que polimorfismos em genes, que alteram os níveis de CT, LDL-C, HDL-C e TG, explicam, no máximo, 30% da variabilidade dos lipídios plasmáticos; supõe-se ainda que mecanismos como a metilação do DNA, modificações de histonas e moléculas reguladoras de RNA são responsáveis pela proporção restante, em casos de determinação da dislipidemia (HUBÁČEK et al., 2016). Nesse sentido, mecanismos epigenéticos podem estar envolvidos na regulação do nível de lipídeos e, portanto, são passíveis de contribuir com a composição do perfil de risco cardiovascular (PFEIFFER et al., 2015).

2.4.1.1 Gene que Codifica a Lipoproteína Lipase (*LPL*)

A LpL codificada pelo gene *LPL*, ajudando a mediar a depuração dessas partículas (MEDH et al., 1996), e possibilitando uma conversão reduzida da VLDL em LDL que resulta em níveis mais baixos de LDL-C no plasma (ZHENG et al., 2007). Consequentemente, enzimas

como a LpL, que regulam o metabolismo das lipoproteínas no estado pós-prandial, são de interesse para a prevenção da DCV (SHATWAN et al., 2017).

Nesse contexto, foi demonstrado, em tecido adiposo de indivíduos obesos, que a quantidade de RNAm da *LPL* diminui conforme o IMC aumenta (CLEMENTE-POSTIGO et al., 2011). Adicionalmente, Drogan et al. (2015) verificaram que os níveis mais altos de metilação do DNA nos promotores do gene *LPL*, nas posições LPL-CG1 e LPL-CG2, foram associados com menor expressão de *LPL*; com maior ganho de CC, utilizando amostra de tecido adiposo subcutâneo de 59 indivíduos do estudo Europeu de Investigação Prospectiva sobre Câncer e Nutrição. Nesse mesmo estudo, a LPL-CG1 também foi positivamente associada ao IMC, massa gorda visceral e subcutânea que segundo o autor, possivelmente correlacionou-se ao grau de obesidade com os principais processos metabólicos no tecido adiposo subcutâneo.

Em pacientes com SM, o aumento significativo no *status* de metilação, no promotor do gene *LPL*, a partir de análises realizadas no TAV, correspondeu à uma diminuição significativa na expressão do RNAm da *LPL*, em referência aos indivíduos que não apresentavam SM. Também foi observado, que as mais graves condições dos componentes da SM, promoveu maior metilação do gene *LPL*; nesses indivíduos, a CC, glicemia, concentrações de TG em jejum e leptina sérica, apresentaram correlações significativas e positivas com os níveis de metilação do DNA da *LPL*. No entanto, não houve relação significativa da metilação desse gene com concentrações de LDL-C (CASTELLANO-CASTILLO et al., 2018).

De forma a acrescentar, não foi encontrada relação entre a metilação no promotor do gene *LPL* com concentrações de LDL-C, nos leucócitos e no TAV de homens com obesidade grave, mas se observou que nesses indivíduos, houve associação entre a metilação e os níveis de HDL-C, no entanto a correlação foi oposta à encontrada nos leucócitos de indivíduos com Hipercolesterolemia Familiar (HF). De acordo com o autor, o gene *LPL* parece ter um efeito específico e regulação distinta nestas duas condições, no qual, essa discrepância aparente é explicada pelas diferenças extremas no fenótipo entre obesidade severa e HF (GUAY et al., 2013).

Nesse contexto, Houde et al. (2014) ao analisarem os níveis de metilação do DNA na região promotora proximal do gene *LPL* (CpG1) e na ilha CpG intron 1 (CpGs 2 e 3), observaram que os níveis de metilação foram menores na placenta de mulheres com Diabetes Mellitus Gestacional e não encontraram relação entre as concentrações maternas de TG e LDL-C com a metilação do DNA no gene *LPL* na placenta. É importante destacar, que já foi identificado que o *status* desmetilado desse gene, acarretou uma superexpressão em células mononucleares do sangue periférico, e foi associado ao desfecho clínico ruim no prognóstico

da Leucemia Linfocítica Crônica não mutados, e além disso esta expressão foi dependente dos sinais do microambiente tecidual (ABREL et al., 2013).

2. 4.1.2 Gene que Codifica o Receptor Beta-adrenérgico 3 (*ADRB3*)

Quanto à proteína codificada pelo gene do receptor beta-adrenérgico 3 (*ADRB3*), pertencente à família dos receptores beta adrenérgicos, este possui diferentes funções, como a regulação da lipólise, em tecido adiposo branco e marrom, fornece AGL para a termogênese (KURYLOWICZ et al., 2015), além de responder a noradrenalina e mediar a lipólise em adipócitos (BRETTTFELD et al., 2012). Trata-se de um potencial gene, candidato à dislipidemia; considerando que, tanto as perturbações gênicas e epigênicas do *ADRB3* foram associadas ao perfil lipídico no sangue, em homens gravemente obesos (GUAY et al., 2014).

Nesse contexto, Guay et al. (2014) demonstraram que os níveis de metilação médio do gene *ADRB3*, no sangue de homens com HF, foram negativamente correlacionados com os níveis de LDL-C e de apoB, independentemente dos dois polimorfismos comuns do *ADRB3* (*ADRB3* g.-843C > T e p.W64R). Foi confirmado também uma associação entre a hipermetilação do promotor do gene *ADRB3* e uma partícula de HDL-C mais deletéria, a qual está caracterizada por baixo fosfolipídio, colesterol e partículas menores de HDL-C. Nesse mesmo estudo, análise de uma subamostra independente, com indivíduos gravemente obesos, permitiu identificar que o perfil hipermetilado do promotor do gene *ADRB3* no TAV, foi significativamente associado com a PA mais baixa, enquanto uma menor metilação desse gene no sangue, foi associada à maior relação cintura-quadril.

No estudo de Kurylowicz et al. (2015), a diminuição da expressão do gene *ADRB3*, no tecido adiposo subcutâneo de 58 obesos e 50 magros, está associada à obesidade; entretanto, não se relaciona com a hipermetilação. Esta situação demonstra que os níveis médios de metilação desse gene, no TAV, foram semelhantes em indivíduos magros e nos indivíduos que apresentavam obesidade grau III. Além disso, os níveis de expressão do gene *ADRB3* não apresentaram nenhuma relação significativa com dados clínicos, tais como: IMC, percentual do tecido adiposo, circunferência abdominal; nem tampouco a bioquímicos: glicemia de jejum, CT, LDL-C, HDL-C, TG e PCR.

No estudo de Lima et al. (2017), a intervenção dietética realizada com várias quantidades de folato de origem vegetal - valores menores que o recomendado pela *Dietary Reference Intakes* (DRIs) -, e também de ácidos graxos monoinsaturados da cápsula de óleo de avelã, identificaram, que nessa circunstância, mulheres acometidas com sobrepeso e obesidade,

obtiveram aumento nos valores de HDL-C, diminuição no MDA e aumento na CAT; em contrapartida, indivíduos com maiores índices de ingestão de gorduras monoinsaturadas e poli-insaturadas apresentaram os menores níveis de metilação do gene *ADRB3* e as maiores reduções na CC e na LDL-C. No entanto, não foi observada relação significativa entre os níveis de metilação do gene *ADRB3* e o perfil lipídico, em indivíduos distribuídos nas três categorias de IMC, consumindo baixas quantidades de folato, ou seja, sem intervenção dietética (de OLIVEIRA et al., 2018).

2.4.1.3 Gene que Codifica a Enzima Metilenotetrahidrofolato Redutase (*MTHFR*)

O gene *MTHFR* possui a função de codificar a enzima metilenotetrahidrofolato redutase (*MTHFR*), a qual participa da conversão da Hcy em metionina, substância fundamental no metabolismo do ácido fólico. No entanto, ineficiente atividade da *MTHFR* promove o acúmulo da Hcy, aumentando, dessa forma, o risco de desenvolvimento de DCV (FROSST et al., 1995; KLERK et al., 2002; MOLL; VARGA, 2015).

Foi identificado que a metilação do DNA tem um papel importante na regulação da transcrição do gene *MTHFR*, pois em sua região promotora existem duas ilhas CpGs, contendo sítios de ligação para vários fatores de transcrição (WEI et al., 2014). Além disso, pesquisadores sugerem que a hipermetilação do gene *MTHFR* pode levar à diminuição da expressão gênica e, consequentemente, à desregulação das reações de Hcy; desse modo, provocando à diminuição do radical metil e a consequente desregulação epigenética. Este resultado, deve-se a possível hipometilação do DNA e pode culminar no aumento da expressão de vários genes, incluindo genes relacionados à síntese da AGP e estresse oxidativo (CAT) (dos SANTOS NUNES et al., 2017).

A hipermetilação do gene, em foco, está relacionada a um maior nível de CT e LDL-C em indivíduos diabéticos (SANTANA BEZERRA et al., 2019), acometidos com retinopatia diabética, e pacientes com doença renal terminal (dos SANTOS NUNES et al., 2017). Esse perfil foi associado também à pacientes que sofreram acidente vascular cerebral isquêmico (WEI et al., 2015), e pré-eclâmpsia (GE et al., 2015). Nesse sentido, foi observada também em progenitores de pessoas com síndrome de Down (COPPEDÈ et al., 2016), câncer (MANI et al., 2012; BOTEZATU et al., 2013) e, ainda em pacientes do sexo masculino, inférteis e com azoospermia não-obstrutiva, cujos resultados foram identificados em amostras testiculares, todavia, não foram encontradas no sangue periférico (KHAZAMIPOUR et al., 2009).

Nesse contexto, foi identificado que a expressão de *MTHFR* pode ser considerado um método alternativo a ser utilizado com o fim de prever diferenças individuais, no que se refere a desmetilação em resposta ao tabagismo, pois a disponibilidade reduzida de *MTHFR*, indexado via maior metilação ou menor expressão gênica, é passível de melhorar a desmetilação de cg05575921 em casos de tabagismo. Por outro lado, maior disponibilidade de *MTHFR*, seja indexada por menor metilação ou maior expressão gênica, pode atenuar o impacto do tabagismo na desmetilação de cg05575921 (BEACH et al., 2018).

Em um estudo piloto realizado com mulheres jovens saudáveis (n = 12) que consumiram, em um intervalo de duas semanas, vitamina C (1 g / dia) ou 240 mL de suco de mirtilo (polifenóis totais 300 mg e proantocianidina 76 mg / d) por 2 semanas, observou-se diminuição da hipermetilação o *MTHFR*. Este experimento sugeriu que o potencial efeito antioxidante, resultante do mecanismo de compostos presentes no mirtilo ou vitamina C, está associado com inibição da metilação do promotor do gene *MTHFR* (KIM et al., 2017).

2.5 ESTRESSE OXIDATIVO E INFLAMAÇÃO

Um desequilíbrio em favor dos radicais livres do oxigênio (ou nitrogênio e cloro), em relação aos níveis de moléculas do sistema de defesa antioxidante, resulta no chamado estresse oxidativo. Esta situação provoca consequências danosas que podem incluir, desde danos e mutações ao DNA até morte celular, induzida por necrose ou apoptose (FERRARI, 2010).

As Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) são prejudiciais aos lipídios, proteínas e DNA, por serem constituídas de elétrons não pareados. Uma vez formada, as EROs ativam o fator nuclear kappa β e provoca ativação transcricional em mais de 100 genes envolvidos no sistema imunológico e resposta inflamatória; a exemplo do factor de necrose tumoral- α (TNF- α), da interleucina-1 e da molécula de adesão intercelular-1 (YANG et al., 2014).

Em distúrbios metabólicos como a hipercolesterolemia, aumento nas quantidades de LDL nativo (que realiza função de transporte), doença vascular e inflamação, podem ocorrer alterações na geração de EROs, perturbação no endotélio, alteração no metabolismo oxidativo e desacoplamento da L-arginina; onde ocorre o aumento na liberação de Oxido Nítrico e a geração de EROs de oxigênio, incluindo à disfunção endotelial e a aterogênese (HAMULKA et al. 2018).

A aterosclerose, por sua vez, está diretamente relacionada ao estresse oxidativo; isto porque entre seus principais determinantes estão a hiperlipidemia e a hiperglicemia. Nesse estado, ocorrem modificações na LDL-C, as quais favorecem sua captação pelos

receptores *scavengers* de macrófagos sub-endoteliais. Essas modificações na LDL-C estão entre os eventos mais precoces que ocorrem durante o processo de formação da placa aterosclerótica (SIQUEIRA; ABDALLA; FERREIRA, 2006).

No que diz respeito ao MDA, este é o produto final da decomposição oxidativa do radical originado de ácidos graxos poli-insaturados. Portanto, é frequentemente utilizado como um biomarcador de estresse oxidativo. Dados clínicos indicam que o tipo MDA epitopos é proeminente e prevalente e, por isso, importantes na DCV (YANG et al., 2014). Assim, esses antígenos são candidatos principais para o uso na caracterização de respostas imunes, relevantes para a aterosclerose (TSIMIKAS et al., 2011).

No ensaio clínico *Veterans Affairs Diabetes Trial*, realizado com o objetivo de investigar a associação entre MDA e diabetes mellitus, constatou-se que os níveis de MDA e LDL-C, em complexos imunes circulantes, podem prever a ocorrência de infarto do miocárdio e eventos cardiovasculares agudos em pacientes com DM2 (LOPES-VIRELLA et al., 2012). Contudo, o mecanismo preciso pelo qual o MDA pode estar causando essa citotoxicidade endotelial não é conhecido (YANG et al., 2014).

No estudo de Bakhtiari et al. (2017) foi observado que os componentes individuais da SM estão associados a um aumento de MDA; além disso, outras patologias como Diabetes (GANJIFROCKWALA; JOSEPH; GEORGE, 2017; ZHANG et al., 2018), Hiperlipdemia (GARG et al., 2018), Pré-Eclampsia (LI et al., 2018), Doença Hepática (WANG et al., 2018; WU et al., 2018), também foram relacionadas ao referido aumento do produto.

Neste cenário, a CAT do plasma é também um importante biomarcador do estresse oxidativo, pois define o efeito sinérgico entre os vários compostos antioxidantes da amostra (CREWS et al., 2001). Diante disso, em estudos de intervenção tem sido observado a existência de relação entre o consumo de alimentos e os valores de LDL-C, MDA e CAT, entre outras variáveis. No estudo de Chiu et al. (2017) com indivíduos que consumiram no mínimo 50 mL de bebida de ameixa seca [*Prunus domestica* Linn (Rosaceae)], durante quatro semanas, foi observado redução significativa nos níveis de CT e LDL-C, e elevação concomitante nos valores da CAT.

Adicionalmente, no ensaio clínico randomizado duplo-cego controlado, realizado com 40 pacientes, acometidos de periodontite crônica, que consumiram uma cápsula de extrato metanólico de folhas de chicória de 1 grama, duas vezes ao dia por 8 semanas, demonstrou-se que os valores da CAT e da HDL-C aumentaram; em contrapartida, os valores médios de MDA, TG, LDL-C e CT diminuíram significativamente, no grupo de intervenção, em comparação com a linha de base e o grupo controle pós-intervenção (BABAEI et al., 2018).

Em concordância com os referidos resultados, em um estudo randomizado controlado, realizado durante 8 semanas, em 25 indivíduos normocolesterolêmicos (CT: <200 mg / dL) e 27 hipercolesterolêmicos leves (TC: 200-240 mg / dL), que consumiram 6 g / dia de café verde solúvel / torrado, foi identificado que, após a intervenção, houve reduções significativas nos níveis de CT, LDL-C, VLDL-C e TG. Além disso, foi observado que, de acordo com o aumento nos valores da Capacidade de Absorção dos Radicais Oxigenados (ORAC) e Potencial Antioxidante Redutor Férrico (FRAP), a CAT do plasma melhorou, todavia houve diminuição dos níveis de MDA sem, no entanto, apresentar diferenças entre grupos (MARTÍNEZ-LÓPEZ et al., 2018).

Quanto a PCR, proteína de fase aguda que é produzida e secretada principalmente pelo fígado (TANG et al., 2017), esta foi estabelecida como um biomarcador de inflamação, desde a década de 1930 (ROHNER et al., 2017). Evidências crescentes demonstram que a PCR não é apenas um biomarcador da inflamação, mas também um importante fator de risco associado a doenças relacionadas ao envelhecimento, inclusive a DCV (MAKITA; NAKAMURA; HIRAMORI, 2005), a hipertensão (HOSFORD-DONOVAN et al., 2016), a aterosclerose (SILVA; PAIS DE LACERDA, 2012), a diabetes mellitus (de REKENEIRE et al., 2006), a doença renal (PANICKAR; JEWELL, 2015) e o declínio cognitivo (TEGELER et al., 2016).

Nesse contexto, o controle dos níveis de LDL-C e PCR são eficazes na prevenção do Acidente Vascular Cerebral (AVC) recorrente e do ataque isquêmico transitório (AIT). No estudo de Kitagawa et al. (2018), indivíduos com LDL-C, em tratamento < 120 mg / dL, apresentaram redução de 29% no AVC recorrente e AIT, ao contrário daqueles com LDL-C $\geq$ 120 mg / dL. Do mesmo modo, pacientes com PCR < 1 mg / L tiveram redução de 32%, em comparação com pacientes com PCR $\geq$ 1 mg / L. Nesses casos, embora os níveis de LDL-C e PCR não estivessem correlacionados em pacientes individuais, aqueles que atingiram LDL-C < 120 mg / dL e PCR < 1 mg / L, apresentaram 51% de redução, em comparação com pacientes com LDL-C $\geq$ 120 mg / dL e PCR $\geq$ 1 mg / L.

Em indivíduos com perda de peso avaliada 13 meses, após intervenção cirúrgica de banda gástrica ajustável por laparoscopia, observou-se que os valores de LDL-C foram correlacionados, de forma significativa e positiva, com valores de PCR ($r = 0,448$, $P = 0,047$). Esta situação demonstrou a relação entre inflamação e dislipidemia aterogênica; cujo o estado inflamatório diminuiu com a perda de peso para cerca da metade dos valores iniciais; entretanto a inflamação ainda persistiu, com altos níveis de PCR, quando comparado ao controle, demonstrando, segundo o autor, a adiposidade que subsistiu (COIMBRA et al., 2019).

Em outra perspectiva, foi observado em estudo com humanos, que a PCR plasmática não pode ser predita a partir do CT ou LDL-C (BASSUK, RIFAI, RIDKER, 2004). Desse modo, constatou-se que a redução da PCR plasmática, por meio da inclusão de estatinas na hipercolesterolemia, em um grande ensaio clínico, não possuiu dependência quanto à redução da LDL-C plasmática (RIDKER et al., 2002). Resultado similar foi observado, no estudo desenvolvido por Sakata et al. (2018), em pacientes tratados com terapia combinada de hipolipemiantes e anti-hipertensivos, os quais apresentaram regressão da placa coronariana; evento associado ao nível basal da PCR Ultrassensível (PCR-us), cujos valores não foram correlacionados com alterações na LDL-C ou HAS e diastólica.

No estudo de Faraj et al. (2006), sobre a temática em questão, foi avaliada a associação entre marcadores inflamatórios no plasma (dentre eles a PCR-us e AGP), a vários fatores de risco tradicionais, em 77 mulheres não diabéticas pós-menopáusicas com sobrepeso ou obesas. Foi identificado que os marcadores inflamatórios correlacionaram-se positivamente com adiposidade, PA, teste de tolerância à glicose, resistência à insulina, TG, CT / HDL, ApoB, ApoB: razão apolipoproteína A1 (ApoA1) e fatores de risco de Framingham relativos à doença coronariana; entretanto, não se correlacionou com a ApoA1, CT, LDL e HDL.

Ainda em relação as proteínas de fase aguda, a AGP também chamada de Orosomucóide, foi descrita e classificada, pela primeira vez, em 1950. Representa aproximadamente 1% de todas as proteínas plasmáticas, sendo secretada principalmente pelo fígado (ALFADDA et al., 2012). Possui efeito anti-inflamatório, imunomodulador e angiogênico (ENGSTRÖM et al., 2003; PEARSON et al., 2003; LIBBY, RIDKER, 2004) e influencia, de forma significativa e independente, o nível de agregação de hemácias (WENG et al., 1998), atuando como fatores importantes para a patogênese da DCV.

Nesse contexto, a AGP funciona como imunomodulador, pois possui a função de inibir a proliferação de linfócitos, induzidos por mitógenos e a quimiotaxia; a geração de superóxido e a agregação de neutrófilos, através de mecanismos desconhecidos (HOCHEPIED et al., 2003). Nesse sentido, foi observado que a injeção de AGP exógena mostrou proteger consistentemente camundongos, utilizados em experimentos, da letalidade induzida por TNF- α (LIBERT, 1994).

Em um outro estudo, Lee et al. (2010) analisaram o tecido adiposo de camundongos obesos, e observaram que a expressão de AGP, induzida em resposta a sinais metabólicos e inflamatórios, atua protegendo-os da inflamação grave. Em humanos, o estudo de Faraj et al. (2006) com 56 mulheres pós-menopáusicas ($58,1 \pm 4,9$ anos), apresentando sobrepeso e obesidade, tratou de realizar intervenção com dieta hipocalórica. Como resultado, identificou-se que, após intervenção em vários parâmetros, houve redução significativa no peso total,

subcutâneo e abdominal; valores de PCR-us e AGP; todavia, houve aumento na LDL-C, sobretudo na relação (LDL-C / apoB).

Em contrapartida, estudo produzido por Oliveira et al. (2015) em indivíduos que passaram por intervenção cirúrgica de Bypass Gástrico em Y-de-Roux, foi constatado diminuição das concentrações plasmáticas de PCR e da AGP; diferença significativa na perda de peso e IMC; com melhora nos valores do perfil lipídico (LDL-C, CT, TG, e HDL), em todos os momentos do estudo. Resultado semelhante foi identificado no estudo de Kayser et al. (2017), com melhora metabólica e alterações lipídicas específicas, associadas à diminuição do peso corporal, CT, LDL-C, AGP.

Estudo de Fandiño-Vaquero et al. (2014) sobre a temática em questão, apontou que os níveis diferenciais de secreção de AGP, apresentados pelo tecido adiposo epicárdico em pacientes com DMT2 ou DAC, podem conduzir o conhecimento do processo aterosclerótico em pacientes com distúrbios da DCV.

Neste cenário, também foi demonstrado que a HHcy promoveu predileção para a promoção da adesão de plaquetas ao endotélio celular; por isso, tem sido associada a níveis mais elevados de fatores pró-trombóticos, envolvidos na formação de trombos (ZHANG et al., 2014). Além disso, a rigidez arterial aumentada pode estar ligada a HHcy e, além disso, ser atribuída à aterogênese relacionada à LDL-C, como partículas pequenas de LDL-C e sua modificação oxidativa (ZHANG et al., 2014).

Hcy é considerado um aminoácido que contém enxofre derivado da metionina, resultante do processo de desmetilação provocada por dois compostos intermediários, SAM e SAH (FINKELSTEIN, 1998). Com a transferência de um grupo metil, SAM é convertido em SAH. Essa relação SAM / SAH pode servir como um indicador para a capacidade de metilação intracelular (HOFFMAN, et al., 1980). Nesse sentido, Castro (2004) descreveu que a HHcy está associada a uma redução de 35% da metilação do DNA, possibilitando o aumento do risco de aterosclerose.

Em continuação, a HHcy também foi associada a distúrbios no transporte e metabolismo lipídico, a acumulação de lipídios hepáticos, a diminuição do HDL-C no plasma e a concentrações de apolipoproteína A-I (LÉVESQUE et al., 2017). No estudo de El Mabchour, Agueh e Delisle (2010), a Hcy elevada nos homens esteve, positivamente e independentemente, associada à pressão arterial diastólica, LDL-C e CT; todavia, nas mulheres foi associada com a ingestão inadequada de vitamina B12 em modelos de regressão linear.

Resultados do estudo promovido por Anniwaer et al. (2018) demonstraram que os níveis plasmáticos de Hhcy originou um FR independente para infarto cerebral. Em contrapartida,

observou-se que taxas de recorrência no grupo Hhcy excedeu as do grupo de controle, ao longo do seguimento de três anos; desse modo, os níveis de TG e LDL-C no grupo Hhcy foram significativamente maiores que no grupo controle. Contudo, o estudo de Momin et al. (2017), realizado com 4.660 sujeitos chineses, pertencentes a uma coorte do distrito de Shijingshan em Pequim, a HHcy não foi associada com LDL-C, porém foi independentemente associada com hipertrigliceridemia e baixos níveis de HDL-C.

2.6 CONSUMO ALIMENTAR

2.6.1 Compostos Antioxidantes

A ingestão suficiente de alimentos como peixe já foi descrito como associado com menor risco de DCV, e as fibras solúveis estão envolvidas na redução do CT e LDL-C, no plasma (FALUDI et al., 2017). Assim sendo, análise de 10 estudos prospectivos (usando mais de 336.000 sujeitos) realizados nos Estados Unidos e na Europa, mostraram que um aumento do consumo de fibra, relativas à 10 g / dia, foi associado com a redução de 14% [Risco Relativo = 0,86] de todos os eventos coronarianos e, ainda, com a redução de 27% (Risco Relativo = 0,73) do risco de morte coronariana (ERKKILÄ et al., 2008).

Existem outros componentes de alimentos vegetais que possuem a capacidade de reduzir o risco cardiovascular, a exemplo de nutrientes antioxidantes, selênio e polifenóis. Nesse sentido, os antioxidantes dietéticos individuais se destacam, pois estão inversamente associados ao risco de desenvolvimento da aterosclerose (MAUGERI et al., 2019). A referida competência está relacionada a possibilidade de eliminar eficientemente as EROs, antes de iniciar o dano oxidativo de biomoléculas como enzimas, ácidos nucleicos, lipídios e lipoproteínas (KARAKILCIK et al., 2014).

Neste âmbito, o ácido ascórbico, conhecido como vitamina C, atua como um cofator para várias reações catalisadas por enzimas, incluindo a hidroxilação de prolina e lisina, processo essencial na facilitação da conversão do colesterol em ácidos biliares; possibilitando ainda a menor concentração de colesterol no sangue (CHAMBIAL et al., 2013). Outro possível mecanismo que envolve a ação da vitamina C, como antioxidante, é a inibição da oxidação da LDL-C, uma vez que, nessa situação, a vitamina C facilita sua ligação e sua captação pelos receptores de LDL-C nos hepatócitos (MCRAE, 2008).

Nesse contexto, foi identificado que o maior consumo de vitamina C está associado ao risco reduzido de DCV (WANG; CHUN; SONG, 2013). No estudo de Aptekmann e Cesar

(2013) constatou-se que consumidores de suco de laranja - produto rico em flavanonas e vitamina C - que ingeriram 480 ml/dia no decorrer do prazo, maior ou igual a 12 meses, apresentaram níveis séricos mais baixos de CT, LDL-C, apo B e relação LDL/HDL; além de melhora nos valores de folato na dieta, em relação aos não consumidores do produto.

Contrariamente, na revisão sistemática de ensaios clínicos randomizados, realizada por Ashor et al. (2016), a suplementação de vitamina C (mediana de 1000 mg / dia), absorvidas por adultos, no decorrer de ≥ 2 semanas, não alterou significativamente a concentração de lipídios no sangue. No entanto, análises de subgrupo mostraram que a suplementação de vitamina C reduziu, significativamente, os lipídios sanguíneos de indivíduos que apresentaram dislipidemia ou baixo *status* basal de vitamina C.

Outro fitoquímico visto como sendo de alto potencial benéfico a saúde é a vitamina E. Figurando como a principal vitamina lipossolúvel, presente no plasma e na partícula da LDL-C, ela pode se apresentar em quatro isoformas (alfa, beta, gama e delta), existente principalmente em dois subgrupos: Tocoferol e Tocotrienol (HONARBAKHSH; SCHACHER, 2009). O α -Tocoferol (α -TC) é a forma biologicamente mais ativa, predominante encontrada no sangue (AZZINI et al., 2011) e a mais estudada até o momento; é encontrada em óleos vegetais, azeitonas e nozes. Seu efeito anti-hipercolesterolêmico, antiobesidade, sua atividade antioxidante (WONG et al., 2017) e sua função de proteção da toxicidade de células- β , já foram evidenciados em pacientes com DMT2 (SUKSOMBOON; POOLSUP; SINPRASERT, 2011).

Nesse sentido, no estudo de coorte, realizado por Peddinti et al. (2017), com seguimento dos colaboradores na pesquisa durante 10 anos, foi considerado que a redução do α -tocoferol é um progressor da DMT2, cujo perfil metabólico pode ser constatado anos antes do desenvolvimento dessa patologia.

Stampfer, em 1993, observou que pessoas que consomem vitamina E apresentam menos chance de adquirir DCV; desse modo, foi sugerido que o papel benéfico da vitamina E, na dislipidemia e no tônus vascular, está relacionado à ativação do fator nuclear kappa B (NF-kB), cuja função é promover a inibição da oxidação da LDL-C e da apoptose endotelial vascular; exercendo, desse modo, uma ação contra a vasodilatação prejudicada (KUWABARA et al., 2014).

Também já foi descrito que o consumo desta vitamina aumentou a atividade de Arilesterase, ao diminuir a metilação do gene PON1 (paraoxonase-1) (de la IGLESIA et al., 2013). Esta atividade está ligada ao gene da PON1 e é conhecida por proteger as lipoproteínas da oxidação e fornecer defesa contra a SM e DCV (KIM et al., 2013; KUMAR; RIZVI, 2014).

No estudo de Alcalá et al. (2015), o uso da suplementação de α -TF na quantidade de 150 mg /kg, duas vezes por semana, em ratos obesos alimentados com dieta hiperlipídica, reduziu o estresse oxidativo e a inflamação, melhorando a sensibilidade à insulina e à hipertrigliceridemia. O consumo de α -TF também demonstrou reduzir a peroxidação lipídica e regular negativamente TNF- α e PCR, sugerindo um papel potencial na melhoria do estado redox e na resposta inflamatória em pacientes com SM (DEVARAJ et al., 2008). Além disso, a vitamina E medeia a redução da expressão de Interleucina 6, por nível de citocina pró-inflamatória, em pacientes com SM, exercendo um efeito benéfico na inflamação crônica e suas complicações relacionadas (WONG et al., 2017).

De forma suplementar, o estudo de Rashidi et al. (2017) apontou que a vitamina E apresentou efeitos anti-aterogênicos e previniu a aterosclerose. No entanto, foi observado, em uma meta-análise, que o consumo de vitamina E, suplementada em quantidades maiores que 400 U/dia, por pacientes adultos, acometidos por doenças crônicas, aumentou a mortalidade por todas as causas (MILLER et al., 2005).

No que se refere a vitamina A, sabe-se que este é um termo genérico utilizado para cobrir uma grande quantidade de compostos relacionados (THEODOSIOU; LAUDET; SCHUBERT, 2010). Esta vitamina e seus derivados, como α e β -caroteno, são necessários ao longo da vida e regulam diversos processos incluindo reprodução, embriogênese, visão, crescimento, diferenciação celular e proliferação, manutenção da integridade celular epitelial e função imunológica (DUESTER, 2008). Além disso, o β e α -caroteno protege contra fatores genotóxicos ambientais que causam a produção de EROs (BRAICU et al., 2017).

O β -caroteno figura como a principal fonte de vitamina A, na dieta humana; quando ingerido, é envolvido em lipoproteínas, predominantemente na LDL-C, e transportado para diferentes locais dentro do corpo; inclusive para o fígado e tecidos em desenvolvimento. No fígado, pode ser armazenado ou metabolizado em retinóides (vitamina A e seus derivados) (SHETE et al., 2016).

O ácido retinóico, forma conhecida por afetar o fenótipo do gene, é um agente potente, capaz de induzir alterações e modificações epigenéticas, capazes de produzir vários efeitos sobre o fenótipo; dentre eles, influenciar a metilação do DNA, de forma global e genética (THEODOSIOU; LAUDET; SCHUBERT, 2010). A vitamina A, "In vitro", pode induzir a diferenciação de células-tronco embrionárias humanas, em tipos de células específicas (GUDAS; WAGNER, 2011). Um exemplo desse processo ocorre com o gene *THY1*, o qual realiza um papel fundamental na manutenção do estado indiferenciado das células estaminais

embrionárias. Para tanto, ele é hipermetilado e baixo regulado, em resposta ao tratamento com ácido retinóico (BAR-EL DADON; REIFEN, 2017).

Estudos em animais e humanos têm demonstrado o efeito da ingestão de alimentos ricos em vitamina A no perfil lipídico. No estudo de Aquino et al. (2015), ratos saudáveis, alimentados com dieta acrescida de óleo de buriti refinado - fonte importante das vitaminas antioxidantes A e E - apresentaram redução do CT (até 60,27%), LDL (64,75%), TG (55,47%), em relação aos alimentados com dieta adicionada de óleo cru (soja). Segundo o autor, esse efeito foi atribuído à maiores quantidades de retinol sérico e hepático e tocoferol; no caso, duas a três vezes superiores nos grupos, que receberam o óleo de buriti bruto e refinado por 28 dias, em comparação ao grupo controle.

Em humanos, no estudo de Petrogianni et al. (2014), no qual foram utilizados a fortificação extra de leite com fitoesterol e com vitamina A, foi considerado que houve redução nos níveis de CT, LDL-C e apo-B e, ao mesmo tempo, no nível de betacaroteno plasmático; situação que geralmente ocorre após ingestão de esteróis vegetais ou de estanois. Adicionalmente, o uso da astaxantina, um carotenóide derivado de animais marinhos, promoveu a redução da peroxidação da LDL-C; além da melhora dos perfis lipídicos no sangue e da capacidade de fluxo sanguíneo (EGGERSDORFER; WYSS, 2018).

O folato (vitamina B9) e a cobalamina (vitamina B12) são coenzimas importantes no metabolismo da Hcy. Constatou-se que existe uma correlação negativa entre a ingestão de folato e a concentração de Hcy (LEE; HONG; SHIN, 2018). Nessa circunstância, a vitamina B9, além de ser antioxidante, é considerada essencial em muitas funções fisiológicas, tais como: processos de proliferação e diferenciação celular; replicação de DNA; angiogênese e reações de metilação, através do metabolismo de um carbono. A forma ativa do folato é tetrahydrofolato, nessa forma colabora com a produção de purinas, pirimidinas e também na remetilação de Hcy em metionina (GLIER; GREEN; DEVLIN, 2014).

A deficiência da vitamina B12 mantém o folato na forma de 5-metiltetrahydrofolato, situação que o impede de participar de outras reações metabólicas (GLIER; GREEN; DEVLIN, 2014). Além do mais, um consumo alimentar deficiente em doadores de grupos metil e cofatores, do ciclo da metionina-homocisteína, reduzem a metilação e a regulação da expressão de genes envolvidos na absorção de AGL e na síntese dos TG, promovendo, desse modo, doença hepática gordurosa e, presumivelmente, DCV (POGRIBNY; BELAND, 2009).

Estudiosos demonstraram que níveis de folato e de vitamina B12 reduzidos conduzem a um aumento da Hcy e estresse oxidativo (MEHENDALE et al., 2008; KULKARNI et al., 2011). No estudo de Kemse, Kale e Joshi (2014) foi observado que a suplementação combinada

de micronutrientes, a exemplo do folato e da vitamina B12, em modelo de rato hipertenso, reduziu a PA, a inflamação e o estresse oxidativo. Em outro estudo realizado em camundongos, o ácido fólico, a vitamina B12 e a vitamina E desempenharam um papel fundamental na antagonização do estresse oxidativo, funcionando como um eliminador direto de radicais livres tóxicos, indução de enzimas antioxidantes, aumento da resposta inflamatória / imune, modulação dos sistemas de reparo do DNA, e das vias de transdução de sinal (REMELY et al., 2017).

No que diz respeito a vitamina B12, Koufakis et al. (2017) avaliaram o efeito geral do jejum religioso – restrição à alimentos de origem animal, produtos lácteos e ovos e, consumo de peixe, frutos do mar e azeite - no perfil lipídico. Observaram que houve uma redução na ingestão dietética de vitamina D e B12 e de minerais como o cálcio; entretanto, houve melhora do perfil lipídico, apontando redução do CT e nos níveis de LDL-C.

Outro componente que pode contribuir para diminuir o risco cardiovascular e reduzir a peroxidação lipídica - inibindo a inflamação e melhorando o perfil lipídico do sangue -, é o aumento da ingestão de selênio (Se) (RAVN-HAREN et al., 2008). A diminuição da oxidação da LDL-C no plasma, em sujeitos sob estresse oxidativo (HUSSEIN; ROSENBLAT; REFAEL, 1997), por meio da ingestão do suplemento Se (200 mg / d por 3 meses) já foi relatado. Uma explicação para esse efeito, está no fato do Se ativar o sistema da glutathione reduzida e diminuir a oxidação lipídica, possivelmente reduzindo o risco de DCV (RAVN-HAREN et al., 2008).

No entanto, no estudo SU.VI.MAX onde os sujeitos foram suplementados com baixas doses de antioxidantes, incluindo Se (100 mg/dia, por 7,5 anos), observou-se que não houve melhora no perfil lipídico. Ao contrário, os resultados sugerem uma prevalência de hipertrigliceridemia, em homens suplementados, e de hiperlipidemia em mulheres suplementadas (HERCBERG et al., 2005).

2.6.2 Consumo de Gorduras

Atualmente, níveis lipídicos elevados, são comuns na população dependente de fast food, devido a adoção de hábitos alimentares pouco saudáveis, os quais compreendem alta ingestão de alimentos gordurosos e de baixo teor de fibra na dieta (GARG et al., 2018). Nesse sentido, foi estabelecido que a redução dos níveis de lipídios aterogênicos, dentro da margem aceitável, diminuem a mortalidade e morbidade cardiovascular (MUNSHI; JOSHI; RANE, 2014).

Nessa perspectiva, o consumo da dieta vegetariana, no estudo de Jin et al. (2018), foi associado com menor IMC, gordura visceral, CT e LDL-C, glicose em jejum, resistência à insulina, chance reduzida de acúmulo de gordura no fígado e calcificação da artéria coronária, independente das características sociodemográficas e qualidade da dieta; indicando, portanto, efeito protetor sobre a saúde. Em contrapartida, a ingestão dietética rica em gorduras, a longo prazo, pode levar a distúrbios na síntese e secreção de TG e CT. Este desequilíbrio no metabolismo lipídico resulta em aumento do TG, CT e LDL-C, promovendo o risco de doença vascular (LAMANTIA; SNIDERMAN; FARAJ, 2016; WU et al., 2018).

A anormal espessura da camada íntima-média de carótidas foi encontrada em pacientes com transplante hepático, que se apresentava, ao mesmo tempo, com sobrepeso e dinapemia. Estes foram associados a níveis mais elevados de LDL-C, PCR e maior consumo de ácidos graxos saturados (AGS) e de ácidos graxos trans (AGT) (ALVES et al., 2018).

Nesse contexto, o principal mecanismo subjacente, relacionado ao aumento do risco de DCV do consumo de AGT, é o aumento da LDL-C e lipoproteína (a), diminuição no HDL-C, inflamação aumentada e efeitos adversos na função vascular (NESTEL, 2014). Estudo prospectivo como o de Mozaffarian; Aro e Willett (2009) sugerem uma tendência quase linear na relação entre o consumo de AGT e a concentração da LDL-C. Nesse sentido, o limite inferior a 1% ingestão de gordura proveniente de AGT foi estabelecido para prevenção da DCV (ALLISON et al., 1999).

Quanto ao consumo de ácidos graxos saturados, há evidências consistentes que o seu consumo na dieta aumenta as concentrações de LDL-C (LOVEGROVE; HOBBS, 2016). Além disso, estudos como o de Souza et al. (2015) e Kim; Keogh e Clifton (2018) confirmaram que baixos níveis de AGS e altos níveis de ácidos graxos insaturados, e compostos bioativos - polifenóis, carotenóides, fitoesteróis, fibras e minerais - podem contribuir para a proteção cardíaca, através da melhora do controle glicêmico, do perfil lipídico, do peso, da PA, da função endotelial, do estado oxidativo e antioxidante e, por fim, da ação anti-inflamatória.

Diante desse contexto, a Associação Americana do Coração recomenda a redução do consumo das quantidades de AGS na dieta, e estimula o aumento da ingestão de ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados (SACKS et al., 2017). No entanto, existem evidências que diferentes alimentos ricos em AGS demonstraram produzir efeitos diferenciais, no risco para DCV, em virtude da sua composição nutricional (LOVEGROVE, HOBBS, 2016). Um exemplo desta situação são estudos prospectivos e metanálises que visaram examinar a relação entre o consumo de leite e produtos lácteos e o risco de DCV. O consumo destes, desassociado da ingestão da manteiga, não está relacionado a efeitos prejudiciais na mortalidade por DCV ou

por biomarcadores de risco que incluem a LDL-C (LIVINGSTONE et al., 2013; BENATAR; SIDHU; STEWART, 2013; ENGEL; THOLSTRUP, 2015).

Sabendo-se disto, é importante destacar que nem todas as classes de AGS apresentam os mesmos efeitos nos lipídios sanguíneos. A ingestão alta na dieta de ácido láurico (C12: 0), mirístico (C14: 0) e palmítico (C16: 0) demonstraram elevar LDL-C e CT no soro; enquanto o ácido esteárico (C18: 0) tem impacto mínimo; devido, em parte, à sua absorção mais limitada (KRIS-ETHERTON et al., 2005).

Quanto às gorduras insaturadas, foi observado relação do seu consumo com a diminuição do risco de SM, obesidade, DMT2, HAS e DCV (LÓPEZ-MIRANDA et al., 2010; WIDMER et al., 2015). Desse modo, em meta-análise de ensaios clínicos randomizados, realizada recentemente, foi identificado que o consumo do óleo de canola - rico em gordura monoinsaturada - por mais de 30 dias, promoveu um efeito global significativo no TG e LDL-C, comparado ao óleo de girassol e gorduras saturadas (GHOBADI et al., 2019).

Em relação ao ácido graxo ômega-6, encontrado em óleos vegetais, foi demonstrado que o mesmo possui características passíveis de reduzir o risco de DAC, uma vez que apresenta efeitos benéficos no CT sérico, LDL-C e na sensibilidade à insulina (PATTERSON et al., 2012); por sua vez, em estudos realizados com o ômega-3 poliinsaturado, derivado de peixe, foi identificado que houve diminuição dos TG, e aumento do HDL-C. Isto porque ele está associado ao transporte de colesterol reverso mais eficiente e por promover um risco reduzido de DAC (ISO et al., 2006; WALL et al., 2010).

No estudo de Mortazavi et al. (2018) o uso da suplementação de ácidos graxos ômega-3 - 4 g (Ácido Eicosapentaenoico (EPA): 720 mg e Ácido Docosahexaenoico (DHA): 480 mg) por dois meses, em indivíduos do sexo masculino com DCV, diminuiu os níveis séricos de LDL-C e de concentrações de PCR-us. Nesse contexto, Wei; Jacobson (2011) hipotetizaram que o DHA leva a uma maior ativação da LpL; possibilitando, desse modo, o aumento da depuração de TG, através da conversão da VLDL-C em LDL-C.

No entanto, em estudos de revisão recente, foi observado que a suplementação com o ômega-3 de cadeia longa, aumentou os níveis de LDL-C; entretanto, esse aumento foi contatado principalmente nas partículas de grande fluutuabilidade, que são consideradas menos aterogénicas do que as partículas de LDL-C, pequenas e densas. A referida suplementação, pode, ainda, promover efeitos anti-inflamatórios, como a redução nas moléculas de adesão - molécula de adesão intercelular e molécula de adesão celular vascular 1-, e também de leucotrienos (THOTA et al., 2018).

Dentre os alimentos que possuem atributos composicionais, capazes de promover a manutenção de níveis saudáveis de lipídios no sangue, destacam-se as amêndoas e as nozes. As amêndoas quando expressas numa base de 100 g, contêm cerca de 45 a 54 g de gordura, apresentam quantidades relativas de ácidos graxos poli-insaturados, monoinsaturados e AGS de 9 a 15, 25 a 36 e 3 a 5 g, respectivamente (YADA; HUANG; LAPSLEY, 2013). Além disso, pode conter pequenas quantidades de esteróis, vitaminas e minerais. Contudo, na literatura consultada, resultados acerca do efeito da sua ingestão em alterações no perfil lipídico são inconclusos. Na Meta-análise baseada em cinco estudos controlados randomizados, observou-se que o consumo de amêndoas não afetou significativamente a LDL-C, HDL-C e TG ou a relação LDL/ HDL (PHUNG et al., 2009). Pelo contrário, na revisão sistemática realizada por Musa-Veloso et al. (2016) a ingestão de amêndoas foi associada à reduções significativas no CT, LDL-C e triacilgliceróis, todavia não apresentou efeito sobre o HDL-C.

Em relação ao consumo de nozes – produto composto de ácidos graxos monoinsaturados, ácidos graxos poli-insaturados, fibra, arginina e magnésio além de compostos bioativos - no estudo de revisão realizado pelos pesquisadores Kim; Keogh e Clifton, (2018), foi observado efeitos favoráveis sobre o CT (redução de 0,28 a 0,021 a mmol / L de 8 metanálises de intervenções), a LDL-C (redução de 0,26 a 0,017 a mmol / L de 8 meta-análises de intervenções) e a função endotelial (0,79 a 1,03% de aumento na dilatação, mediada por fluxo a partir de 4 metanálises de intervenções). Além desses efeitos, em uma meta-análise, contendo dose-resposta de 61 ensaios de intervenção controlados, Del Gobbo et al. (2015) apontaram efeitos favoráveis na apoB e nos triacilgliceróis. Os mais significativos foram observados com ingestão de 60 g / dia de nozes em indivíduos com DMT2.

Quanto ao consumo de colesterol dietético, estudos têm sido realizados com o objetivo de observar os efeitos do consumo de determinados alimentos nos valores séricos de colesterol. Na pesquisa, realizada por Pearce, Clifton e Noakes (2011), foi investigado o efeito de uma dieta hipoenergética, realizada com alto teor de colesterol, proveniente de duas fontes diferentes: um grupo consumia dois ovos/ dia, enquanto os outros participantes substituíram os ovos por 100 g de proteína animal magra. Após 12 semanas, a LDL-C e a Hcy permaneceram inalterados e houve aumento de folato, luteína e HDL-C de 1%, associado à reduções de 3% de DCV, no grupo que consumiu o ovo, de forma mais eficaz, do que uma dieta contendo fontes animais alternativas isoenergéticas. Segundo o autor, no contexto de uma dieta com alto teor de proteínas e pouca quantidade de AGS, dois ovos por dia não afetaram negativamente os perfis lipídicos no sangue em indivíduos com DMT2.

De forma suplementar, na intervenção realizada por Kishimoto et al. (2016), com catorze indivíduos saudáveis, do sexo masculino, que consumiram um ovo cozido no café da manhã, durante 4 semanas, foi observado que, no final da intervenção, os níveis de lipídios séricos dos indivíduos não foram alterados; apesar do aumento significativo na ingestão de colesterol dietético. Em contrapartida, os níveis de LDL-C modificada (MDA-LDL) e a suscetibilidade oxidativa da LDL-C foram significativamente reduzidos; além disso, os níveis séricos de ácido fólico aumentaram consideravelmente após a intervenção.

É importante destacar que estudiosos mostraram que dieta rica em colesterol, consumida por animais, promoveu disfunção hepática, remetilação da Hcy e aberrações em reações de metiltransferase (DAHLHOFF et al., 2013; PACANA et al., 2015). Nesse sentido, os resultados desses estudos sugerem a necessidade de uma dieta balanceada e diversificada em quantidades adequadas de nutrientes, pois como já foi descrito, a depender dos hábitos alimentares dos indivíduos, os constituintes dos alimentos podem prevenir ou predispor alterações nas concentrações de LDL-C.

Assim, tendo o entendimento que fatores como o consumo alimentar, estado inflamatório e de estresse oxidativo, e o perfil de metilação de genes envolvidos no metabolismo lipídico dentre outros fatores, podem influenciar e prever modificações nas concentrações de LDL-C, estudos nesse âmbito são de suma importância no entendimento da patogênese de doenças crônicas, como a DCV. Para tanto, resultados de estudos analisados não se aplicam ao do presente estudo, inédito, quanto a interferência desses parâmetros, acima citados, nas concentrações de LDL-C calculadas por diferentes estimativas.

3 ABORDAGEM METODOLÓGICA

3.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo transversal vinculado a uma pesquisa de base populacional intitulada “II Ciclo de Diagnóstico e Intervenção da Situação Alimentar, Nutricional e das Doenças não Transmissíveis mais Prevalentes da População do Município de João Pessoa/PB” (II DISANDNT/PB) (COSTA et al., 2014/2016), financiado pela FAPESQ/MS/CNPQ e aprovado através do edital 001/2013, cuja coleta foi realizada no período de maio de 2015 a maio de 2016, o qual gerou um banco de dados representativo da população de João Pessoa para todas as faixas etárias e níveis socioeconômicos.

3.2 QUESTÕES ÉTICAS

O protocolo de pesquisa ao qual está vinculado o presente estudo, foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), sob o protocolo nº 0559/2013, setor responsável por regular as normas éticas para pesquisa envolvendo seres humanos; constantes da Resolução 466, de 12 de dezembro de 2012, do Conselho Nacional da Saúde/Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (ANEXO A).

Para o presente estudo, após a identificação do domicílio das quadras sorteadas localizadas nas zonas leste e oeste do município de João Pessoa, os pesquisadores apresentaram-se aos moradores, informando o objetivo do estudo e solicitando a participação na pesquisa. Para tanto, foram respeitadas as diretrizes éticas que regem as pesquisas com seres humanos, sendo a validação da inclusão dos indivíduos, residentes nos domicílios selecionados para a pesquisa, formalizada mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pelos referidos colaboradores. (APÊNDICE A).

3.3 PROTOCOLO AMOSTRAL

Para realização desse estudo de base populacional, realizou-se o cálculo de uma amostragem representativa para o grupo etário de adultos, das zonas Leste e Oeste do município de João Pessoa, utilizando informações fornecidas pela prefeitura, como mapa do município, número de quadras por bairro (Figura 2) e dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010).

Após a estratificação, calculou-se o tamanho da amostra, com base no cálculo proposto por COCHRAN (1977), para amostras estratificadas, ou seja, o n de quadras representativas por zona utilizando a fórmula abaixo:

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

- H é o número de camadas que dividimos a amostra e h é um índice que se refere a um estrato concreto.
- $e = B/z$ é a margem de erro aceita, sendo B o erro máximo desejado.
- 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 tratamos da amostra estratificada ótima, cada W_h se calcula em função da dispersão dentro de cada camada.
- σ_h é o desvio padrão da variável-objeto em cada estrato h .

Após a obtenção do tamanho da amostra, foi calculado o peso de cada estrato, denotado pelo símbolo W_h , e distribuído a amostra proporcionalmente, conforme quadro 4, obtendo-se assim, 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):

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

Desse modo, pode-se calcular a amostra por zona (quadro 3), a partir da fórmula abaixo descrita:

$$nh = wh n$$

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

Desse modo, o total de bairros que foram visitados, correspondentes às zonas leste e oeste do município de João Pessoa foi de 24; totalizando 2961 quadras, com uma estimativa de visitas realizadas em 105 quadras (Quadro 3). Depois de 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, constando as quadras numeradas. Para o sorteio foi gerado

números aleatórios com distribuição uniforme, utilizando um gerador de números pseudoaleatórios, no *software* Core R Development Team (2006).

Quadro 2. Estratificação dos bairros por renda com desvio padrão

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

¹De acordo com o IBGE (2010). Fonte: II DISANDNT/JP (COSTA et al., 2014/2016). 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	0.0196	7
LESTE	402	5	14.7309	0.0445	14
LESTE	1083	9	83.1941	0.1200	38
OESTE	569	4	92.3594	0.0630	20
OESTE	577	3	145.5690	0.0639	20
OESTE	153	1	0.0000	0.01695	6

Fonte: II DISANDNT/JP, (COSTA et al., 2014/2016). Abreviações: Sh: desvio – padrão/ Wh: peso de cada estrato.

A quadra sorteada serviu de referência para a seleção dos domicílios a serem visitados na execução da pesquisa. 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), apresentando a significância adotada de 0,05. Observou-se também que alguns bairros estão juntos, pois a divisão tomou como referência a mesma 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 3 e 4

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 (COSTA et al., 2014/2016).

3.4 POPULAÇÃO E AMOSTRA

Visto que a população de adultos, nas zonas leste e oeste da cidade de João Pessoa é superior a 10.000 - conforme dados do Censo Demográfico do IBGE em 2010 - e a fração amostral é menor que 5%, não é necessário o fator de correção de população finita. Dessa forma, a definição da amostra mínima necessária para que os estimadores dos parâmetros populacionais tenha um nível de confiabilidade de 95% - equivalente a um valor crítico tabelado, $Z_{\alpha/2}$ de 1,96) foi realizada 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, resultando em um desvio igual ou inferior ao erro tolerado (E); o erro máximo (E) admitido é de 15% do valor médio da renda dos adultos das zonas leste e oeste obtidos pelo “Primeiro ciclo de diagnósticos e intervenção da situação alimentar, nutricional e das doenças não transmissíveis mais prevalentes da população do município de João Pessoa/PB - I DISANDNT/JP”(07/2008-01/2010); $\hat{\sigma}$ = desvio-padrão do valor da renda dos adultos das zonas leste e oeste da cidade obtido, no I DISANDNT/JP.

Considerando que a média da renda dos indivíduos adultos, moradores das zonas leste e oeste - obtidas no banco de dados do I DISANDNT/JP (07/2008-01/2010) - foi de R\$ 2.213,26; observou-se que o desvio padrão de R\$ 2.601,93, e margem de erro de R\$ 3320,00 na renda da amostra mínima de adultos pessoenses, situados nas zonas leste e oeste - estatisticamente representativa com o nível de confiança de 95% - foi de no mínimo 236 adultos.

Para o presente estudo, a amostra total foi composta por 266 indivíduos, sendo que, respeitando o protocolo metodológico do presente estudo, 30 indivíduos foram excluídos, restando um total de 236 indivíduos.

3.4.1 Critérios de inclusão

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

3.4.2 Critérios de exclusão

Indivíduos excluídos do banco original do II DISANDNT/PB:

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

Para o presente estudo, foram excluídos também:

- Indivíduos com ingestão de calorias menor que 700Kcal;
- Indivíduos com triglicerídeos acima de 400mg/dL;
- Indivíduos com suplementação de ômega-3.

Figura 3. Diagrama dos cálculos para definição da amostra da Zona leste do município de João Pessoa.

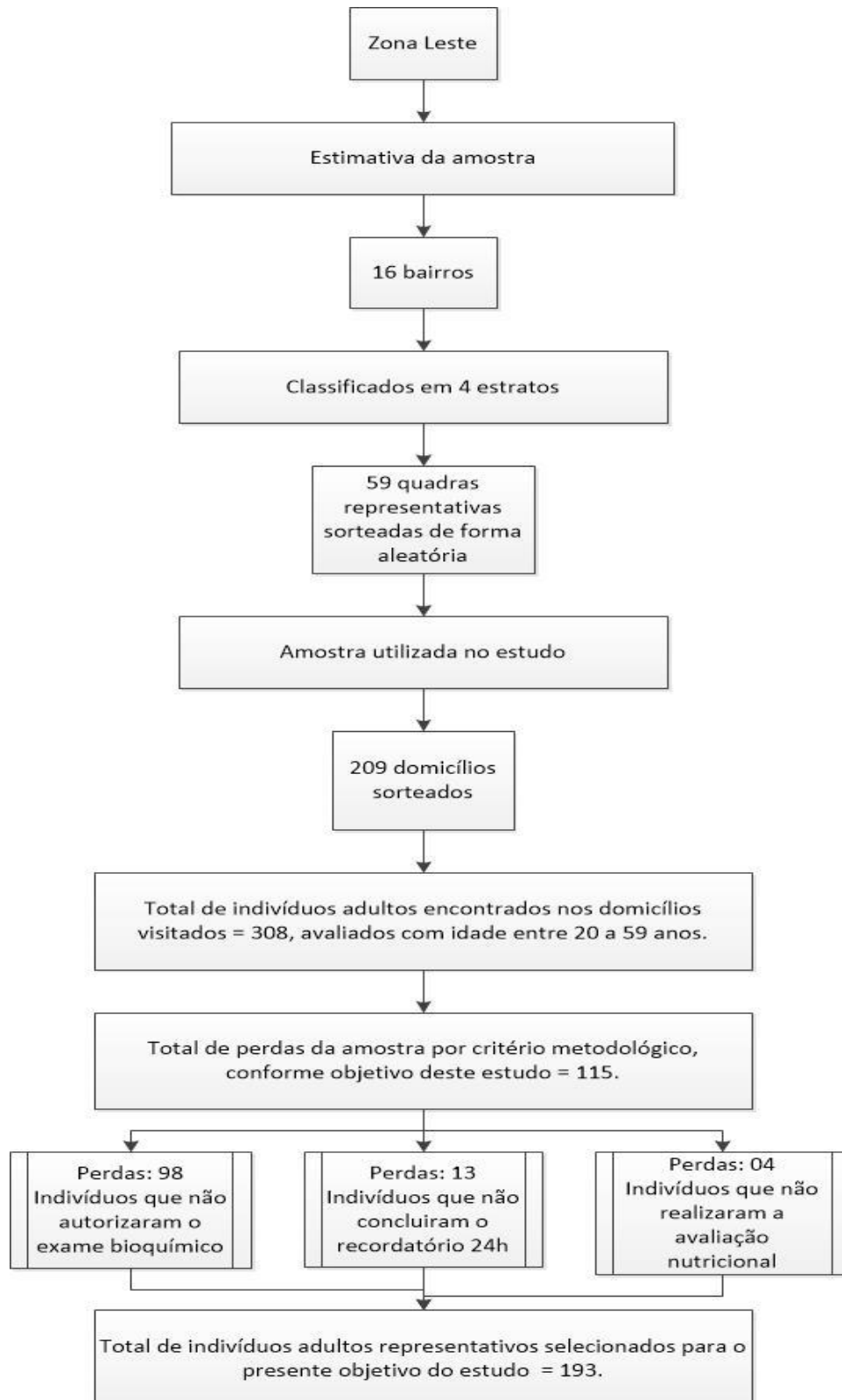
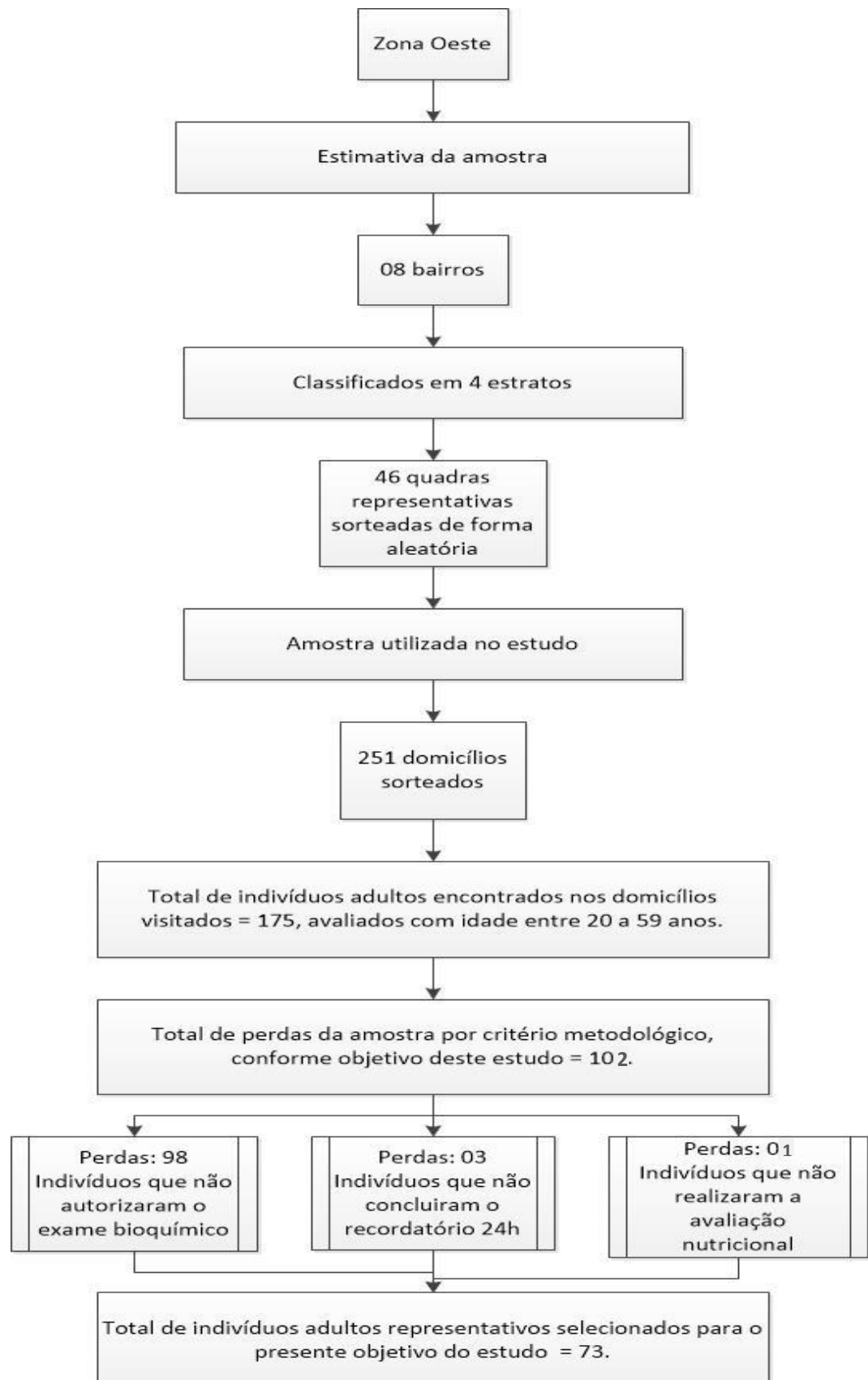


Figura 4. Diagrama dos cálculos para definição da amostra da Zona oeste do município de João Pessoa



3.5 COLETA DE DADOS

As visitas domiciliares e a aplicação dos questionários (ANEXO B) da pesquisa foram realizadas por equipes de pesquisadores, graduandos dos Cursos de Nutrição, mestrandos e doutorandos do Programa de Pós Graduação em Ciências da Nutrição (PPGCN) da UFPB. Ambos foram treinados antes do início da coleta de dados e também participaram da realização do estudo piloto, conforme o protocolo descrito na figura 5.

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

Em cada residência sorteada, todos os indivíduos adultos, na faixa etária entre 20 – 59 anos, foram convidados a participar da pesquisa, por meio de aplicação dos questionários de caracterização socioeconômica e demográfica (ANEXO C), caracterização epidemiológica (ANEXO D), avaliação do consumo alimentar (ANEXO E) e nutricional (ANEXO F), avaliação bioquímica e níveis de metilação.

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 recomenda os seguintes pontos de corte do IMC para classificar o estado de peso em adultos de 20 a 59 anos de idade: $<18,5 \text{ kg} / \text{m}^2$ (baixo peso); $18,5\text{-}24,9 \text{ kg} / \text{m}^2$ (peso normal); $25,0\text{-}29,9 \text{ kg} / \text{m}^2$ (excesso de peso); $30,0\text{-}39,9 \text{ kg} / \text{m}^2$ (obesidade); e $\geq 40 \text{ kg} / \text{m}^2$ (extremamente obesos) (WHO, 2000).

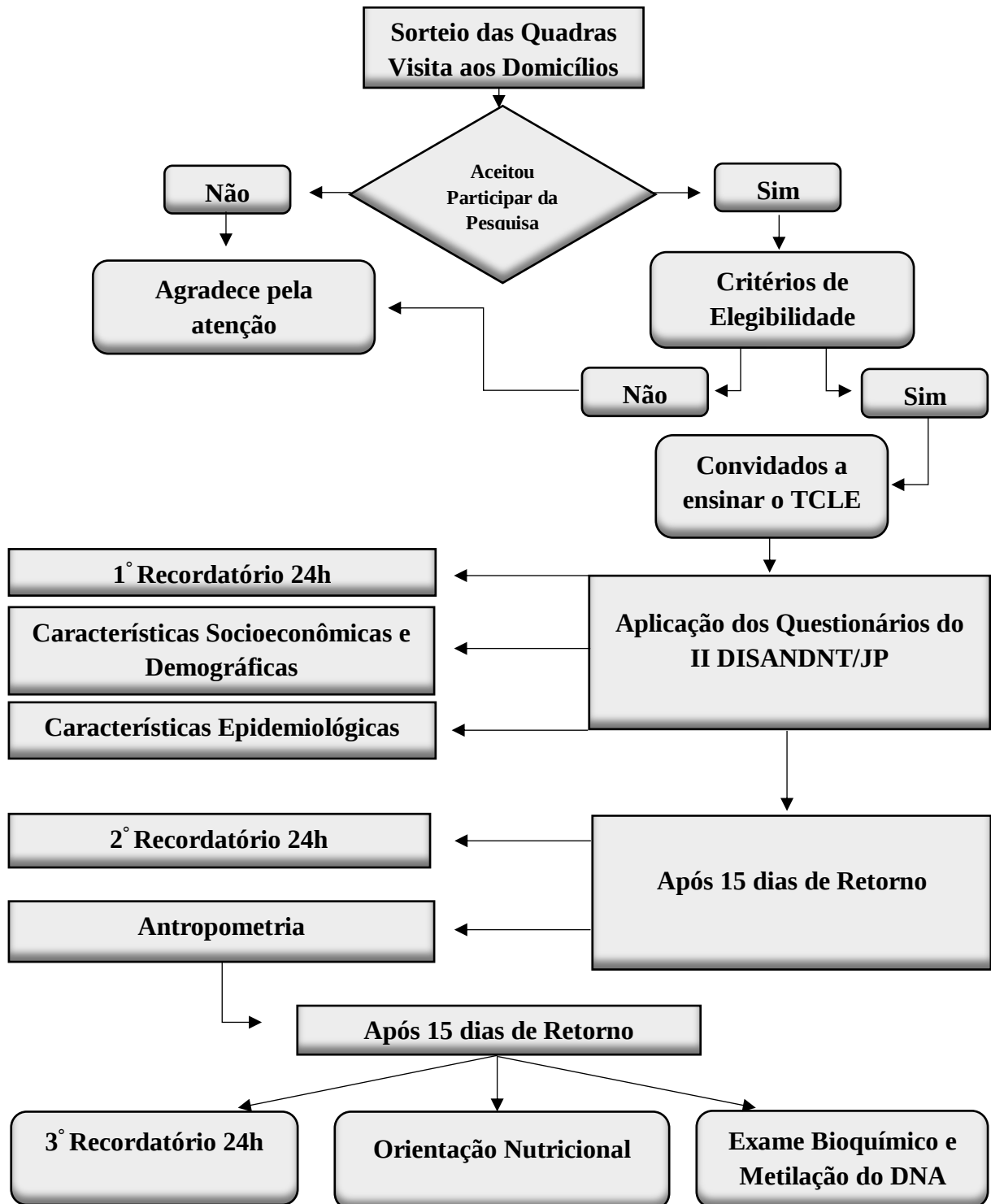
O indicador utilizado para determinar o estado de obesidade abdominal foi a CC, segundo a Associação Americana do Coração os pontos de corte para mulheres é de : $\geq 88 \text{ cm}$ e para homens: $\geq 102 \text{ cm}$ (GRUNDY et al., 2005).

3.7 AVALIAÇÃO DO CONSUMO ALIMENTAR

Um dos métodos de inquérito, utilizado para verificar o consumo alimentar, é o Recordatório 24 horas (R24h) (ANEXO D). Este método foi utilizado pela primeira vez por Wiehl, em 1960, e consiste em quantificar todo o consumo de alimentos nas 24 horas anteriores a entrevista ou durante o dia anterior (FERRO-LUZZI, 2002). Por ser de um método que

descreve uma grande variedade de alimentos, o R24h é utilizado quando se deseja comparar a média de ingestão de nutrientes de diferentes populações.

Figura 5. Fluxograma da coleta de dados



O R24 foi aplicado três vezes, no intervalo de quinze dias, contemplando um dia do final de semana. Para preenchimento do R24h, os indivíduos referiram dados que incluíam a hora, a identificação do alimento, bebidas consumidas, e as características detalhadas dos alimentos, tais como: o tipo e os ingredientes que compõem as preparações, além da marca, da forma de preparo e da identificação da quantidade consumida, considerando o tamanho da porção e as medidas caseiras.

Foi utilizado um álbum de desenhos de alimentos, contendo 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, dessa forma, as prováveis deficiências de memória dos indivíduos entrevistados (LIMA et al., 2008; ASCIUTTI et al., 2005).

Os alimentos do R24h, por sua vez, foram transcritos e padronizados em um documento auxiliar, onde todos os alimentos foram convertidos em gramas com auxílio do álbum de porções média, produzido em tamanho real, baseado no programa Dietsys para estudo de base populacional (ASCIUTTI et al., 2005). Quanto à preparações dos alimentos, estes foram desmembrados segundo seus ingredientes e quantidades. Os alimentos foram avaliados e convertidos em quantidades de calorias e de nutrientes, pelo software de Nutrição, Dietwin. Este software conta com aproximadamente 5230 alimentos e receitas cadastrados de acordo com a tabela TACO, 4ª versão, e a tabela DIETWIN, considerada uma compilação de várias tabelas, como IBGE, USDA, CENEXA, Alemã, Repertório Geral dos Alimentos e Fichas técnicas de receitas.

Para melhor entendimento acerca das relações entre as estimativas de LDL-C, com os níveis de metilação dos genes *MTHFR*, *ADRB3*, *LPL* e consumo alimentar, foram analisados alimentos contendo nutrientes relacionados ao metabolismo lipídico, a inflamação e ao estresse oxidativo, como colesterol, ômega 6, ômega 3, ácidos graxos poli-insaturado, monoinsaturado, saturados, trans, calorias, carboidratos, proteínas, lipídios; além de teores de vitaminas A, C, E, B12, betacaroteno, folato e selênio.

Para estimar o consumo habitual e corrigir a variância intrapessoal, vários métodos estatísticos estão disponíveis. Nesse estudo, foi utilizado, o Método de múltiplas fontes (*Multiple Source Method - MSM*), online, disponível no site (<https://msm.dife.de/tps/msm/>). O MSM é uma técnica estatística proposta pela European Prospective Investigation Into Câncer and Nutrition (EPIC) (MSM, 2012).

3.8 ESTIMATIVAS PARA O CÁLCULO DA LDL-C

O cálculo da LDL-C estimada pela Equação de Friedwald, foi realizado através da fórmula: (colesterol total) - (lipoproteína de alta densidade colesterol [HDL-C]) - (triglicerídeos / 5) em mg / dL (FRIEDEWALD; LEVY; FREDRICKSON, 1972). Quanto ao cálculo estimado pela Equação de Martin, este foi realizado através de um aplicativo para uso em smartphone²: LDL Cholesterol Calculator. (SATHIYAKUMAR et al., 2018).

A Equação de Martin integra um fator individualizado, dependendo dos valores lipídicos do indivíduo, o qual será utilizado no denominador em substituição ao valor 5 utilizado na fórmula de Friedwald, para explicar a heterogeneidade no triglicerídeo para a elevação da VLDL-C, onde o fator individualizado é escolhido entre 180 possíveis diferentes fatores de acordo com as concentrações de triglicerídeos e não-HDL-C do indivíduo.

3.9 AVALIAÇÃO DO RISCO CARDIOVASCULAR

Para a amostra total estimou-se a classificação do *score* de risco cardiovascular, utilizando o protocolo citado por Zaid e Hasnain (2018), que utilizou o *score* de Framingham com base nas diretrizes do ATP-III. O cálculo foi realizado através de uma planilha no Excel, adquirida no site do Estudo de Framingham, disponível na Web³, que objetiva estimar o risco do indivíduo sofrer uma doença arterial coronariana, nos próximos 10 anos, cuja avaliação desse *score* se baseia em três categorias (< 10% Baixo Risco, entre 10 – 20% Risco Moderado e > 20% Risco Alto).

Para a realização do cálculo do *score*, foram utilizadas informações obtidas através dos questionários de caracterização socioeconômica e demográfica (ANEXO B), de caracterização epidemiológica (ANEXO C), além de valores obtidos das análises bioquímicas realizadas na população do estudo. As variáveis utilizadas foram: sexo, idade, tabagismo, diabetes, diagnóstico de hipertensão, tratamento para hipertensão e valores de CT e HDL-C.

O *score* foi estimado com um limite referente aos valores de PA, pois no presente estudo o diagnóstico foi auto referido junto ao uso de medicação. Nesse sentido, para os não hipertensos, utilizou-se o valor de pressão sistólica normal (120 mmHg) e para os hipertensos,

² LDL Cholesterol Calculator. Disponível em: <https://www.hopkinsmedicine.org/apps/all-apps/ldlcholesterolcalculator>. Acesso em (2018);

³ Disponível em: <https://www.framinghamheartstudy.org/fhs-risk-functions/cardiovascular-disease-10-year-risk/>. Acesso em (2018).

o valor referente a hipertensão sistólica leve (140 mmHg) e moderada (160 mmHg) (MALACHIAS et al., 2016). É importante destacar que esse *score* foi calculado para auxiliar na caracterização da amostra, quanto ao risco cardiovascular; todavia, devido ao limite da ausência dos valores pressóricos, não foi incluído nos modelos de regressão.

3.10 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

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

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

3.10.1 Perfil Lipídico

Para a avaliação do perfil lipídico, foi utilizado os kits para a dosagem de Colesterol Total, da marca Labtest® do Brasil pelo método enzimático - Trinder, Colesterol HDL, da marca Labtest ®do Brasil pelo método de Precipitação, TG da marca Labtest® do Brasil pelo método enzimático –Trinder. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Estudos do Treinamento Físico aplicado ao desempenho e a saúde, do Departamento de Educação Física da UFPB.

3.10.2 Malondealdeído

Sobre a atividade oxidante, esta foi quantificada por meio da reação do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), utilizando-se os produtos de decomposição dos hidroperóxidos, conforme método descrito por Ohkawa, Ohishi e Yagi (1979). Para isso, 250 µl do plasma foi incubado em banho maria, a 37° C, por 60 minutos. Em seguida, a amostra foi precipitada com

ácido perclórico 35% e centrifugada a 14000 rpm por 20 minutos à 4°C. O sobrenadante foi transferido para novos microtubos, onde foi adicionado 400 µl de ácido tiobarbitúrico a 0,6% e incubado à 100° C por 60 minutos. Após resfriamento, o material foi lido em espectrofotômetro ultravioleta (Bioespectro, modelo SP 22, Brasil) a um comprimento de onda de 532 nm. Sendo estas análises também realizadas no Laboratório de Estudos do Treinamento Físico aplicado ao desempenho e a saúde, do Departamento de Educação Física da UFPB.

3.10.3 Capacidade de Antioxidante Total

A avaliação da capacidade antioxidante total foi feita por meio de DPPH (1,25 mg diluído em 100ml de etanol e mantido sob proteção de luz). Para análise, 100 ul de plasma foram adicionados à 3,9 ml de solução DPPH; agitado em vórtex, colocado em repouso por 30 minutos; em seguida, centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos, a 20° C. O sobrenadante foi usado para leitura por espectrofotômetro em 515 nm de comprimento de onda, usando água destilada como branco. O resultado é expresso em percentual de atividade antioxidante (LIMA; SAMPAIO, 2007). As referidas análises foram também realizadas no Laboratório de Estudos do Treinamento Físico aplicado ao desempenho e a saúde, do Departamento de Educação Física da UFPB.

3.10.4 Alfa-1-glicoproteína Ácida e Proteína C-Reativa

As concentrações plasmáticas de PCR-us e AGP foram quantificadas por imunoturbidimetria, em amostras de soro. Tais concentrações foram determinadas por meio de kits comerciais específicos (Labtest, Minas, Brasil) conforme instruções do fabricante. Para calibração da PCR-us foi utilizado o calibrador Calibra Plus PCR-us (Labtest: Ref-345) e para AGP utilizou-se o Calibra Plus Proteína (Labtest: Ref-346). Ambos foram submetidos à absorbância, obtida no analisador automático Labmax 240 premium (Labtest, Minas Gerais, Brasil) no comprimento de onda 540 nm e 340nm, respectivamente (LIMA; SAMPAIO, 2007). Ambas as análises foram realizadas no Laboratório Clínico Roseane Dore.

3.10.5 Homocisteína

A dosagem da concentração de Hcy, também foi realizada no Laboratório Clínico Roseane Dore, a partir do método de Kuo, Cale e Mc Dowell (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 Hcy, 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. Em seguida, o sobrenadante é transferido para outro recipiente, com o fim de reagir com o agente 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulfonato, específico para marcação fluorescente do átomo de enxofre. Após incubação, o produto é injetado em um HPLC, utilizando coluna de fase reversa, ocorrendo a detecção em cerca de 7 minutos. A detecção da fluorescência dos compostos separados é feita com detector ajustado para excitação 385 nm e emissão 515 nm (KUO; CALE; Mc DOWELL, 1997).

3.10.6 Ácido Fólico e Cobalamina

A análise do ácido fólico foi realizada pelo método de Quimioluminescência, considerando o valor de referência > que 3.10 ng/mL e sensibilidade analítica de 0.5 ng/mL. Já os níveis séricos de vitamina B12 foram avaliados através de imunoensaio de electroquimioluminescência, o qual adotou o valor de referência entre 180,0 pg/mL e 914,0 pg/mL (LIMA et al., 2017). Ambas as análises foram realizadas no Laboratório Clínico Roseane Dore.

3.11 ANÁLISE DO NÍVEL DE METILAÇÃO

Para a análise do nível de metilação foi escolhido o sangue, pois é um tecido metabolicamente ativo, com um papel importante nas consequências inflamatórias e vasculares e é amplamente utilizado para fins de diagnóstico clínico (WAHL et al., 2017).

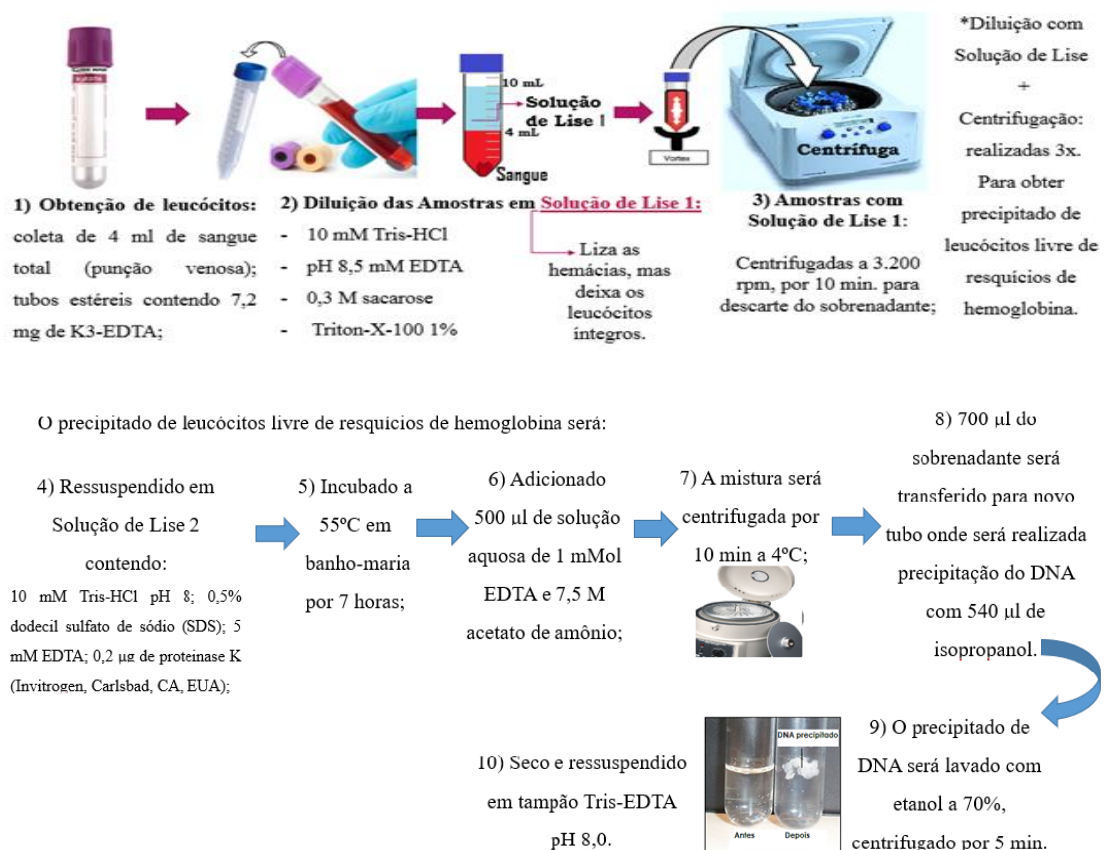
3.11.1 Obtenção da amostra e Extração de DNA a partir do sangue

Com o auxílio de um *Vacutainer*® com EDTA, 5mL de sangue total foi obtido por indivíduo. As amostras foram diluídas em uma primeira solução de lise, contendo 10 mM Tris-HCl pH 8,5 mM EDTA, 0,3 M sacarose, Triton-X-100 a 1% afim de lisar as hemácias deixando

no entanto o conteúdo dos leucócitos íntegros. Em seguida, foram centrifugadas à 3.200 rpm para descarte do sobrenadante. Esse processo foi repetido diversas vezes, até ser obtido um precipitado de leucócitos, livre de resquícios de hemoglobina. Em seguida, o precipitado foi suspenso novamente em solução de lise contendo 10 mM Tris-HCl pH 8,5 dodecil sulfato de sódio (SDS), 5mM EDTA, 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 um 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 ressuspenso em tampão Tris-EDTA pH 8,0 (Descrito e adaptado por Miller; Dykes e Polesky 1988), de acordo com a figura 6. O DNA genômico foi quantificado Qubit™ por fluorescência, cujo os dados de DNA foram 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 6. Coleta e isolamento do DNA a partir dos leucócitos



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

3.11.2 Desenho dos Primers

Para avaliar os níveis de metilação do DNA, na região promotora, o desenho do primer para os promotores dos genes *MTHFR*, *ADRB3*, *LPL* foram realizados pelo BLAST e o Software MethPrimer o qual foi desenvolvido para a PCR baseada em conversão de bissulfito. O MethPrimer aceita uma sequência de DNA como entrada, executa uma conversão digital de bissulfito da sequência de entrada e, em seguida, seleciona primers na sequência convertida. Os resultados da seleção de primers são entregues por meio de um navegador da Web em visualizações de texto e gráficos (LI; DAHIYA, 2002).

3.11.3 Conversão do DNA pelo Bissulfito

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

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

3.11.4 Níveis de Metilação

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

dNTPs (Qiagen), 250 nM de cada primer, 5µM SYTO dye® (INVITROGEN), 1U HotstarTaq DNA Polimerase (Qiagen) e 1µl de DNA modificado com bissulfito. O programa de PCR consiste de uma ativação enzimática inicial, a 95 ° C por 10 min; seguida por 50 ciclos de 45 s a 95 ° C, 45 s a 60 ° C e 45 s a 72 ° C, e uma extensão final a 72 ° C, por 10 min. O DNA genômico com bissulfito foi amplificado com sequências dos primers no (APÊNDICE B).

3.12 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software R, 3.3.2 (R CORE TEAM, 2017) disponível gratuitamente em <https://www.r-project.org/>. Inicialmente, foi realizada a caracterização da amostra por meio da estatística descritiva, por meio de frequência única, usando medições de posição, como frequência simples e medida de dispersão. Adicionalmente, foi realizado o teste para proporções para verificar se havia diferença entre a proporção de indivíduos com LDL-C < e ≥ a 130 mg/dL e < e ≥ que 70 mg/dL e a variável sexo. As variáveis foram testadas quanto à presença de normalidade por meio do teste de Lilliefors, que é uma derivação do teste de Kolmogorov-Smirnov. Além disso, para verificar se havia diferença, em média, entre as variáveis CT, HDL, TG, Níveis de Metilação do Gene *LPL*, Níveis de Metilação do Gene *ADRB3* e Níveis de Metilação do Gene *MTHFR* entre as classes “LDL < 130 mg/dL”, “LDL ≥ que 130 mg/dL”, “LDL < 70 mg/dL” e “LDL ≥ que 70 mg/dL” tanto pela Equação de Friedewald quanto pela Equação de Martin, aplicou-se o teste-t de comparação e o teste de Man-Whitney.

Para identificar a existência de relações significativas entre as concentrações de LDL-C estimadas pela Equação de Friedewald e pela Equação de Martin, e os níveis de metilação dos genes *LPL*, *MTHFR* e *ADRB3* e as demais variáveis deste estudo, foram propostos, os seguintes modelos de regressão linear:

Modelo 1: $\mu(\text{LDL Friedewald}) = \beta_0 + \beta_1 \text{Níveis de Metilação do Gene LPL} + \beta_2 \text{MDA} + \beta_3 \text{CAT} + \beta_4 \text{PCR} + \beta_5 \text{AGP} + \beta_6 \text{HCy} + \beta_7 \text{B12} + \beta_8 \text{Folato}.$

Modelo 2: $\mu(\text{LDL Martin}) = \beta_0 + \beta_1 \text{Níveis de Metilação do Gene LPL} + \beta_2 \text{MDA} + \beta_3 \text{CAT} + \beta_4 \text{PCR} + \beta_5 \text{AGP} + \beta_6 \text{HCy} + \beta_7 \text{B12} + \beta_8 \text{Folato}.$

Modelo 3: $\mu(\text{LDL Friedewald}) = \beta_0 + \beta_1 \text{Níveis de Metilação do Gene LPL} + \beta_2 \text{Carboidratos} + \beta_3 \text{Proteínas} + \beta_4 \text{Lipídios} + \beta_5 \text{Vitamina A} + \beta_6 \text{ Gorduras Monoinsaturadas} + \beta_7 \text{B12} + \beta_8 \text{Ácido}.$

Oleico + β_9 Ômega 3 + β_{10} Ômega 6 + β_{11} Gorduras Saturadas + β_{12} Colesterol + β_{13} Gorduras Poli-insaturadas + β_{14} Gorduras Trans + β_{15} Vitamina C + β_{16} Vitamina E + β_{17} Betacaroteno + β_{18} Selênio + β_{19} Folato + β_{20} Folato.

Modelo 4: $\mu(\text{LDL Martin}) = \beta_0 + \beta_1$ Níveis de Metilação do Gene LPL + β_2 Carboidratos + β_3 Proteínas + β_4 Lipídios + β_5 Vitamina A + β_6 Gorduras Monoinsaturadas + β_7 B12 + β_8 Ácido Oleico + β_9 Ômega 3 + β_{10} Ômega 6 + β_{11} Gorduras Saturadas + β_{12} Colesterol + β_{13} Gorduras Poli-insaturadas + β_{14} Gorduras Trans + β_{15} Vitamina C + β_{16} Vitamina E + β_{17} Betacaroteno + β_{18} Selênio + β_{19} Folato + β_{20} Folato.

Modelo 5: $\mu(\text{LDL Friedewald}) = \beta_0 + \beta_1$ Níveis de Metilação do Gene LPL + β_2 Sexo + β_3 Idade + β_4 Renda + β_5 Atividade Física + β_6 Tabagismo + β_7 Consumo de Álcool + β_8 CC + β_9 Fármacos hipolipemiantes + β_{10} Ômega 6 + β_{11} Morbidades Relacionadas a doenças cardiovasculares.

Modelo 6: $\mu(\text{LDL Martin}) = \beta_0 + \beta_1$ Níveis de Metilação do Gene LPL + β_2 Sexo + β_3 Idade + β_4 Renda + β_5 Atividade Física + β_6 Tabagismo + β_7 Consumo de Álcool + β_8 CC + β_9 Fármacos hipolipemiantes + β_{10} Ômega 6 + β_{11} Morbidades Relacionadas a doenças cardiovasculares.

Todos esses modelos foram repetidos para os genes *ADRB3* e *MTHFR*, e quanto ao nível de significância, adotou-se o valor de 5%.

REFERÊNCIAS

- ASCIUTTI, L. S. R. et al. **Manual de porções média em tamanho real baseado no programa dietsys para estudo de base populacional**. UFPB, 2005.
- ABDEL-MAKSoud, M. et al. Effects of Modifying Triglycerides and Triglyceride-rich Lipoproteins on Cardiovascular Outcomes. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 51, n. 4, p. 331–351, 2008.
- ABI KHALIL, C. The emerging role of epigenetics in cardiovascular disease. **Therapeutic Advances in Chronic Disease**, v. 5, n. 4, p. 178–187, 2014.
- ABREU, C. Methylation status regulates LPL expression in Chronic Lymphocytic Leukemia. **Leukemia & Lymphoma**, v.54, n.8, p.1844-8, 2013.
- AFMAN, L. A.; MÜLLER, M. Human nutrigenomics of gene regulation by dietary fatty acids. **Progress in Lipid Research**, v. 51, n. 1, p. 63–70, 2012.
- ALCALÁ, M. et al. Vitamin E reduces adipose tissue fibrosis, inflammation, and oxidative stress and improves metabolic profile in obesity. **Obesity**, v. 23, n. 8, p. 1598–1606, 2015.
- ALFADDA, A. A. et al. Orosomucoid serum concentrations and fat depot-specific mRNA and protein expression in humans. **Molecules and Cells**, v. 33, n. 1, p. 35–41, 2012.
- ALLISON, D. B. et al. Estimated Intakes of Trans Fatty and Other Fatty Acids in the US Population. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 99, n. 2, p. 166–174, 1999.
- ALVES, B. C. et al. Obesity, dynapenia and high cardiovascular risk co-exist in post-liver transplant setting: results of a cross-sectional study. **Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology**, p. 1–8, 2018.
- ANCHETA, I. B. et al. Cardiovascular Disease Risk Score: Results from the Filipino–American Women Cardiovascular Study. **Journal of Racial and Ethnic Health Disparities**, v. 4, n. 1, p. 25–34, 2017.
- ANDERSON, T. J. et al. Canadian Cardiovascular Society Guidelines for the Management of Dyslipidemia for the Prevention of Cardiovascular Disease in the Adult. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 32, n. 11, p. 1263–1282, 2016.
- ANNIWAER, J. et al. Homocysteine Might Increase the Risk of Recurrence in Patients Presenting with Primary Cerebral Infarction. **International Journal of Neuroscience**, v. 14, p. 1–17, 2018.
- APTEKMANN, N. P.; CESAR, T. B. Long-term orange juice consumption is associated with low LDL-cholesterol and apolipoprotein B in normal and moderately hypercholesterolemic subjects. **Lipids in Health and Disease**, v. 12, n. 1, p. 119, 2013.
- AQUINO, J. et al. Effects of Dietary Brazilian Palm Oil (*Mauritia flexuosa* L.) on Cholesterol Profile and Vitamin A and E Status of Rats. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 9054–9070, 2015.

- ASHOR, A. W. et al. Systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials testing the effects of vitamin C supplementation on blood lipids. **Clinical Nutrition**, v. 35, n. 3, p. 626–637, 2016.
- ATTWOOD, J. T.; YUNG, R. L.; RICHARDSON, B. C. DNA methylation and the regulation of gene transcription. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 59, n. 2, p. 241–257, 2002.
- AZZINI, E. et al. Mediterranean Diet Effect: an Italian picture. **Nutrition Journal**, v. 10, n. 1, p. 125, 2011.
- BABAEI, H. et al. Effects of Chicory Leaf Extract on Serum Oxidative Stress Markers, Lipid Profile and Periodontal Status in Patients With Chronic Periodontitis. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 37, n. 6, p. 479–486, 2018.
- BAKHTIARI, A. et al. Association of lipid peroxidation and antioxidant status with metabolic syndrome in Iranian healthy elderly women. **Biomedical Reports**, v. 7, n. 4, p. 331–336, 2017.
- BAR-EL DADON, S.; REIFEN, R. Vitamin A and the epigenome. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 11, p. 2404–2411, 2017.
- BASSUK SS, RIFAI N, R. P. High-sensitivity C-reactive protein: clinical importance. **Current Problems in Cardiology**, v. 29, n. 8, p. 439–493, 2004.
- BEACH, S. R. H. et al. MTHFR regulatory effects on methylation of CG05575921 in response to smoking: Effects are also discernable using MTHFR expression. **American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics**, v. 177, n. 5, p. 529–534, 2018.
- BENATAR, J. R.; SIDHU, K.; STEWART, R. A. H. Effects of High and Low Fat Dairy Food on Cardio-Metabolic Risk Factors: A Meta-Analysis of Randomized Studies. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. e76480, 2013.
- BERNTSSON, J. et al. Orosomucoid, Carotid Plaque, and Incidence of Stroke. **Stroke**, v. 47, n. 7, p. 1858–1863, 2016.
- BLOOD pressure-lowering treatment based on cardiovascular risk: a meta-analysis of individual patient data. **The Lancet**, v. 384, n. 9943, p. 591–598, 2014.
- BODEN, G. Obesity, insulin resistance and free fatty acids. Current Opinion in Endocrinology, **Diabetes and Obesity**, v. 18, n. 2, p. 139–143, 2011.
- BOLFARINE, H. BUSSAB, W.O. Elementos de amostragem. São Paulo: **Edgard Blucher**; 2005. 269p.
- BOTEZATU, A. et al. 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, abr. 2013.

BRETTFELD, C.; ENGLERT, S.; AUMUELLER, E.; HASLBERGER, A.G. Genetic and epigenetic interactions in adaptive thermogenesis pathways in association with obesity from a Public Health Genomics perspective. **Italian Journal of Public Health**, v.9,n.4,p.1-18, 2012.

BRAICU, C. et al. Nutrigenomics in cancer: Revisiting the effects of natural compounds. **Seminars in Cancer Biology**, v. 46, p. 84–106, 2017.

BRAUN, K. V. E. et al. The role of DNA methylation in dyslipidaemia: A systematic review. **Progress in Lipid Research**, v. 64, n. 2016, p. 178–191, 2016.

BURO-AURIEMMA, L. J. et al. Cigarette smoking induces small airway epithelial epigenetic changes with corresponding modulation of gene expression. **Human Molecular Genetics**, v. 22, n. 23, p. 4726–4738, 2013.

CASTELLANO-CASTILLO, D. et al. Adipose Tissue LPL Methylation is Associated with Triglyceride Concentrations in the Metabolic Syndrome. **Clinical Chemistry**, v. 64, n. 1, p. 210–218, 2018.

CASTRO, R. 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C->T and 1298A->C mutations are associated with DNA hypomethylation. **Journal of Medical Genetics**, v. 41, n. 6, p. 454–458, 2004.

CHAMBIAL, S. et al. Vitamin C in Disease Prevention and Cure: An Overview. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 28, n. 4, p. 314–328, 2013.

CHIU, H.-F. et al. Regulatory/modulatory effect of prune essence concentrate on intestinal function and blood lipids. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 974–979, 2017.

CHOUDHARY, M. K. et al. LDL cholesterol is associated with systemic vascular resistance and wave reflection in subjects naive to cardiovascular drugs. **Blood Pressure**, v. 28, n. 1, p. 4–14, 2019.

CLEMENTE-POSTIGO, M. Adipose tissue gene expression of factors related to lipid processing in obesity. **PLoS ONE**, n. 6, v. 9, p. 24783, 2011.

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

COIMBRA, S. et al. Weight loss achieved by bariatric surgery modifies high-density lipoprotein subfractions and low-density lipoprotein oxidation towards atheroprotection. **Clinical Biochemistry**, v. 63, p. 46–53, 2019.

COPPEDÈ, F. et al. Increased MTHFR promoter methylation in mothers of Down syndrome individuals. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 787, p. 1–6, 2016.

COSTA, C.J. M. et al. **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.

COSTA, J. O. et al. Plasma Total Antioxidant Capacity and Cardiometabolic Risk in Non-Obese and Clinically Healthy Young Adults. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 109, n. 2, p. 1–8, 2017.

CREWS, H. et al. A critical assessment of some biomarker approaches linked with dietary intake. **British Journal of Nutrition**, v. 86, n. S1, p. S5, 2001.

D'AGOSTINO, R. B. et al. General Cardiovascular Risk Profile for Use in Primary Care. **Circulation**, v. 117, n. 6, p. 743–753, 2008.

DAHLHOFF, C. et al. Hepatic Methionine Homeostasis Is Conserved in C57BL/6N Mice on High-Fat Diet Despite Major Changes in Hepatic One-Carbon Metabolism. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. 57387, 2013.

de OLIVEIRA, Y. et al. Decrease of the DNA methylation levels of the ADRB3 gene in leukocytes is related with serum folate in eutrophic adults. **Journal of Translational Medicine**, v. 16, n. 1, p. 152, 2018.

de REKENEIRE, N. et al. Diabetes, Hyperglycemia, and Inflammation in Older Individuals: The Health, Aging and Body Composition study. **Diabetes Care**, v. 29, n. 8, p. 1902–1908, 2006.

de SOUZA, R. J. et al. Intake of saturated and trans unsaturated fatty acids and risk of all cause mortality, cardiovascular disease, and type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of observational studies. **British Medical Journal**, v. 351, p. 1–16, 2015.

DEL GOBBO, L. C. et al. Effects of tree nuts on blood lipids, apolipoproteins, and blood pressure: systematic review, meta-analysis, and dose-response of 61 controlled intervention trials. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 102, n. 6, p. 1347–1356, 2015.

de la IGLESIA, R. et al. Arylesterase Activity is Associated with Antioxidant Intake and Paraoxonase-1 (pon1) Gene Methylation in Metabolic Syndrome Patients Following an Energy Restricted Diet. **EXCLI Journal**, v. 13, p. 416–426, 2013.

DELONG, D. M. A Comparison of Methods for the Estimation of Plasma Low- and Very Low-Density Lipoprotein Cholesterol. **JAMA**, v. 256, n. 17, p. 2372, 1986.

DESGRAZ, B. et al. Comparison of self-perceived cardiovascular disease risk among smokers with Framingham and PROCAM scores: a cross-sectional analysis of baseline data from a randomised controlled trial. **British Medical Journal**, v. 7, n. 1, p. e012063, 2017.

DEVARAJ, S. et al. Gamma-tocopherol supplementation alone and in combination with alpha-tocopherol alters biomarkers of oxidative stress and inflammation in subjects with metabolic syndrome. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 44, n. 6, p. 1203–1208, 2008.

dos SANTOS NUNES, M. K. et al. Hypermethylation in the promoter of the MTHFR gene is associated with diabetic complications and biochemical indicators. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 9, n. 1, p. 84, 2017.

DROGAN, D. et al. Regional distribution of body fat in relation to DNA methylation within

the LPL, ADIPOQ and PPAR γ promoters in subcutaneous adipose tissue. **Nutrition & Diabetes**, v. 5, n. 7, p. 168–168, 2015.

DUESTER, G. Retinoic Acid Synthesis and Signaling during Early Organogenesis. **Cell**, v. 134, n. 6, p. 921–931, 2008.

EGGERSDORFER, M.; WYSS, A. Carotenoids in human nutrition and health. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 652, p. 18–26, 2018.

ELSAMANOUDY, A. et al. The role of nutrition related genes and nutrigenetics in understanding the pathogenesis of cancer. **Journal of Microscopy and Ultrastructure**, v. 4, n. 3, p. 115, 2016.

EL MABCHOUR, A.; AGUEH, V.; DELISLE, H. Homocystéinémie : déterminants et relation avec les facteurs de risque cardiométabolique au Bénin (Afrique de l'Ouest). **La Presse Médicale**, v. 39, n. 11, p. 238–246, 2010.

ENGEL, S.; THOLSTRUP, T. Butter increased total and LDL cholesterol compared with olive oil but resulted in higher HDL cholesterol compared with a habitual diet. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 102, n. 2, p. 309–315, 2015.

ENGSTRÖM, G. et al. Inflammation-Sensitive Plasma Proteins and Incidence of Myocardial Infarction in Men With Low Cardiovascular Risk. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 23, n. 12, p. 2247–2251, 2003.

ERKKILÄ, A. et al. Dietary fatty acids and cardiovascular disease: An epidemiological approach. **Progress in Lipid Research**, v. 47, n. 3, p. 172–187, 2008.

FALUDI, A. et al. Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose - 2017. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 109, n. 1, p. 1–92, 2017.

FANDIÑO-VAQUERO, R. et al. Orosomucoid secretion levels by epicardial adipose tissue as possible indicator of endothelial dysfunction in diabetes mellitus or inflammation in coronary artery disease. **Atherosclerosis**, v. 235, n. 2, p. 281–288, 2014.

FARAJ, M. et al. Apolipoprotein B: a predictor of inflammatory status in postmenopausal overweight and obese women. **Diabetologia**, v. 49, n. 7, p. 1637–1646, 2006.

FERRARI, C. K. B. Capacidade antioxidante total (CAT) em estudos clínicos, experimentais e nutricionais. **Journal of Health Sciences**, v. 28, n. 4, p. 307–310, 2010.

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

FINKELSTEIN, J. D. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. **European Journal of Pediatrics**, v. 157, n. S2, p. 40–44, 1998.

FLOCK, M. R.; GREEN, M. H.; KRIS-ETHERTON, P. M. Effects of Adiposity on Plasma

Lipid Response to Reductions in Dietary Saturated Fatty Acids and Cholesterol. **Advances in Nutrition**, v. 2, n. 3, p. 261–274, 2011.

FRANSSEN, R. et al. Obesity and Dyslipidemia. **Medical Clinics of North America**, v. 95, n. 5, p. 893–902, 2011.

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, n. 6, p. 499–502, 1972.

FROSST, P. et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. **Nature Genetics**, v. 10, n. 1, p. 111–113, 1995.

GABOON, N. E. A. Nutritional genomics and personalized diet. **Egyptian Journal of Medical Human Genetics**, v. 12, n. 1, p. 1–7, 2011.

GANJIFROCKWALA, F.; JOSEPH, J.; GEORGE, G. Decreased total antioxidant levels and increased oxidative stress in South African type 2 diabetes mellitus patients. **Journal of Endocrinology, Metabolism and Diabetes of South Africa**, v. 22, n. 2, p. 21–25, 2017.

GARG, G. et al. Pharmacological evaluation of *Convolvulus pluricaulis* as hypolipidaemic agent in Triton WR-1339-induced hyperlipidaemia in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 70, n. 11, p. 1572–1580, 2018.

GE, J. et al. Correlation between MTHFR gene methylation and pre-eclampsia, and its clinical significance. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 3, p. 8021–8028, 2015.

GHOBADI, S. et al. Effects of Canola Oil Consumption on Lipid Profile: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Clinical Trials. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 38, n. 2, p. 185–196, 2019.

GLIER, M. B.; GREEN, T. J.; DEVLIN, A. M. Methyl nutrients, DNA methylation, and cardiovascular disease. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 58, n. 1, p. 172–182, 2014.

GOEL, N.; KARIR, P.; GARG, V. K. Role of DNA methylation in human age prediction. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 166, p. 33–41, 2017.

GONZÁLEZ-MUNIESA, P. et al. Obesity. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 17034, p. 1–18, 2017.

GRUNDY, S.M. et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement: executive Summary. **Critical Pathways in Cardiology**, v. 4, v. 4, p. 198–203, 2005.

GRUNDY, S. M. et al. An International Atherosclerosis Society Position Paper: Global recommendations for the management of dyslipidemia-Full report. **Journal of Clinical Lipidology**, v. 8, n. 1, p. 29–60, 2014.

GUAY, S. P. et al. DNA methylation variations at CETP and LPL gene promoter loci: New molecular biomarkers associated with blood lipid profile variability. **Atherosclerosis**, v. 228, n. 2, p. 413–420, 2013.

GUAY, S. P. et al. ADRB3 gene promoter DNA methylation in blood and visceral adipose tissue is associated with metabolic disturbances in men. **Epigenomics**, v. 6, n. 1, p. 33–43, 2014.

GUDAS, L. J.; WAGNER, J. A. Retinoids regulate stem cell differentiation. **Journal of Cellular Physiology**, v. 226, n. 2, p. 322–330, 2011.

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.

HALCOX, J. P. et al. Prevalence and treatment of atherogenic dyslipidemia in the primary prevention of cardiovascular disease in Europe: EURIKA, a cross-sectional observational study. **BMC Cardiovascular Disorders**, v. 17, n. 1, p. 160, 2017.

HAMULKA, J. et al. Intake of Saturated Fatty Acids Affects Atherogenic Blood Properties in Young, Caucasian, Overweight Women Even without Influencing Blood Cholesterol. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 11, p. 2530, 2018.

HARADA, P. H. N. et al. Lipoprotein insulin resistance score and risk of incident diabetes during extended follow-up of 20 years: The Women's Health Study. **Journal of Clinical Lipidology**, v. 11, n. 5, p. 1257–1267, 2017.

HEDMAN, Å. K. et al. DNA methylation patterns associated with oxidative stress in an ageing population. **BMC Medical Genomics**, v. 9, n. 1, p. 72, 2016.

HERCBERG, S. Alterations of the lipid profile after 7.5 years of low-dose antioxidant supplementation in the SU.VI.MAX Study. **Lipids**, v. 40, n. 4, p. 335–342, 2005.

HOCHEPIED, T. et al. α 1-Acid glycoprotein: an acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 14, n. 1, p. 25–34, 2003.

HOFFMAN, D. R. et al. S-Adenosylmethionine and S-adenosylhomocystein metabolism in isolated rat liver. Effects of L-methionine, L-homocystein, and adenosine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 255, n. 22, p. 10822–7, 1980.

HONARBAKHSH, S.; SCHACHTER, M. Vitamins and cardiovascular disease. **British Journal of Nutrition**, v. 101, n. 8, p. 1113, 2009.

HOSFORD-DONOVAN, A. et al. Observational and mechanistic links between C-reactive protein and blood pressure in elderly women. **Maturitas**, v. 89, p. 52–57, 2016.

HOU, L. et al. Excretion of Urinary Orosomucoid 1 Protein Is Elevated in Patients with Chronic Heart Failure. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. e107550, 2014.

HOUDE, A. A. et al. Placental lipoprotein lipase DNA methylation levels are associated with gestational diabetes mellitus and maternal and cord blood lipid profiles. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 5, n.2, p. 132–141, 2014.

HOUDE, A. A. et al. Leptin and adiponectin DNA methylation levels in adipose tissues and blood cells are associated with BMI, waist girth and LDL-cholesterol levels in severely obese men and women. **BMC Medical Genetics**, v. 16, n. 1, p. 29, 2015.

HUBÁČEK, J. A. Genetic determination of dyslipidemia - What tell us the results of genome-wide association studies?. **Vnitřní lékařství**, v. 62, n. 11, p. 868–872, 2016.

HUSSEIN, O.; ROSENBLAT, M.; REFAEL; G. A. M. Dietary selenium increases cellular glutathione peroxidase activity and reduces the enhanced susceptibility to lipid peroxidation of plasma and low-density lipoprotein in kidney transplant recipients. **Transplantation**, v. 63, n. 5, p. 679–685, 1997.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Contagem da população 2010**. Rio de Janeiro: Ministério do Planejamento, 2010.

ISO, H. et al. Intake of Fish and n3 Fatty Acids and Risk of Coronary Heart Disease Among Japanese. **Circulation**, v. 113, n. 2, p. 195–202, 2006.

ITO, K. et al. Relevance of intermediate-density lipoprotein cholesterol to Framingham risk score of coronary heart disease in middle-aged men with increased non-HDL cholesterol. **International Journal of Cardiology**, v. 168, n. 4, p. 3853–3858, 2013.

JACOBSON, T. A. et al. National Lipid Association Recommendations for Patient-Centered Management of Dyslipidemia: Part 1—Full Report. **Journal of Clinical Lipidology**, v. 9, n. 2, p. 129–169, 2015a.

JACOBSON, T. A. et al. National Lipid Association Recommendations for Patient-Centered Management of Dyslipidemia: Part 2. **Journal of Clinical Lipidology**, v. 9, n. 6, p. S1–S122.e1, 2015b.

JIN, Y. et al. Vegetarian Diets Are Associated with Selected Cardiometabolic Risk Factors among Middle-Older Aged South Asians in the United States. **The Journal of Nutrition**, v. 148, n. 12, p. 1954–1960, 2018.

JUUTILAINEN, A. Type 2 diabetes as a “coronary heart disease equivalent”: an 18-year prospective population-based study in Finnish subjects. **Diabetes Care**, v. 28, n. 12, p. 2901–2907, 2005.

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

KANNEL, W. B.; MCGEE, D. GORDON, T. A general cardiovascular risk profile: the Framingham Study. **American Journal of Cardiology**, v. 38, n. 1, p. 46–71, 1976.

KARAKILCIK, A. Z. et al. Effects of vitamin C and exercise on lipid profile, platelet and

erythrocyte indices in young soccer players. **The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness**, v. 54, n. 5, p. 665–671, 2014.

JONES, P. A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 7, p. 484–492, 2012.

KEMSE, N. G.; KALE, A. A.; JOSHI, S. R. A Combined Supplementation of Omega-3 Fatty Acids and Micronutrients (Folic Acid, Vitamin B12) Reduces Oxidative Stress Markers in a Rat Model of Pregnancy Induced Hypertension. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. e111902, 2014.

KHAZAMIPOUR, N. et al. MTHFR promoter hypermethylation in testicular biopsies of patients with non-obstructive azoospermia: the role of epigenetics in male infertility. **Human Reproduction**, v. 24, n. 9, p. 2361–2364, 2009.

KIM, J. Y. et al. Metabolic Profiling of Plasma in Overweight/Obese and Lean Men using Ultra Performance Liquid Chromatography and Q-TOF Mass Spectrometry (UPLC–Q-TOF MS). **Journal of Proteome Research**, v. 9, n. 9, p. 4368–4375, 2010.

KIM, D. S. et al. Pharmacogenetics of paraoxonase activity: elucidating the role of high-density lipoprotein in disease. **Pharmacogenomics**, v. 14, n. 12, p. 1495–1515, 2013.

KIM, M. et al. Comparison of Blueberry (*Vaccinium* spp.) and Vitamin C via Antioxidative and Epigenetic Effects in Human. **Journal of Cancer Prevention**, v. 22, n. 3, p. 174–181, 2017.

KIM, Y.; KEOGH, J.; CLIFTON, P. Nuts and Cardio-Metabolic Disease: A Review of Meta-Analyses. **Nutrients**, v. 10, n. 12, p. 1935, 2018.

KISHIMOTO, Y. et al. The Effect of the Consumption of Egg on Serum Lipids and Antioxidant Status in Healthy Subjects. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 62, n. 5, p. 361–365, 2016.

KITAGAWA, K. et al. Cumulative Effects of LDL Cholesterol and CRP Levels on Recurrent Stroke and TIA. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 25, p. 1–10, 2018.

KLERK, M. et al. MTHFR 677C→T Polymorphism and Risk of Coronary Heart Disease. **JAMA**, v. 288, n. 16, p. 2023, 2002.

KOUFAKIS, T. et al. Effects of Orthodox religious fasting on human health: a systematic review. **European Journal of Nutrition**, v. 56, n. 8, p. 2439–2455, 2017.

KRIS-ETHERTON, P. M. et al. Dietary stearic acid and risk of cardiovascular disease: Intake, sources, digestion, and absorption. **Lipids**, v. 40, n. 12, p. 1193–1200, 2005.

KULKARNI, A. et al. Association of omega-3 fatty acids and homocysteine concentrations in pre-eclampsia. **Clinical Nutrition**, v. 30, n. 1, p. 60–64, 2011.

KUMAR, D.; RIZVI, S. I. Plasma paraoxonase 1 arylesterase activity in d-galactose-induced aged rat model: correlation with LDL oxidation and redox status. **Aging Clinical and Experimental Research**, v. 26, n. 3, p. 261–267, 2014.

KUNEŠ, J. Critical developmental periods in the pathogenesis of hypertension. **Physiological Research**, v. 61, n. 1, p. 9–17, 2012.

KUO, K.; CALE, S.; McDOWELL, I. Standardization (External and Internal) of HPLC Assay for Plasma Homocysteine. **Clinical Chemistry**, v.43, n.9, p. 1653 - 1655, 1997.

KURYLOWICZ, A. et al. Obesity is associated with a decrease in expression but not with the hypermethylation of thermogenesis-related genes in adipose tissues. **Journal of Translational Medicine**, v. 13, n. 1, p. 31, 2015.

KUTKIENE, S. et al. Lipid profile evaluation and severe hypercholesterolaemia screening in the middle-aged population according to nationwide primary prevention programme in Lithuania. **Atherosclerosis**, v. 277, p. 267–272, 2018.

KUWABARA, A. et al. The Association between Vitamin E Intake and Hypertension: Results from the Re-Analysis of the National Health and Nutrition Survey. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 60, n. 4, p. 239–245, 2014.

LACLAUSTRA, M. et al. LDL cholesterol rises with BMI only in lean individuals: Cross-sectional U.S. And Spanish representative data. **Diabetes Care**, v. 41, n. 10, p. 2195–2201, 2018.

LAMANTIA, V.; SNIDERMAN, A.; FARAJ, M. Nutritional management of hyperapoB. **Nutrition Research Reviews**, v. 29, n. 02, p. 202–233, 2016.

LAU, F. et al. Nutrigenomic Analysis of Diet-Gene Interactions on Functional Supplements for Weight Management. **Current Genomics**, v. 9, n. 4, p. 239–251, 2008.

LEE, Y. S. et al. Adipocytokine Orosomucoid Integrates Inflammatory and Metabolic Signals to Preserve Energy Homeostasis by Resolving Immoderate Inflammation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 29, p. 22174–22185, 2010.

LEE, J.; JANG, S.; SON, H. Validation of the Martin Method for Estimating Low-Density Lipoprotein Cholesterol Levels in Korean Adults: Findings from the Korea National Health and Nutrition Examination Survey, 2009–2011. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. 1–14, 2016.

LEE, J.H.; HONG, S.M.; SHIN, Y.A. Effects of exercise training on stroke risk factors, homocysteine concentration, and cognitive function according the APOE genotype in stroke patients. **Journal of Exercise Rehabilitation**, v. 14, n. 2, p. 267–274, 2018.

LEE, J. et al. Validation of the Friedewald formula for estimating low density lipoprotein cholesterol: the Korea National Health and Nutrition Examination Survey, 2009 to 2011. **The Korean Journal of Internal Medicine**, 2018.

LÉVESQUE, V. et al. Relation Between a Simple Lifestyle Risk Score and Established Biological Risk Factors for Cardiovascular Disease. **The American Journal of Cardiology**, v. 120, n. 11, p. 1939–1946, 2017.

LI, F.H. et al. The silencing of ApoC3 suppresses oxidative stress and inflammatory

responses in placenta cells from mice with preeclampsia via inhibition of the NF- κ B signaling pathway. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 107, n. 4, p. 1377–1384, 2018.

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

LIBERT, C. Protection by alpha 1-acid glycoprotein against tumor necrosis factor- induced lethality. **Journal of Experimental Medicine**, v. 180, n. 4, p. 1571–1575, 1994.

LIBBY, P. M. R. Inflammation and Atherosclerosis: Role of C-Reactive Protein in Risk Assessment. **The American Journal of Medicine**, v. 116, n. 6, p. 9–16, 2004.

LIMA, L. P.; SAMPAIO, H. A. C. Caracterização socioeconômica, antropométrica e alimentar de obesos graves. **Ciência Saúde Coletiva**, v. 12, n. 4, p. 1011, 2007.

LIMA, F. E. L. et al. Diet and cancer in Northeast Brazil: evaluation of eating habits and food group consumption in relation to breast cancer. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 4, p. 820-828, 2008.

LIMA, R. P. A. et al. Effect of a diet containing folate and hazelnut oil capsule on the methylation level of the ADRB3 gene , lipid profile and oxidative stress in overweight or obese women. **Clinical Epigenetics**, v. 9, n. 110, p. 1–9, 2017.

LISBOA, Jéssica Vanessa de Carvalho. **Influência do polimorfismo C677T no gene MTHFR relacionado à suplementação de uma dieta com folato no status inflamatório de mulheres obesas e com sobrepeso**. 2017. Dissertação (Mestrado em Nutrição Clínica e epidemiologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017.

LIVINGSTONE, K. M. et al. Does Dairy Food Intake Predict Arterial Stiffness and Blood Pressure in Men? **Hypertension**, v. 61, n. 1, p. 42–47, 2013.

LOPES-VIRELLA, M. F. et al. / **Atherosclerosis**, v. 224, n. 2, p. 526–531, 2012.

LOVEGROVE, J. A.; HOBBS, D. A. New perspectives on dairy and cardiovascular health. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 75, n. 03, p. 247–258, 2016.

LUI, G. K. et al. Risk Estimates for Atherosclerotic Cardiovascular Disease in Adults With Congenital Heart Disease. **The American Journal of Cardiology**, v. 119, n. 1, p. 112–118, 2017.

MAEDA, S. et al. Associations between small dense LDL, HDL subfractions (HDL2, HDL3) and risk of atherosclerosis in Japanese-Americans. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 19, n. 5, p. 444–452, 2012.

MAHMOOD, S. S. et al. The Framingham Heart Study and the epidemiology of cardiovascular disease: a historical perspective. **The Lancet**, v. 383, n. 9921, p. 999–1008, 2014.

MAKITA, S.; NAKAMURA, M.; HIRAMORI, K. The Association of C-Reactive Protein Levels With Carotid Intima-Media Complex Thickness and Plaque Formation in the General

Population. **Stroke**, v. 36, n. 10, p. 2138–2142, 2005.

MALACHIAS, M. et al. Capítulo 1 - Conceituação, Epidemiologia e Prevenção Primária. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 107, n. 3, p. 1–108, 2016.

MANI, S. et al. DNA methylation changes associated with risk factors in tumors of the upper aerodigestive tract. **Epigenetics**, v. 7, n. 3, p. 270–277, 2012.

MAO, Y. et al. MicroRNAs as pharmacological targets in diabetes. **Pharmacological Research**, v. 75, p. 37–47, 2013.

MARTÍN-NÚÑEZ, G. et al. Type 2 diabetes mellitus in relation to global LINE-1 DNA methylation in peripheral blood: A cohort study. **Epigenetics**, v. 9, n. 10, p. 1322–1328, 2014.

MARTÍ-CARVAJAL, A. J. et al. Homocysteine lowering interventions for preventing cardiovascular events. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 4, p. 1-129, 2009.

MARTIN, S. S. et al. Comparison of a Novel Method vs the Friedewald Equation for Estimating Low-Density Lipoprotein Cholesterol Levels From the Standard Lipid Profile. **JAMA**, v. 310, n. 19, p. 2061, 2013.

MARTIN, S. S. et al. Comparison of Low-Density Lipoprotein Cholesterol Assessment by Martin/Hopkins Estimation, Friedewald Estimation, and Preparative Ultracentrifugation. **JAMA Cardiology**, v. 3, n. 8, p. 749, 2018.

MARTÍNEZ-LÓPEZ, S. et al. Moderate consumption of a soluble green/roasted coffee rich in caffeoylquinic acids reduces cardiovascular risk markers: results from a randomized, cross-over, controlled trial in healthy and hypercholesterolemic subjects. **European Journal of Nutrition**, p. 1–14, 2018.

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

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

MASSON, W. et al. Estimation of cardiovascular risk and detection of subclinical carotid atheromatosis in patients with diabetes without a history of cardiovascular disease. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, v. 61, n. 2, p. 122–129, 2017.

MAUGERI, A. et al. Dietary antioxidant intake decreases carotid intima media thickness in women but not in men: A cross-sectional assessment in the Kardiovize study. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 131, p. 274–281, 2019.

MCRAE, M. P. Vitamin C supplementation lowers serum low-density lipoprotein cholesterol and triglycerides: a meta-analysis of 13 randomized controlled trials. **Journal of Chiropractic Medicine**, v. 7, n. 2, p. 48–58, 2008.

MEDH, J. D. et al. Lipoprotein Lipase Binds to Low Density Lipoprotein Receptors and Induces Receptor-mediated Catabolism of Very Low Density Lipoproteins in Vitro*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 29, p. 17073–17080, 1996.

MEHENDALE, S. et al. Fatty acids, antioxidants, and oxidative stress in pre-eclampsia. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 100, n. 3, p. 234 – 238, 2008.

MILLER, E. R. et al. Meta-Analysis: High-Dosage Vitamin E Supplementation May Increase All-Cause Mortality. **ACC Current Journal Review**, v. 14, n. 5, p. 17, 2005.

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.

MIYAWAKI, T. et al. Contribution of Visceral Fat Accumulation to the Risk Factors for Atherosclerosis in Non-Obese Japanese. **Internal Medicine**, v. 43, n. 12, p. 1138–1144, 2004.

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

MOMIN, M. et al. Relationship between plasma homocysteine level and lipid profiles in a community-based Chinese population. **Lipids in Health and Disease**, p. 1–7, 2017.

MORTAZAVI A. et al. The Effect of Omega-3 Fatty Acids on Serum Apelin Levels in Cardiovascular Disease: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. **Reports of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 7, n. 1, p. 59–66, 2018.

MOZAFFARIAN, D.; ARO, A.; WILLETT, W. C. Health effects of trans-fatty acids: experimental and observational evidence. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 63, n. S2, p. S5–S21, 2009.

MUNSHI, R.; JOSHI, S.; RANE, B. Development of an experimental diet model in rats to study hyperlipidemia and insulin resistance, markers for coronary heart disease. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 46, n. 3, p. 270, 2014.

MUSA-VELOSO, K. et al. The effects of almond consumption on fasting blood lipid levels: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, p. e34, 2016.

NCEP - ATP III. National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. **Circulation**, v. 106, p. 3143–3421, 2002.

NEEHA, V. S.; KINTH, P. Nutrigenomics research: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 50, n. 3, p. 415–428, 2013.

NESTEL, P. Trans Fatty Acids: Are Its Cardiovascular Risks Fully Appreciated? **Clinical Therapeutics**, v. 36, n. 3, p. 315–321, 2014.

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

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

OLIVEIRA, C. DA S. et al. Impact of Roux-en-Y gastric bypass on lipid and inflammatory profiles. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 42, n. 5, p. 305–310, 2015.

OLIVEIRA, M. J. A. et al. Evaluation of four different equations for calculating LDL-C with eight different direct HDL-C assays. *Clinica Chimica Acta*, v. 423, p. 135–140, 2013.

PACANA, T. et al. Dysregulated Hepatic Methionine Metabolism Drives Homocysteine Elevation in Diet-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. 136822, 2015.

PACCHIEROTTI, F.; SPANÒ, M. Environmental Impact on DNA Methylation in the Germline: State of the Art and Gaps of Knowledge. **BioMed Research International**, v. 2015, n. 123484, p. 1–23, 2015.

PANICKAR, K. S.; JEWELL, D. E. The beneficial role of anti-inflammatory dietary ingredients in attenuating markers of chronic low-grade inflammation in aging. **Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation**, v. 23, n. 2, p. 1–12, 2015.

PARK, J.H. et al. Epigenetic modification by dietary factors: Implications in metabolic syndrome. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 54, p. 58–70, 2017.

PATTERSON, E. et al. Health Implications of High Dietary Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids. **Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 2012, p. 1–16, 2012.

PEARCE, K. L.; CLIFTON, P. M.; NOAKES, M. Egg consumption as part of an energy-restricted high-protein diet improves blood lipid and blood glucose profiles in individuals with type 2 diabetes. *British Journal of Nutrition*, v. 105, n. 04, p. 584–592, 2011.

PEARSON, T. A. et al. Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease. **Circulation**, v. 107, n. 3, p. 499–511, 2003.

PEDDINTI, G. et al. Early metabolic markers identify potential targets for the prevention of type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 60, n. 9, p. 1740–1750, 2017.

PENCINA, M. J.; NAVAR-BOGGAN, A. M.; D'AGOSTINO, R. B. Application of New Cholesterol Guidelines to a Population-Based Sample. **Journal of Vascular Surgery**, v. 60, n. 2, p. 534, 2014.

PERK, J. et al. European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012): The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other

Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). **European Heart Journal**, v. 33, n. 13, p. 1635–1701, 2012.

PETROGIANNI, M. et al. Fortification of vitamin A in a phytosterol enriched milk maintains plasma beta-carotene levels. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 1, p. 196–199, 2014.

PFEIFFER, L. et al. DNA Methylation of Lipid-Related Genes Affects Blood Lipid Levels. **Circulation: Cardiovascular Genetics**, v. 8, n. 2, p. 334–342, 2015.

PHUNG, O. J. et al. Almonds Have a Neutral Effect on Serum Lipid Profiles: A Meta-Analysis of Randomized Trials. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 109, n. 5, p. 865–873, 2009.

PLETCHER, M. J.; MORAN, A. E. Cardiovascular Risk Assessment. **Medical Clinics of North America**, v. 101, n. 4, p. 673–688, 2017.

POGRIBNY, I. P.; BELAND, F. A. DNA hypomethylation in the origin and pathogenesis of human diseases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 14, p. 2249–2261, 2009.

POKHAREL, Y. et al. High-sensitivity C-reactive protein levels and health status outcomes after myocardial infarction. **Atherosclerosis**, v. 266, p. 16–23, 2017.

PORTELA, A.; ESTELLER, M. Epigenetic modifications and human disease. **Nature Biotechnology**, v. 28, n. 10, p. 1057–1068, 2010.

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

RASHIDI, B. et al. Anti-Atherosclerotic Effects of Vitamins D and E in Suppression of Atherogenesis. **Journal of Cellular Physiology**, v. 232, n. 11, p. 2968–2976, 2017.

RAVN-HAREN, G. et al. A short-term intervention trial with selenate, selenium-enriched yeast and selenium-enriched milk: effects on oxidative defence regulation. **British Journal of Nutrition**, v. 99, n. 04, p. 883–892, 2008.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2006. URL <https://www.R-project.org/>.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2017. URL <https://www.R-project.org/>.

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

REMELY, M. et al. Vitamin E Modifies High-Fat Diet-Induced Increase of DNA Strand Breaks, and Changes in Expression and DNA Methylation of Dnmt1 and MLH1 in C57BL/6J Male Mice. **Nutrients**, v. 9, n. 6, p. 607, 2017.

RIDKER, P. M. et al. Comparison of C-Reactive Protein and Low-Density Lipoprotein Cholesterol Levels in the Prediction of First Cardiovascular Events. **New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 20, p. 1557–1565, 2002.

RIMM, E. B.; STAMPFER, M. J. Folate and cardiovascular disease: one size does not fit all. **The Lancet**, v. 378, n. 9791, p. 544–546, 2011.

RIVIÈRE, G. et al. Epigenetic regulation of somatic angiotensin-converting enzyme by DNA methylation and histone acetylation. **Epigenetics**, v. 6, n. 4, p. 478–489, 2011.

ROHNER, F. et al. Adjusting soluble transferrin receptor concentrations for inflammation: Biomarkers Reflecting Inflammation and Nutritional Determinants of Anemia (BRINDA) project. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 106, n. 1, p. 372–382, 2017.

SAKATA, K. et al. Low Baseline High-Sensitive C-Reactive Protein is Associated with Coronary Atherosclerosis Regression: Insights from the MILLION Study. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 25, p. 1–10, 2018.

SANTANA BEZERRA, H. et al. The MTHFR promoter hypermethylation pattern associated with the A1298C polymorphism influences lipid parameters and glycemic control in diabetic patients. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, v. 11, n. 1, p. 4, 2019.

SACKS, F. M. et al. Dietary Fats and Cardiovascular Disease: A Presidential Advisory From the American Heart Association. **Circulation**, v. 136, n. 3, p. 1 - 25, 2017.

SATHIYAKUMAR, V. et al. Impact of Novel Low-Density Lipoprotein-Cholesterol Assessment on the Utility of Secondary Non-High-Density Lipoprotein-C and Apolipoprotein B Targets in Selected Worldwide Dyslipidemia Guidelines. **Circulation**, v. 138, n. 3, p. 244–254, 2018.

SCHAPIRA, M.; ARROWSMITH, C. H. Methyltransferase inhibitors for modulation of the epigenome and beyond. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 33, p. 81–87, 2016.

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

SELHUB, J. The Many Facets of Hyperhomocysteinemia: Studies from the Framingham Cohorts. **The Journal of Nutrition**, v. 136, n. 6, p. 1726–1730, 2006.

SEO, J.Y. et al. Epigenetics: general characteristics and implications for oral health. **Restorative Dentistry & Endodontics**, v. 40, n. 1, p. 14, 2015.

SHATWAN, I. M. et al. Apolipoprotein E gene polymorphism modifies fasting total cholesterol concentrations in response to replacement of dietary saturated with monounsaturated fatty acids in adults at moderate cardiovascular disease risk. **Lipids in Health and Disease**, v. 16, n. 1, p. 222, 2017.

SHETE, V. et al. Low-Density Lipoprotein Receptor Contributes to β -Carotene Uptake in the Maternal Liver. *Nutrients*, v. 8, n. 12, p. 765, 2016.

SILVA, D.; PAIS DE LACERDA, A. Proteína C reativa de alta sensibilidade como biomarcador de risco na doença coronária. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, v. 31, n. 11, p. 733–745, 2012.

SILVA, A.H.A.; MORAES, R.M.; COSTA, M.J.C. **Plano amostral utilizando amostragem estratificada juntamente com amostragem sistemática para aplicação do Inquérito nutricional do município de João Pessoa, Paraíba**. Disponível em: <http://www.de.ufpb.br/~ronei/AnaHerminia2009Escola_Amostragem2009.pdf . Acesso em: 20 ago. 2017

SILVERMAN, M. G. et al. Association Between Lowering LDL-C and Cardiovascular Risk Reduction Among Different Therapeutic Interventions. **JAMA**, v. 316, n. 12, p. 1289, 2016.

SIMÃO, A. et al. I Diretriz Brasileira de Prevenção Cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 101, n. 6, p. 1–79, 2013.

SIMÃO, A. F. et al. I Diretriz Brasileira para Prevenção Cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 101, n. 6, p. 1-78, 2017.

SIQUEIRA, A. F. A.; ABDALLA, D. S. P.; FERREIRA, S. R. G. LDL: da síndrome metabólica à instabilização da placa aterosclerótica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 334–343, 2006.

SITI, H. N.; KAMISAH, Y.; KAMSIAH, J. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). **Vascular Pharmacology**, v. 71, p. 40–56, 2015.

SPENCE, J. D.; YI, Q.; HANKEY, G. J. B vitamins in stroke prevention: time to reconsider. **The Lancet Neurology**, v. 16, n. 9, p. 750–760, 2017.

STAMPFER, M. J. Vitamin E Consumption and the Risk of Coronary Disease in Women. **The Nurse Practitioner**, v. 18, n. 7, p. 7, 1993.

STEIN, E. A. Measuring LDL Cholesterol: for Old and New Calculations, Is There an Optimal Formula? **Clinical Chemistry**, v. 60, n. 12, p. 1466–1468, 2014.

STONE, N. J. et al. 2013 ACC/AHA Guideline on the Treatment of Blood Cholesterol to Reduce Atherosclerotic Cardiovascular Risk in Adults. **Circulation**, v. 129, n. 25 suppl 2, p. S1–S45, 2014.

SUKSOMBOON, N.; POOLSUP, N.; SINPRASERT, S. Effects of vitamin E supplementation on glycaemic control in type 2 diabetes: systematic review of randomized controlled trials. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 36, n. 1, p. 53–63, 2011.

TANG, Y. et al. C-reactive protein and ageing. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 44, n. 1, p. 9–14, 2017.

TEGELER, C. et al. The inflammatory markers CRP, IL-6, and IL-10 are associated with

cognitive function—data from the Berlin Aging Study II. **Neurobiology of Aging**, v. 38, p. 112–117, 2016.

THEODOSIOU, M.; LAUDET, V.; SCHUBERT, M. From carrot to clinic: an overview of the retinoic acid signaling pathway. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 9, p. 1423–1445, 2010.

THOTA, R. N. et al. Science behind the cardio-metabolic benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: biochemical effects vs . clinical outcomes. **Food & Function**, v. 9, n. 7, p. 3576–3596, 2018.

THUNDERS, M.; MANGAI, S.; COOPER, R. Nutrigenetics, Nutrigenomics, and the Future of Dietary Advice. **Food and Nutrition Sciences**, v. 04, n. 10, p. 999–1003, 2013.

TORAÑO, E. G. et al. The Impact of External Factors on the Epigenome: In Utero and over Lifetime. **BioMed Research International**, v. 2016, n. 2568635, p. 1–17, 2016.

TRAN, N. T. T. et al. The importance of waist circumference and body mass index in cross-sectional relationships with risk of cardiovascular disease in Vietnam. **PLOS ONE**, v. 13, n. 5, p. 1–13, 2018.

TSAI, I. J. et al. Curcumin supplementation ameliorated vascular dysfunction and improved antioxidant status in rats fed a high-sucrose, high-fat diet. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 43, n. 7, p. 669–676, 2018.

TSIMIKAS, S. et al. Human Oxidation-Specific Antibodies Reduce Foam Cell Formation and Atherosclerosis Progression. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 58, n. 16, p. 1715–1727, 2011.

VINCI, M. C.; POLVANI, G.; PESCE, M. Epigenetic Programming and Risk: The Birthplace of Cardiovascular Disease? **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 9, n. 3, p. 241–253, 2013.

WALL, R. et al. Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. **Nutrition Reviews**, v. 68, n. 5, p. 280–289, 2010.

WANG, Y. et al. Effects of garlic polysaccharide on alcoholic liver fibrosis and intestinal microflora in mice. **Pharmaceutical Biology**, v. 56, n. 1, p. 325–332, 2018.

WANG, Y.; CHUN, O.; SONG, W. Plasma and Dietary Antioxidant Status as Cardiovascular Disease Risk Factors: A Review of Human Studies. **Nutrients**, v. 5, n. 8, p. 2969–3004, 2013.

WEI, M. Y.; JACOBSON, T. A. Effects of Eicosapentaenoic Acid Versus Docosahexaenoic Acid on Serum Lipids: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 13, n. 6, p. 474–483, 2011.

WEI, L. et al. LINE-1 Hypomethylation is Associated with the Risk of Coronary Heart Disease in Chinese Population. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 102, n. 5, p. 481–488, 2014.

WEI, L. K. et al. A Potential Epigenetic Marker Mediating Serum Folate and Vitamin B 12

Levels Contributes to the Risk of Ischemic Stroke. **BioMed Research International**, v. 2015, n. 167976, p. 1–4, 2015.

WAHL, S. et al. Epigenomewide association study of body mass index, and the adverse outcomes of adiposity. **Nature**, v. 541, n.7635, p. 81–6, 2017.

WHELTON, S. P. et al. Evaluating the atherogenic burden of individuals with a Friedewald estimated LDL-C <70 mg/dL compared to a novel LDL-C estimation method. **Journal of Clinical Lipidology**, v. 11, n. 4, p. 1065–1062, 2017.

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

WHO – World Health Organization. Obesity and overweight. **Media Centre**. Fact sheet (2016). Disponível em: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/. Acessado em julho 2017.

WIDMER, R. J. et al. The Mediterranean Diet, its Components, and Cardiovascular Disease. **The American Journal of Medicine**, v. 128, n. 3, p. 229–238, 2015.

WONG, S. K. et al. Vitamin E As a Potential Interventional Treatment for Metabolic Syndrome: Evidence from Animal and Human Studies. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, p. 1–12, 2017.

WU, Y. et al. Chicory (*Cichorium intybus* L.) polysaccharides attenuate high-fat diet induced non-alcoholic fatty liver disease via AMPK activation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 886–895, 2018.

YADA, S.; HUANG, G.; LAPSLEY, K. Natural variability in the nutrient composition of California-grown almonds. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 30, n. 2, p. 80–85, jun. 2013.

YANG, T. C. et al. Malondialdehyde mediates oxidized LDL-induced coronary toxicity through the Akt-FGF2 pathway via DNA methylation. **Journal of Biomedical Science**, v. 21, n. 1, p. 1–12, 2014.

ZAID, M.; HASNAIN, S. Plasma lipid abnormalities in Pakistani population: trends, associated factors, and clinical implications. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 51, n. 9, p. 1-9, 2018.

ZALESIN, K. C. et al. Impact of Obesity on Cardiovascular Disease. **Medical Clinics of North America**, v. 95, n. 5, p. 919–937, 2011.

ZAMBON, A. et al. Relationships of different types of event to cardiovascular death in trials of antihypertensive treatment. **Journal of Hypertension**, v. 32, n. 3, p. 495–508, 2014.

ZHANG, Y. et al. Fatty acid binding protein 3 (fabp3) is associated with insulin, lipids and cardiovascular phenotypes often metabolic syndrome through epigenetic modifications is phenotypes of the metabolic syndrome through epigenetic modifications is a Northern European family population. **BMC Medical Genomics**, v. 6, n.9, p. 2- 14, 2013.

ZHANG, S. ET AL. Association between serum homocysteine and arterial stiffness in elderly: a community-based study. **Journal of Geriatric Cardiology**, v. 11, n. 1, p. 32–38, 2014.

ZHANG, N. Epigenetic modulation of DNA methylation by nutrition and its mechanisms in animals. **Animal Nutrition**, v. 1, n. 3, p. 144–151, 2015.

ZHANG, Q. et al. Evaluation of the Anti-Diabetic Activity of Polysaccharide from Cordyceps cicadae in Experimental Diabetic Rats. **Chemistry and Biodiversity**, v. 15, n. 8, p. 1-22, 2018.

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

ZHENG, C. et al. Rapid turnover of apolipoprotein C-III-containing triglyceride-rich lipoproteins contributing to the formation of LDL subfractions. **Journal of Lipid Research**, v. 48, n. 5, p. 1190–1203, 2007.

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

ZOGHBI, H. Y.; BEAUDET, A. L. Epigenetics and Human Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 8, n. 2, p. a019497, 2016.

APÊNDICES

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



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

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

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

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

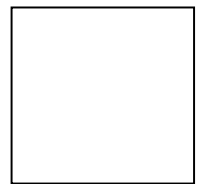
Destacamos neste termo que:

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

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

Participante ou responsável: _____

Profª. Dra. Maria José Carvalho Costa
Responsável pela Pesquisa



Impressão dactiloscópica (polegar direito) Contato:

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

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

APÊNDICE B - Desenho dos Primers

Gene	Primer (F/R)	T _a (°C)	Produto (bp)	Sítios CpG
<i>MTHFR</i>	F 5'- GGTCAGAAGCATATCAGTCATGAG -3' R 5'- CTGGGAAGAAGCTCAGCGAACTCA -3'	58°	213 bp	6
<i>LPL</i>	F 5'- GATGTTGAATATTGAATTATTTTAGTAATA -3' R 5'- AAAAATCACCATACCCAACTAATTTT-3'	63°	235 bp	4
<i>ADRB3</i>	F 5'- TAGGTGATTTGGGAGATTTTTTTT - 3' R 5' - CCCCTAACA ACCCACTAATATTAAC - 3'	60°	238 bp	4

F – Forward; R – Reverse; T_a – Temperature de Anelamento. Sequências dos primers utilizados para amplificação dos genes *MTHFR*, *LPL*, *ADRB3*.

ANEXOS

ANEXO A – Certidão do comitê de ética

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

CERTIDÃO

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

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


Drª Eliane Marques U. Costa
Coordenadora CEP/CCS/UFPB
Mat. SIAPE: 0332618

ANEXO B – Questionário do II DISANDNT/JP

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

INSTITUIÇÕES EXECUTORAS:

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO
NÚCLEO INTERDISCIPLINAR DE ESTUDOS EM SAÚDE E NUTRIÇÃO
SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE – PB
PREFEITURA MUNICIPAL DE JOÃO PESSOA – PB
SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE

COORDENAÇÃO:

Profa. Dra. Maria José de Carvalho Costa
Prof. Dr. Roberto Teixeira Lima

EQUIPE DE PESQUISADORES:

Prof.^a Dr.^a Silvia Franchescinni
Prof.^a Dr. Alcides da Silva Diniz
Prof.^a Dr.^a Darlene Camati Persuhn
Prof.^a Dr.^a Flávia Emília Leite de Lima
Prof.^a Dr Alexandre Silva
Prof. Dr. João Andrade da Silva
Prof.^a Dr.^a Luiza Sônia Rios Asciuti
Prof.^a Dr.^a Maria Amélia Amado Rivera
Prof.^a Dr.^a Maria Conceição Rodrigues Gonçalves
Prof.^a Dr.^a Mônica Maria Osório de Cerqueira
Prof. Dr. Roberto Teixeira Lima
Prof. Dr. Ronei Marcos Moraes
Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio
Prof.^a Dr.^a Rosália Gouveia Filizola
Prof. Dr. Robson Cavalcante Veras
Prof. Msc. Aléssio Tony Cavalcanti de Almeida
Prof. Dr. Ignácio Tavares de Araújo Júnior
Msc. Raquel Patrícia Ataíde Lima

INSTITUIÇÕES FINANCIADORAS:

CONSELHO NACIONAL DE PESQUISA/CNPq
MINISTÉRIO DA SAÚDE/FUNDAÇÃO DE
APOIO À PESQUISA DO ESTADO DA PARAÍBA/FAPESQ-PB
João Pessoa/2014-2015

Informações confidenciais. Garantido o sigilo pessoal.

Caso nº _____ 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
(composição e caracterização da família ou grupo de convivência no momento da pesquisa)

Caso Nº: _____

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

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

ANEXO D – Caracterização Epidemiológica
(Composição e caracterização da família ampliada no momento da pesquisa)

Caso N°: _____

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

Em situação de morbidade referida, descrever a principal, acrescentando **AQUI** as demais, por ordem de gravidade: _____ (*) Para os adultos da família. (**) Para as crianças < de 2 anos de idade. (***) C = cesário, N= normal. P.S.: Identificar com uma circunferência na numeração correspondente, o familiar encaminhado para intervenção, e preencher o formulário específico (pág.13).

ANEXO 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					Preencher as medidas mostrando o álbum de medidas caseiras.
Lanche					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)
Almoço					
					Descrever quantidades de alimentos por preparação: Papas, sopas, macarronada, feijoada, etc. E colocar neste recordatório, perguntado a responsável pela preparação, para quantas pessoas será dividida.
Lanche					
					Descrever neste recordatório se consome chá, caso sim, que tipo de chá, como também quantidade de água e horário.
Jantar					
					Descrever o tipo de cocção: - Fritura -Grelhado -Cozido - Assado
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

Relação direta do estresse oxidativo com concentrações de LDL-C em adultos se mantém pelas equações de Friedewald e de Martin e os níveis de metilação nos genes *MTHFR* e *ADRB3* diferem.

TITULO DA REVISTA: Journal of Clinical Lipidology

ÁREA: Nutrição

QUALIS: A1

INSS: 1933-2874

FATOR DE IMPACTO: 3.58

RESUMO:

A concentração da Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL-C) é padrão de cuidado na prevenção da doença cardiovascular, sendo esta influenciada por diferentes fatores. Este estudo objetivou comparar as concentrações de LDL-C estimadas por duas diferentes equações e avaliou a ocorrência de associação com *status* inflamatório, estresse oxidativo, antropométrico, consumo alimentar e níveis de metilação do DNA nos genes *LPL*, *ADRB3* e *MTHFR*. Estudo transversal de base populacional, com 236 adultos (37,5 anos), de ambos os sexos, do Município de João Pessoa/PB/Brasil. As concentrações de LDL-C foram calculadas segundo as equações de Friedewald e de Martin. Realizou-se análises sobre Níveis de Metilação dos genes *LPL*, *ADRB3* e *MTHFR*, malondealdeído, capacidade antioxidante total, proteína C reativa ultrassensível, alfa-1-glicoproteína ácida, homocisteína, cobalamina, ácido fólico, consumo alimentar habitual, e variáveis epidemiológicas. Para cada unidade de incremento nas concentrações de malondealdeído ocasionou um acréscimo de 6,25 à 10,29 mg/dL nas concentrações de LDL-C ($p < 0,000$). Pela equação de Martin (≥ 70 mg/dL) houve diminuição dos níveis de metilação do DNA no gene *ADRB3* e aumento dos níveis de metilação do DNA no gene *MTHFR* ($p < 0,05$). Verificou-se influência positiva da homocisteína e consumo de colesterol nas concentrações de LDL-C segundo Friedewald e entre circunferência da cintura e idade com base nas duas estimativas. Conclui-se que o malondealdeído foi a única variável que influenciou em todos os modelos, sendo o maior aumento de LDL-C observado no modelo envolvendo o gene *MTHFR*, segundo Friedewald. Relações significativas foram observadas com base nas duas estimativas, e ocorreram quanto à maioria das variáveis. Os níveis de metilação dos genes *ADRB3* e *MTHFR* foram diferentes segundo a equação de Martin, com baixas concentrações de LDL-C (70 mg/dL).

Palavras-Chave: LDL. Metilação de DNA. Malondealdeído. Circunferência da Cintura. Equação de Friedewald. Equação de Martin.

INTRODUÇÃO

Diretrizes do mundo inteiro concentram-se nos pontos de referência do colesterol da Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL-C), por ter sido evidenciado que sua utilização auxilia na prevenção e no tratamento da Doença Cardiovascular (DCV). Muitas dessas diretrizes atribuem o mais alto nível de evidência (classe 1ª) para as metas de tratamento da LDL-C (1-5).

Nesse contexto é importante salientar que a utilidade de metas de tratamento depende da precisão na estimativa utilizada para avaliar as concentrações de LDL-C; neste sentido, a capacidade de um novo cálculo mais preciso - desenvolvido por pesquisadores norte-americanos da Universidade Johns Hopkins em Baltimore - pode permitir a mudança no gerenciamento e melhora da acurácia das concentrações de LDL-C (6).

Conforme resultados de pesquisas recentes, a LDL-C continua sendo rotineiramente estimada pela equação de Friedewald (1-12), a qual, há mais de 40 anos, subsidia diretrizes e gerencia o tratamento da DCV; apesar de já ter sido demonstrado que essa equação tende a

subestimar as concentrações de LDL-C em pacientes com níveis elevados de triglicerídeos, > 200 mg/dL, e LDL-C < que 70 mg / dL (13).

Devido ao elevado custo de avaliação de forma direta (13), a LDL-C estimada com base em Friedewald ainda é o método de cálculo mais usualmente utilizado, na prática clínica e em estudos de base populacional. Quanto a equação de Martin, esta já foi aplicada em estudo com população adulta e observada eficiência a partir da sua comparação com método Direto (ensaio enzimático homogêneo) (14), como também aplicado em estudos com indivíduos que estão em tratamento por apresentar alto risco cardiovascular, tendo como meta terapêutica, a redução das concentrações de LDL-C para < 70mg/dL (6, 15, 16).

Em distúrbios metabólicos, como doença vascular, inflamação, hipercolesterolemia e aumento nas quantidades de LDL nativo, ocorrem modificações na geração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), responsáveis por causar alterações no endotélio, desequilíbrio no metabolismo oxidativo e desacoplamento da L-arginina, provocando aumento na liberação de Oxido Nítrico e na geração de EROs; além de disfunção endotelial e aterogênese (10).

Quanto às relações entre LDL-C, malondealdeído (MDA) e EROS, verificou-se que estes são bastante estudados devido ao fato do MDA ser o principal produto de degradação da peroxidação lipídica, refletindo indiretamente na gravidade de ataque dos radicais livres (17, 18). Observou-se também, em diversos estudos, influência do MDA na LDL-C em diferentes morbidades (19-22).

No que se refere às relações entre Capacidade Antioxidante Total (CAT), homocisteinemia (HCy), Proteína C Reativa (PCR), Alfa-1-Glicoproteína Ácida (AGP), Circunferência da Cintura (CC) e consumo de colesterol, constata-se que, a partir de protocolos metodológicos compostos por diferentes morbidades, ocorreu associação entre estas variáveis com concentrações de LDL-C (11, 23-27).

No que concerne a relação entre as concentrações de LDL-C e níveis de metilação, observa-se que modificações no perfil de metilação podem levar a alterações na expressão enzimática e também podem causar desregulação do metabolismo das gorduras (28), cuja influência de fatores externos, podem regular a transcrição de genes e promover alteração diretamente no código epigenético causando ativação permanente de mediadores inflamatórios chave com produção sustentada de mediadores pró-inflamatórios (29).

Referente à metilação do DNA em genes específicos que estão envolvidos na dislipidemia, ou seja, no aumento ou redução das concentrações de LDL-C (12, 30, 31), destacam-se os genes *LPL*, que codifica a enzima Lipase Lipoproteica (LpL), envolvida na conversão reduzida de VLDL em LDL-C no plasma (32); o gene do receptor beta-adrenérgico

3 (*ADRB3*), que está envolvido na regulação da lipólise e termogênese em tecido adiposo branco e marrom (33); e o gene que codifica a enzima metilenotetrahidrofolato redutase (*MTHFR*), envolvida na conversão da homocisteína (Hcy) em metionina (34), precursora da S-adenosil que atua como doador de grupo metil para a maioria das reações biológicas de metilação (35).

Faz-se pertinente mencionar que não se encontrou, na literatura consultada, estudos que comparem uma ou duas estimativas de cálculo da LDL-C atuando como variáveis dependentes e níveis de metilação dos genes *LPL*, *ADRB3* e *MTHFR*, MDA, CAT e PCR, dentre outras variáveis independentes, em modelos de regressão linear.

Nesse sentido, considerando que as concentrações de LDL-C e suas modificações terapêuticas estão associadas à prevenção e tratamento de DCV, em maior grau do que os níveis dos demais tipos de lipídeos (26), e que a precisão da estimativa do cálculo poderá contribuir para um melhor direcionamento quanto ao gerenciamento da doença acima referida, este estudo teve como objetivo comparar as concentrações de LDL-C estimadas com base nas equações propostas por Friedewald, Levy e Friedrickson (36), e pelo novo método descrito por Martin et al (13) e avaliar a ocorrência de associação com *status* inflamatório, estresse oxidativo, antropométrico, consumo alimentar e níveis de metilação do DNA nos genes *LPL*, *ADRB3* e *MTHFR* em adultos de ambos os sexos.

MATERIAL E MÉTODOS

Caracterização do estudo

Este é um estudo epidemiológico transversal, de base populacional, que envolveu adultos de ambos os sexos na faixa etária de 20 à 59 anos, 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) (37), cuja coleta de dados foi realizada entre maio de 2015 e maio de 2016.

Quanto aos critérios de exclusão, foram retirados da amostra total, indivíduos com ingestão de calorias menor que 700 Kcal (38) e com trigliceridemia acima de 400 mg/dL, além dos critérios referidos nos estudos abaixo referenciados. A amostragem, questões éticas, coleta de dados, CC, consumo alimentar e análises bioquímicas já foram descritos em estudos anteriores (39, 40); com exceção dos níveis de metilação do gene *LPL*. Este estudo foi conduzido de acordo com a Declaração de Helsinki.

Utilizou-se para fins de melhor caracterização da população estudada, o sexo, perfil lipídico e os níveis de metilação dos genes, distribuídos segundo as concentrações de LDL-C estimados -com base na equação de Friedewald e de Martin- e classificados de acordo com o Terceiro Relatório do Painel de Especialistas do *National Cholesterol Education Program* (NCEP), que versa sobre Detecção, Avaliação e Tratamento do Colesterol Elevado em Adultos (ATP III), sendo utilizados os pontos de corte como meta para as concentrações de LDL-C: < 130 mg/dL referente as concentrações próximas ao ótimo, utilizada para indivíduos com baixo risco cardiovascular e como meta de tratamento o valor de < 70 mg/dL, recomendado para indivíduos com alto risco cardiovascular (41).

Estimativa da LDL-C calculada pelas equações de Friedewald e de Martin

O cálculo das concentrações de LDL-C estimado pela equação de Friedewald foi realizado através da fórmula: (colesterol total) - (lipoproteína de alta densidade colesterol [HDL-C]) - (triglicerídeos / 5) em mg / dL (36). Já o cálculo das concentrações estimadas pela equação de Martin, foi realizado através de um aplicativo para uso em smartphone⁴ (6). Essa nova abordagem integra um fator individualizado no denominador para explicar a heterogeneidade no triglicerídeo quanto a elevação da VLDL-C, onde o fator individualizado é escolhido entre 180 possíveis diferentes fatores de acordo com as concentrações de triglicerídeos e não-HDL-C (13).

Risco Cardiovascular

Para a amostra total estimou-se o *score* de risco de Framingham através de calculadora online⁵, que objetiva estimar o risco de cada indivíduo sofrer uma doença arterial coronariana nos próximos 10 anos. A avaliação desse *score* se baseia na seguinte classificação (< 10% Baixo Risco, entre 10 – 20% Risco Moderado e > 20% Risco Alto).

O diagnóstico da Hipertensão Arterial e o uso de medicamentos anti-hipertensivo foi auto referido. Nesse sentido, para os não hipertensos, utilizou-se os valores de pressão sistólica normal (120 mmHg), e para os hipertensos o valor referente a hipertensão sistólica leve (140

⁴ LDL Cholesterol Calculator. Disponível em: <https://www.hopkinsmedicine.org/apps/all-apps/ldl-cholesterol-calculator>. Acesso em: agosto de 2018

⁵Disponível em: (<https://www.framinghamheartstudy.org/fhs-riskfunctions/cardiovascular-disease-10-year-risk/>). Acesso em: maio de 2018

mmHg) e moderada (160 mmHg) (42); respeitando a heterogeneidade da população, quanto as variáveis estudadas (38, 39).

Esse *score* foi estimado para auxiliar na caracterização da amostra quanto ao risco cardiovascular, mas devido ao limite no que diz respeito à ausência dos valores pressóricos não foi incluído nos modelos de regressão.

Análise do Nível de Metilação nos Genes *MTHFR*, *ADRB3* e *LPL*

Para realização das análises, foram obtidas amostras de sangue às 08h 30min horas $\pm$ 10 (min) em todos os indivíduos para evitar um efeito potencial de amostragem. Para fim de isolar o DNA foi utilizando Trizol LS, de acordo com o protocolo descrito e adaptado por Miller; Sa1 e Dykes (43). O DNA genômico foi modificado por bissulfito através do kit de conversão 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 realizados a partir de sequenciamento no software Applied Biosystems 7500 Fast System.

A PCR foi realizada num volume total de 20 μ l contendo: 1x tampão, 4 mM Mg + 2, 200 de cada dNTP (Qiagen), 250 nM de cada iniciador com as sequências dos primers para o genes (descritos no Quadro 1), 5 μ M de SYTO®, 9Dye (INVITROGEN), 1U de polimerase de DNA HotstarTaq (Qiagen) e 1 μ l de DNA genômico convertido com bissulfito. As curvas de fusão, por sua vez, foram normalizadas pelo cálculo da 'linha de melhor ajuste' entre duas regiões de normalização, antes e após a diminuição da fluorescência principal; desse modo, representando a fusão do produto de PCR a partir do uso do software fornecido com o HRM, PCR em tempo real (39).

QUADRO 1. Desenho dos Primers

GENE	PRIMERS (F/R)	T _A (°C)	PRODUTO (BP)	SÍTIOS CPG
<i>MTHFR</i>	F 5'- GGTCAGAAGCATATCAGTCATGAG -3'	58°	213 bp	6
	R 5'- CTGGGAAGAACTCAGCGAACTCA -3'			
<i>LPL</i>	F 5'- GATGTTGAATATTGAATTATTTAGTAATA -3'	63°	235 bp	4
	R 5'- AAAAATCACCATACCCAACTAATTTT-3'			
<i>ADRB3</i>	F 5'- TAGGTGATTTGGGAGATTTTTTTT - 3'	60°	238 bp	4
	R 5'- CCCCTAACA ACCCACTAATATTAAC - 3'			

F – Forward; R – Reverse; T_a – Temperatura de Anelamento.

Análise Estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o *software* R, 3.3.2 (42). Inicialmente, a caracterização da amostra foi realizada utilizando medidas como frequência simples, percentual, medidas de tendência central e dispersão. Em seguida, foi realizado o teste de proporções para verificar se havia diferença entre a proporção de indivíduos com LDL-C menor e maior igual a 130 mg/dL, e menor e maior igual que 70 mg/dL e a variável sexo.

Os dados foram testados quanto à presença de normalidade por meio do teste de Lilliefors, que é uma derivação do teste de Kolmogorov-Smirnov. Além disso, para verificar se havia diferença, em média, das variáveis Colesterol Total (CT), HDL, Triglicerídeos, Níveis de Metilação do Gene *LPL*, Níveis de Metilação do Gene *ADRB3* e Níveis de Metilação do Gene *MTHFR*, segundo as classes “LDL até 130 mg/dL”, “LDL igual ou maior que 130 mg/dL”, “LDL até 70 mg/dL”, e “LDL igual ou maior que 70 mg/dL”, tanto pela equação de Friedewald quanto por Martin, utilizou-se o teste-t de comparação de médias, e o teste de Mann-Whitney de comparação de medianas, quando o tamanho da subamostra foi pequeno.

Para verificar se houve relações significativas entre as concentrações de LDL-C, estimados por Friedewald e por Martin, e os níveis de metilação dos genes *LPL*, *MTHFR* e *ADRB3* e as demais variáveis deste estudo, foram propostos os modelos de regressão linear abaixo descritos:

Modelo 1: $\mu(\text{LDL Friedewald}) = \beta_0 + \beta_1 \text{Níveis de Metilação do Gene } LPL + \beta_2 \text{MDA} + \beta_3 \text{CAT} + \beta_4 \text{PCR} + \beta_5 \text{AGP} + \beta_6 \text{HCy} + \beta_7 \text{B12} + \beta_8 \text{Folato};$

Modelo 3: $\mu(\text{LDL Friedewald}) = \beta_0 + \beta_1 \text{Níveis de Metilação do Gene } LPL + \beta_2 \text{Carboidratos} + \beta_3 \text{Proteínas} + \beta_4 \text{Lipídios} + \beta_5 \text{Vitamina A} + \beta_6 \text{Gorduras Monoinsaturadas} + \beta_7 \text{B12} + \beta_8 \text{Ácido Oleico} + \beta_9 \text{Ômega 3} + \beta_{10} \text{Ômega 6} + \beta_{11} \text{Gorduras Saturadas} + \beta_{12} \text{Colesterol} + \beta_{13} \text{Gorduras Poli-insaturadas} + \beta_{14} \text{Gorduras Trans} + \beta_{15} \text{Vitamina C} + \beta_{16} \text{Vitamina E} + \beta_{17} \text{Betacaroteno} + \beta_{18} \text{Selênio} + \beta_{19} \text{Folato};$

Modelo 5: $\mu(\text{LDL Friedewald}) = \beta_0 + \beta_1 \text{Níveis de Metilação do Gene } LPL + \beta_2 \text{Sexo} + \beta_3 \text{Idade} + \beta_4 \text{Renda} + \beta_5 \text{Atividade Física} + \beta_6 \text{Tabagismo} + \beta_7 \text{Consumo de Alcool} + \beta_8 \text{CC} + \beta_9 \text{Fármacos hipolipemiantes} + \beta_{10} \text{Ômega 6} + \beta_{11} \text{Morbidades Relacionadas a doenças cardiovasculares}.$

Os mesmos modelos propostos para a equação de Friedewald foram também propostos para equação de Martin (modelos 2,4,6) e para os genes *ADRB3* e *MTHRF*. Para todas as análises acima apresentadas, o nível de significância adotado foi de 5%.

RESULTADOS

O estudo foi composto por 236 indivíduos adultos, sendo 158 (67%) do sexo feminino e 78 do sexo masculino (33%), com mediana da idade de 37,5 anos.

Houve diferença significativa ($p = 0,003$) entre as concentrações médias de LDL-C, pelas equações de Friedewald e de Martin, na amostra total, com concentrações de LDL-C de 107,24 mg/dL e 117,81mg/dL, respectivamente.

Dos 236 indivíduos do presente estudo, 83% e 92% apresentaram LDL-C ≥ 70 mg/dL e 25% e 33% apresentaram LDL-C ≥ 130 mg/dL segundo Friedewald e Martin, respectivamente.

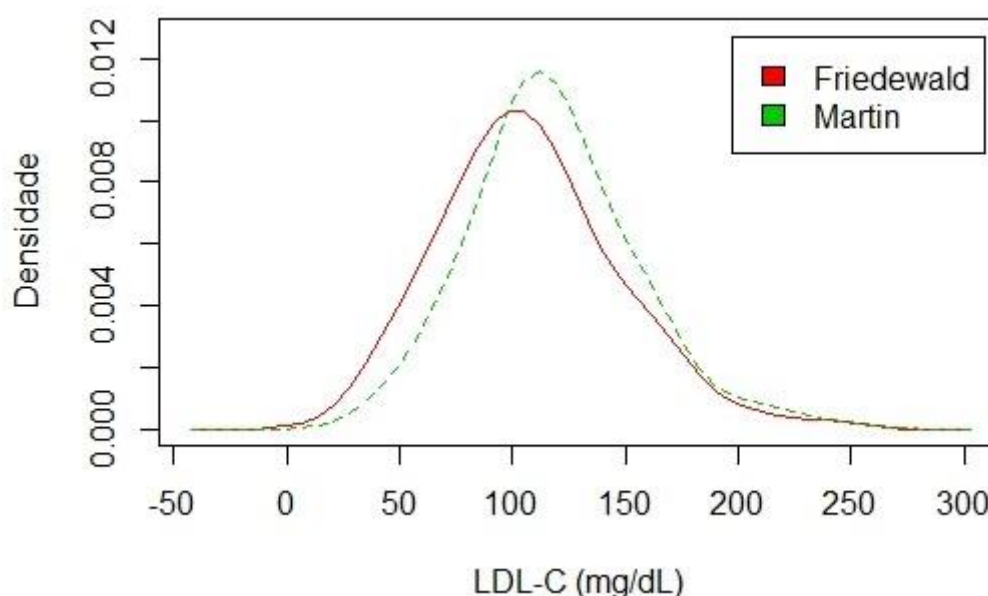


Figura 1. Curvas de densidades das concentrações de LDL-C distinguidas por métodos de cálculo.

Observa-se na Figura 1 que a curva da densidade da LDL-C, calculada pela equação de Friedewald, é um pouco mais dispersa que pelo método de Martin, isto também pode ser verificado pelo desvio padrão estimado, que foi de 39.31 para a LDL-C (Friedewald) e 36.49 para a LDL-C (Martin). De acordo com o teste não paramétrico Mann-Whitney, houve

diferença significativa entre as concentrações de LDL-C distinguidos por método de cálculo, isso à 1% de significância ($W = 23.062$, p -valor = 0.001).

Tabela 1. Características da amostra quanto ao sexo, perfil lipídico e níveis de metilação dos genes *LPL*, *ADRB3* e *MTHFR*, segundo diferentes estimativas e pontos de corte das concentrações de LDL-C.

Perfil Lipídico	Média	DP	LDL-C F (mg/dL) < 130 < 70	LDL-C F (mg/dL) ≥130 ≥70	P-valor	LDL M (mg/dL) <130 <70	LDL-C M (mg/dL) ≥130 ≥70	P-valor
Sexo feminino	-	-	117 (50%)	41 (17%)	>0,000 ^{*a}	105 (45%)	53 (22%)	0,000 ^{*a}
			24 (10%)	134(56,8)	>0,000 ^{*a}	13 (5%)	145(61%)	0,000 ^{*a}
Sexo masculino	-	-	61 (26%)	17 (7%)	>0,000 ^{*a}	55 (23%)	23 (10%)	>0,000 ^{*a}
			17 (7%)	61 (25,8%)	>0,000 ^{*a}	6 (2 %)	72 (30%)	>0,000 ^{*b}
Colesterol Total (mg/dL)	186,4	42,1	169,98 ± 28,32	236,60 ± 37,30	>0,000 ^{*b}	164,39 ± 24,69	232,60 ± 32,40	>0,000 ^{*b}
			139,29 ± 24,26	196,25 ± 38,13	>0,000 ^{*b}	121,84 ± 13,49	192,00 ± 38,86	>0,000 ^{*b}
HDL (mg/dL)	43,78	11	43,45 ± 11,19	44,78 ± 10,43	0,413 ^b	43,36 ± 11,62	44,67 ± 9,59	0,360 ^b
			40,90 ± 13,67	44,38 ± 10,29	0,129 ^b	46,37 ± 13,71	43,55 ± 10,74	0,394 ^b
Triglicerídeos (mg/d)	138,8	73,7	132,12 ± 69,19	159,38 ± 83,43	0,027 ^{*b}	129,33 ± 70,12	158,80 ± 77,47	0,124 ^b
			142,37 ± 85,15	138,07 ± 71,29	0,764 ^b	115,89 ± 64,34	140,83 ± 74,26	0,124 ^b
Níveis de Metilação do Gene <i>LPL</i> (%)	36%	19%	36% ± 20%	36% ± 17%	0,901 ^b	36% ± 19%	37% ± 18%	0,632 ^b
			34% ± 18%	38% ± 19%	0,430 ^b	37% ± 23%	36% ± 19%	0,919 ^b
Níveis de Metilação do Gene <i>ADRB3</i> (%)	41%	18%	42% ± 18%	38% ± 17%	0,098 ^b	43% ± 18%	39% ± 18%	0,151 ^b
			43% ± 19%	41% ± 18%	0,452 ^b	52% ± 19%	40% ± 18%	0,010 ^{*c}
Níveis de Metilação do Gene <i>MTHFR</i> (%)	35%	18%	34% ± 18%	36% ± 17%	0,487 ^b	34% ± 18%	36% ± 18	0,381 ^b
			31% ± 16%	36% ± 18%	0,165 ^b	26% ± 10%	36% ± 18%	0,031 ^{*c}

Legenda : a: teste para proporções; b : teste t; *: resultados significativos; c: teste de Mann-Whitney; -: o cálculo não se aplica ou não faz sentido; F: Friedewald; M: Martin; LDL-C: Colesterol de Lipoproteína de Baixa Densidade.

Conforme observado na Tabela 1, indivíduos do sexo feminino apresentaram maior proporção de concentrações de LDL-C menor que 130mg/dL. Resultados similares foram observados para as concentrações médias de colesterol total e triglicerídeos.

Houve diferença das distribuições, entre os níveis de metilação do gene *ADRB3* ($p = 0,010$), e entre os níveis de metilação do gene *MTHFR* ($p = 0,031$) segundo o teste de Mann-

Whitney, para concentrações classificadas segundo ponto de corte de 70 mg/dL (Tabela 1).

Na amostra total, 14% dos indivíduos eram hipertensos e após o cálculo do *score* de Framingham - utilizando o valor hipotético de 160 mmHg (hipertensão moderada) - observou-se que 82% apresentaram risco leve, 13% apresentaram risco moderado e 5% apresentaram risco alto. Todavia, ao utilizar, para o cálculo do *score* de Framingham, o valor de 140 mmHg (hipertensão leve), verificou-se que 89% apresentaram risco leve, 8% apresentaram risco moderado e 3% apresentaram risco alto. E quando aplicou-se o valor correspondente da pressão arterial normal de 120 mmHg, excluindo-se para o cálculo os hipertensos auto referidos da amostra total, 93% dos indivíduos apresentaram risco leve, 6% risco moderado e 0,5% risco alto.

Tabela 2. Relação entre as concentrações de LDL-C estimadas com base nas equações de Friedewald e de Martin com níveis de metilação dos genes *LPL*, *ADRB3*, *MTHFR*, estresse oxidativo, valores plasmáticos de vitamina B12 e folato.

Modelo 1 - Variável Resposta : LDL-C Equação de Friedewald						
Variáveis do Estudo	Coefficiente <i>LPL</i>	p-Valor	Coefficiente <i>ADRB3</i>	p-Valor	Coefficiente <i>MTHFR</i>	p-Valor
Intercepto	75,13	>0,000	75,13	>0,000	72,99	>0,000
Gene (%)	11,10	0,408	11,10	0,426	19,17	0,201
MDA (nmol/L)	10,06	0,000 *	10,06	0,000*	10,29	0,000*
CAT (%)	10,17	0,566	10,17	0,55	7,02	0,693
PCR (mg/L)	-1,10	0,143	-1,10	0,117	-1,18	0,115
AGP (mg/dL)	0,03	0,814	0,03	0,875	0,02	0,903
Hcy (mol/L)	0,55	0,040*	0,55	0,040*	0,56	0,038*
Vitamina B12 (pg/ml)	-0,03	0,145	-0,03	0,152	-0,03	0,153
Ácido Fólico (ng/ml)	-0,01	0,599	-0,01	0,531	-0,00	0,962
Modelo 2 - Variável Resposta : LDL- C Equação de Martin						
Intercepto	100,20	>0,000	109,70	>0,000	96,48	>0,000
Gene (%)	6,61	0,604	-15,52	0,247	18,04	0,205
MDA (nmol/L)	6,37	0,020*	6,25	0,022*	6,57	0,016*
CAT (%)	1,14	0,946	2,4	0,887	-1,53	0,928
PCR (mg/L)	-0,86	0,230	-0,924	0,195	-0,91	0,199
AGP(mg/dL)	0,09	0,487	0,09	0,508	0,08	0,535
Hcy (mol/L)	-0,12	0,638	-0,11	0,663	-0,11	0,665
Vitamina B12 (pg/ml)	-0,02	0,284	-0,02	0,278	-0,02	0,286
Ácido Fólico (ng/ml)	0,00	0,973	-0,00	0,899	0,01	0,637

Legenda: *: p < 0,005; LDL-C: Colesterol de Lipoproteína de Baixa Densidade; AGP: Alfa-1-glicoproteína ácida; Hcy : Homocisteína; MDA: Malondialdeído; PCR: Proteína C-reativa.

Conforme descrito na tabela 2, considerando os níveis de metilação dos genes *LPL* e *ADRB3*, observa-se que as variáveis MDA e HCy influenciaram positivamente de forma similar na variável LDL-C, estimada segundo Friedewald. A cada nmol/L de MDA, a LDL-C Friedewald aumenta, em média, 10,06 mg/dL e a cada mol/L na variável HCy, a LDL Friedewald aumenta, em média, 0,55 mg/dL. Em relação a equação de Martin com esses mesmos genes, observa-se que a variável MDA também influenciou positivamente na variável LDL-C, e a cada nmol/L de MDA, a LDL-C estimada pela equação de Martin aumenta, em média, 6,37 mg/dL e 6,25 mg/dL, respectivamente.

Em adição ao exposto na tabela 2, com níveis de metilação do gene *MTHFR* como uma das variáveis independentes, observa-se que a cada nmol/L de MDA, a LDL- C Friedewald aumenta, em média, 10,29 mg/dL e a cada mol/L de HCy, a LDL- C Friedewald aumenta, em média, 0,56 mg/dL. Já de acordo com a equação de Martin, com esse mesmo gene, verifica-se que a variável MDA influenciou positivamente na variável LDL- C e a cada nmol/L de MDA, a LDL-C aumenta, em média 6,57 mg/dL.

TABELA 3. Relação entre as concentrações de LDL-C estimadas com base na equação de Friedewald e de Martin com níveis de metilação do gene *LPL*, *ADRB3*, *MTHFR* e consumo alimentar habitual.

Modelo 3 - Variável Resposta : LDL- C Friedewald				
Variáveis do Estudo	Coefficiente	SI- SL (95%)	Estatística z	p-Valor
Intercepto	109,10	98,16 ± 120,04	9,97	>0,000
Gene <i>LPL</i> (%)	10,85	-2,83 ± 24,53	0,79	0,428
Colesterol (mg)	0,03	0,02 ± 0,05	2,15	0,033*
Variável Resposta - LDL- C Friedewald				
Intercepto	116,50	104,97 ± 128,03	10,10	>0,000
Gene <i>ADRB3</i> (%)	-8,93	-23,73 ± 5,87	-0,60	0,547
Colesterol (mg)	0,03	0,02 ± 0,05	2,12	0,035*
Variável Resposta - LDL- C Friedewald				
Intercepto	109,30	98,00 ± 120,60	9,68	> 0,000
Gene <i>MTHFR</i> (%)	10,02	-5,42 ± 25,46	0,65	0,517
Colesterol (mg)	0,03	0,02 ± 0,05	2,05	0,042*

Legenda: *: $p < 0,005$; LDL-C: Colesterol de Lipoproteína de Baixa Densidade; SI: Limite Inferior; LS: Limite Superior; Modelo ajustado para o consumo dos demais nutrientes que foram incluídos no modelo explicativo.

Houve influência positiva do consumo de colesterol nas concentrações de LDL-C calculados conforme Friedewald, a partir do Modelo 3, que tem como variável independente os

níveis de metilação dos genes *LPL*, *ADRB3* e *MTHFR* (Tabela 3).

TABELA 4. Relação entre as concentrações de LDL-C estimadas com base na equação de Friedewald e de Martin com níveis de metilação do gene *LPL*, *ADRB3*, *MTHFR*, com variáveis demográficas, epidemiológicas, de estilo de vida e antropométrica.

Modelo 6 - Variável Resposta - LDL-C Martin				
Variáveis do Estudo	Coefficiente	SI- SL (95%)	Estatística z	p-Valor
Intercepto	26,70	7,63 ± 45,77	1,40	0,163
Gene <i>LPL</i>	3,16	-8,61 ± 14,93	0,27	0,789
Idade	0,80	0,59 ± 1,01	3,86	0,000*
Circunferência da Cintura	0,51	0,35 ± 0,67	3,21	0,001*
Modelo 5 - Variável Resposta : LDL-C Friedewald				
Intercepto	42,35	19,96 ± 64,74	1,89	0,060
Gene <i>ADRB3</i>	-1,42	-15,92 ± 13,08	-0,10	0,922
Idade	0,50	0,26 ± 0,73	2,11	0,036*
Circunferência da Cintura	0,42	0,24 ± 0,60	2,33	0,020*
Modelo 6 - Variável Resposta : LDL-C Martin				
Intercepto	32,47	12,83 ± 52,11	1,65	0,100
Gene <i>ADRB3</i>	-9,42	-22,14 ± 3,30	-0,74	0,460
Idade	0,80	0,59 ± 1,01	3,87	0,000*
Circunferência da Cintura	0,51	0,35 ± 0,67	3,20	0,002*
Modelo 5 - Variável Resposta : LDL-C Friedewald				
Intercepto	36,87	15,15 ± 58,59	1,70	0,091
Gene <i>MTHFR</i>	14,00	-0,39 ± 28,39	0,97	0,331
Idade	0,51	0,27 ± 0,75	2,17	0,031*
Circunferência da Cintura	0,41	0,23 ± 0,60	2,28	0,023*
Modelo 6 - Variável Resposta - LDL-C Martin				
Intercepto	24,20	5,11 ± 43,29	1,27	0,206
Gene <i>MTHFR</i>	10,58	-2,06 ± 23,22	0,84	0,404
Idade	0,81	0,60 ± 1,02	3,90	0,000*
Circunferência da Cintura	0,51	0,35 ± 0,67	3,18	0,002*

Legenda: *p<0,005; LDL-C: Colesterol de Lipoproteína de Baixa Densidade; SI: Limite Inferior; LS: Limite Superior; Modelo ajustado para variáveis demográficas, epidemiológicas, de estilo de vida e antropométrica que foram incluídas no modelo explicativo; LDL-C: Colesterol de Lipoproteína de Baixa Densidade.

Adicionalmente, observou-se uma relação positiva entre idade e CC com concentrações de LDL-C baseada nas duas estimativas de LDL-C nos Modelos 5 e 6, excetuando o Modelo 5, que tem como uma das variáveis independentes os níveis de metilação do gene *LPL* e as concentrações de LDL-C, calculados com base em Friedewald (Tabela 4).

DISCUSSÃO

As concentrações de LDL-C variaram em função das equações que estimam seus

valores, tanto para equação de Friedewald quanto para a equação de Martin, sendo diferentes estatisticamente. Nesse sentido, o presente estudo de base populacional, identificou que existe distinção da dimensão do problema, pois as concentrações de LDL-C variam em função do método utilizado.

Desde o início, as imprecisões da fórmula quanto aos níveis de triglicerídeos > 400 mg / dL (níveis observados em 1% da população do presente estudo), foram reconhecidas por Friedewald; Levy e Fredrickson (36). No entanto, mesmo quando os níveis de triglicérides estão abaixo de 400 mg/dL, estudiosos sugeriram que a LDL-C, calculado pela fórmula de Friedewald, subestima as concentrações de LDL-C, corroborando com os dados encontrados no presente estudo, em que a média da LDL-C da amostra total foi de 107,24 e 117, 81 mg/dL segundo Friedewald e Martin. Portanto, as concentrações segundo Friedewald podem classificar erroneamente o risco de DCV, particularmente em indivíduos com níveis elevados de triglicerídeos ≥ 200 mg/dL (níveis observados em 18% da população do presente estudo, que apresentaram risco cardiovascular leve) (6,13).

O único artigo encontrado na literatura consultada, comparando os níveis de LDL-C, originados das duas estimativas utilizadas, em uma população adulta, não pôde ser comparado com os resultados do presente estudo, pois os objetivos foram diferentes, considerando que não foram realizadas comparações entre as duas equações, e sim entre os resultados destas, em relação ao método direto (14). No entanto, é importante destacar que Lee et al. (14) observaram que a equação de Martin exibiu uma concordância geral significativamente maior na classificação da diretriz NCEP-ATP III em relação a equação de Friedewald com valores de 82,0% e 78,2%, respectivamente.

Na análise de regressão multivariada observou-se que o MDA foi a única variável que influenciou positivamente nas concentrações de LDL-C, calculados com base nas equações de Friedewald (36), e de Martin et al. (13), em todos os modelos multivariados analisados e compostos por variáveis independentes como níveis de metilação dos genes *LPL*, *ADRB3* e *MTHFR*, estresse oxidativo, inflamação, obesidade abdominal, consumo alimentar e variáveis epidemiológicas. Ademais, constatou-se relação positiva entre consumo de HCy e colesterol nas concentrações de LDL-C, calculados de acordo com Friedewald em todos os modelos.

Verificou-se ainda relação entre idade e CC com as concentrações de LDL-C, calculados com base nas duas equações, com exceção do modelo que incluiu como variável independente os níveis de metilação do gene *LPL* e variável dependente a LDL-C, calculado com base na equação de Friedewald (36).

Logo, este estudo é inédito no tocante a identificação de relações e análise da influência de variáveis como a metilação dos genes *LPL*, *ADRB3* e *MTHFR*, estresse oxidativo, inflamação, obesidade abdominal, consumo alimentar e variáveis epidemiológicas, nas concentrações de LDL-C, estimadas por diferentes equações.

No presente estudo, 50% dos indivíduos não apresentavam morbidades, 17% apresentavam mais de uma morbidade e 33% uma morbidade, e a maioria dos indivíduos apresentaram níveis de metilação entre 35% a 41%. Identificaram-se diferenças nos valores dos níveis de metilação dos genes *MTHFR* e *ADRB3*, somente com as concentrações de LDL-C estimadas segundo Martin e no ponto de corte de 70 mg/dL. Neste sentido, provavelmente menores concentrações de LDL-C sejam consideradas mais sensíveis para apresentar diferenças entre níveis de metilação, uma vez que essas diferenças não foram observadas no ponto de corte de 130 mg/dL. Desse modo, necessitando que novos estudos, com diferentes pontos de corte, sejam efetuados para fundamentar melhor esses resultados.

Quanto ao gene *ADRB3*, não foi encontrado estudos com indivíduos com as mesmas características da população analisada, mas foram encontrados dois estudos em indivíduos com hipercolesterolemia familiar e excesso de peso, cujos valores da metilação deste gene, no sangue, foram relacionados as concentrações de LDL-C (30,39). Na hipercolesterolemia, os níveis de metilação médio do gene *ADRB3*, foram inversamente correlacionados com os níveis de LDL-C (30); e em mulheres com excesso de peso, com maior ingestão de gorduras monoinsaturadas e poliinsaturadas proveniente do óleo de avelã apresentaram os menores níveis de metilação do gene *ADRB3* e as maiores reduções na CC e na LDL-C (39). Em consequente, pôde-se afirmar, no presente estudo, que com concentrações de LDL-C $\geq$ 70 mg/dL, os níveis de metilação deste gene diminuíram.

Já em relação ao gene *MTHFR*, esse resultado foi inverso. Na literatura consultada, a hipermetilação do gene *MTHFR* foi associada à um maior nível de CT e LDL-C em indivíduos diabéticos (31), e no estudo de dos Santos Nunes et al. (28) as relações entre o CT e LDL-C com o perfil hipermetilado do gene *MTHFR* foram obtidas em pacientes que possuíam perfis clínicos bem definidos, não sendo identificadas em pacientes sem Neuropatia Diabética e em diabéticos sem complicações.

No que corresponde aos níveis de metilação do gene *LPL*, no presente estudo não foi encontrado relação entre os níveis de metilação deste gene com as concentrações de LDL-C, corroborando com estudos realizados a partir de análises no tecido adiposo visceral de indivíduos com Síndrome Metabólica (12), em leucócitos de indivíduos com

hipercolesterolemia familiar (45), e na placenta de gestantes com diabetes mellitus gestacional (46), logo também em indivíduos com diagnósticos clínicos definidos.

No que diz respeito ao MDA, frequentemente utilizado como um biomarcador do estresse oxidativo (23), no presente estudo verificou-se que 12 % da população total apresentaram MDA elevado, e 25 % e 33% LDL-C elevado (> 130 mg/dL), segundo Friedewald e Martin, respectivamente. Logo, mesmo com um percentual inferior a 15% da população apresentando valores de MDA elevados; esses valores provavelmente já podem interferir no perfil lipídico, elevando as concentrações de LDL-C nos modelos analisados na população estudada, com 75% a 67% das concentrações de LDL-C adequadas, segundo as duas equações utilizadas.

Em um ensaio clínico denominado *Veterans Affairs Diabetes Trial*, no qual investigou-se associação entre MDA e diabetes mellitus, observou-se que os níveis de MDA e LDL, em complexos imunes circulantes, podem prever a ocorrência de infarto do miocárdio, além de eventos cardiovasculares agudos em pacientes com diabetes tipo 2 (47). No entanto, o mecanismo preciso pelo qual o MDA pode estar causando essa citotoxicidade endotelial não é conhecido (23).

Ainda quanto a relação entre MDA e LDL-C, vários estudiosos demonstraram que os valores de MDA e da LDL-C diminuem com intervenções a partir do consumo de diferentes alimentos, em modelos animais (21, 22, 27).

No que se refere as demais variáveis deste estudo, considerando que a inflamação vascular é um mecanismo fundamental na progressão da aterosclerose e síndromes coronarianas agudas (48), a PCR destaca-se como biomarcador de inflamação, sendo recomendada como fator de avaliação de risco secundário na tomada de decisão do tratamento (49, 50); em particular no que se refere ao tratamento de colesterol no sangue (51,52). No entanto, devido possivelmente aos valores médios de PCR se manterem nos valores de referência na maioria da população (81%), essa variável não influenciou nas concentrações de LDL-C.

Em relação a HCy, a inclusão como variável se deve ao fato do seu aumento ter como principal alvo, o endotélio vascular, o qual promove a lesão endotelial estrutural (53). Existem vários mecanismos propostos para explicar a associação entre HCy e Doença Arterial Coronariana, que inclui a estimulação da oxidação da LDL-C (54, 55). No presente estudo, 14% dos indivíduos apresentaram valores acima da faixa de referência, mas já pode ter sido suficiente para interferir no aumento das concentrações de LDL-C de forma significativa.

Quanto aos valores de Triglicerídeos, Ference et al. (56) destacaram que o benefício clínico de reduzir os níveis de triglicerídeos é diretamente semelhante ao benefício clínico de

reduzir os níveis de LDL-C por unidade de mudança em ApoB e ambos são associados com menor risco de doença cardiovascular. No presente estudo, os valores de triglicerídeos aumentaram de forma significativa em função da elevação nas concentrações de LDL-C. Mais estudos são necessários para justificar porque só houve diferença entre os valores de triglicerídeos quando distribuídos nos pontos de corte entre < 130 mg/dL e ≥ 130 mg/dL da LDL-C segundo Friedewald.

Acerca da relação entre as variáveis demográficas, antropométricas e epidemiológicas, verificou-se influência positiva da idade, consumo habitual de colesterol e CC. Na literatura, observa-se que, há bastante tempo, a idade avançada e sexo masculino são fatores de risco, bem estabelecidos, para a DCV (57- 60).

No que diz respeito ao consumo de colesterol, no estudo de Retterstøl et al. (61), observaram que o consumo da dieta rica em gordura (70,8 %) elevou as concentrações de LDL-C no grupo experimental; entretanto, já no grupo controle (com 29 % de gordura) não houve diferença significativa. No presente estudo, mesmo o consumo de gordura total apresentando-se na faixa de referência (29%) (58), e consumo habitual de colesterol de 243,51mg, identificou-se influência desse consumo nas concentrações de LDL-C. A explicação para esta alteração pode levar em consideração o tipo de gordura consumida.

A gordura saturada, que faz parte do consumo habitual dessa população é boa fonte de ácidos graxos saturados aterogênicos; dentre esses citamos o óleo de coco, que é rico em ácido graxo láurico, e a manteiga, que é fonte de ácido graxo mirístico e palmítico (42).

A CC têm associação com DCV (62), e a compreensão quanto às mudanças na LDL-C com o aumento da CC pode ajudar a antecipar a redução da LDL-C, resultado que pode ser alcançado através da perda de peso. Quanto às justificativas para a relação LDL-C versus CC, várias hipóteses foram discutidas; sendo diferentes para valores acima ou abaixo dos pontos de inflexão encontrado na população quanto à CC segundo Laclaustra et al. (11).

No presente estudo, não se analisou a CC por pontos de inflexão, como no estudo anteriormente citado, inviabilizando dessa forma comparações com o mesmo. Nesse sentido, só podemos inferir que de acordo com a variável sexo, masculino e feminino, a população do presente estudo classificou-se entre 85 % e 59% abaixo e 14% e 39%, acima dos valores de referência da CC, respectivamente.

Destaca-se, como limitações deste estudo, a ausência dos valores de pressão arterial, se fazendo pertinente mencionar que, dentre os cinco estudos mais importantes realizados na última década no Brasil, dois desses utilizaram para o cálculo da prevalência de hipertensão a informação auto referida (42). Como pontos fortes, o aspecto inédito em relação à identificação

e análise das relações entre as concentrações de LDL-C estimadas com base em diferentes equações e a inclusão dos níveis de metilação dos genes *LPL*, *ADRB3* e *MTHFR*, como variável independente.

CONCLUSÃO

Fundamentados nas equações de Friedewald e de Martin, conclui-se que as concentrações de LDL-C calculados por essas duas estimativas de cálculo, foram diferentes, sendo os valores da equação de Friedewald estatisticamente menores que o obtido pela equação de Martin.

O MDA foi a variável que mais influenciou positivamente nas concentrações de LDL-C estimadas, em todos os modelos multivariados compostos por variáveis sobre níveis de metilação dos genes *LPL*, *ADRB3* e *MTHFR*, estresse oxidativo, inflamação, obesidade abdominal, consumo alimentar e variáveis epidemiológicas.

Quanto à influência das variáveis idade e CC nas concentrações de LDL-C, calculados com base nas duas equações, observou-se relação positiva em todos os modelos; com exceção do modelo que apresenta dentre as variáveis independentes, os níveis de metilação do gene *LPL* e as concentrações de LDL-C calculados com base em Friedewald. Verificou-se mais duas influências positivas nas concentrações de LDL-C, somente com base em Friedewald, referentes à HCy e consumo de colesterol.

Os níveis de metilação dos genes *ADRB3* e *MTHFR* foram diferentes quando originados pela equação de Martin; utilizando como ponto de corte, menores concentrações de LDL-C.

Mais estudos são necessários para justificar porque algumas relações só ocorreram com base nas concentrações de LDL-C estimado pela equação de Friedewald, como também para os níveis de metilação, que só foram diferentes quando comparados as concentrações de LDL-C no menor ponto de corte com base na equação de Martin.

Conflitos de Interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Colaboradores

-Jéssica Vicky Bernardo de Oliveira, Rafaella Cristhine Pordeus Luna, Raquel Patrícia Ataíde Lima, Sônia Cristina Pereira de Oliveira Ramalho Diniz, participaram da aquisição de dados;

- Jéssica Vicky Bernardo de Oliveira, Maria José de Carvalho Costa, Aléssio Tony Cavalcanti de Almeida, Flávia Emília Leite de Lima Ferreira, Alcides da Silva Diniz, Darlene Camati Persuhn, Roberto Texeira de Lima, Alexandre Sérgio Silva, participaram da concepção e desenho do estudo;

-Jéssica Vicky Bernardo de Oliveira, Alcides da Silva Diniz, Naila Francis Paulo de Oliveira, Maria da Conceição Rodrigues Gonçalves, Alexandre Sergio Silva, Rafaella Cristhine Pordeus Luna, Raquel Patrícia Ataíde Lima, Sônia Cristina Pereira de Oliveira Ramalho Diniz, elaboração do artigo ou revisão crítica para conteúdo intelectual importante;

-Jéssica Vicky Bernardo de Oliveira, Ana Hermínia Andrade e Silva participou na análise e interpretação de dados.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer as agências de financiamento que permitiram a realização projeto (Conselho Nacional Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Ministério da Saúde e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ, PB, Brasil); e aos colaboradores da pesquisa (Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, Universidade da Paraíba).

REFERÊNCIAS

1. Grundy SM, Arai H, Barter P, Bersot TP, Betteridge DJ, Carmena R, et al. An International Atherosclerosis Society Position Paper: Global recommendations for the management of dyslipidemia-Full report. *J Clin Lipidol*. 2014;8(1):29–60.
2. Jacobson TA, Ito MK, Maki KC, Orringer CE, Bays HE, Jones PH, et al. National Lipid Association Recommendations for Patient-Centered Management of Dyslipidemia: Part 1—Full Report. *J Clin Lipidol*. 2015;9(2):129–69.
3. Catapano AL, Graham I, de Backer G, Wiklund O, Chapman MJ, Drexel H, et al. 2016 ESC/EAS Guidelines for the Management of Dyslipidaemias. *Rev Española Cardiol*. 2017;70(2):115.
4. Jellinger PS, Handelsman Y, Rosenblit PD, Bloomgarden ZT, Fonseca VA, Garber AJ, et al. American association of clinical endocrinologists and american college of endocrinology guidelines for management of dyslipidemia and prevention of cardiovascular disease. *Endocr Pract*. 2017;23(Supplement 2):1–87.

5. Arnett DK, Blumenthal RS, Albert MA, Buroker AB, Goldberger ZD, Hahn EJ, et al. 2019 ACC/AHA Guideline on the Primary Prevention of Cardiovascular Disease: Executive Summary. *J Am Coll Cardiol*. 2019;19:33876–8.
6. Sathiyakumar V, Park J, Quispe R, Elshazly MB, Michos ED, Banach M, et al. Impact of Novel Low-Density Lipoprotein-Cholesterol Assessment on the Utility of Secondary Non-High-Density Lipoprotein-C and Apolipoprotein B Targets in Selected Worldwide Dyslipidemia Guidelines. *Circulation*. 2018;138(3):244–54.
7. Kishimoto Y, Taguchi C, Suzuki-Sugihara N, Saita E, Usuda M, Wang W, et al. The Effect of the Consumption of Egg on Serum Lipids and Antioxidant Status in Healthy Subjects. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2016;62(5):361–5.
8. Chiu H-F, Huang Y-C, Lu Y-Y, Han Y-C, Shen Y-C, Golovinskaia O, et al. Regulatory/modulatory effect of prune essence concentrate on intestinal function and blood lipids. *Pharm Biol*. 2017;55(1):974–9.
9. Taguchi C, Kishimoto Y, Suzuki-Sugihara N, Saita E, Usuda M, Wang W, et al. Regular egg consumption at breakfast by Japanese woman university students improves daily nutrient intakes: Open-labeled observations. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2018;27(2):359–65.
10. Hamułka J, Głębska D, Guzek D, Białkowska A, Sulich A. Intake of Saturated Fatty Acids Affects Atherogenic Blood Properties in Young, Caucasian, Overweight Women Even without Influencing Blood Cholesterol. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;15(11):2530.
11. Laclaustra M, Lopez-Garcia E, Civeira F, Garcia-Esquinas E, Graciani A, Guallar-Castillon P, et al. LDL cholesterol rises with BMI only in lean individuals: Cross-sectional U.S. And Spanish representative data. *Diabetes Care*. 2018;41(10):2195–201.
12. Castellano-Castillo D, Moreno-Indias I, Fernández-García JC, Alcaide-Torres J, Moreno-Santos I, Ocaña L, et al. Adipose Tissue LPL Methylation is Associated with Triglyceride Concentrations in the Metabolic Syndrome. *Clin Chem*. 2018;64(1):210–8.
13. Martin SS, Blaha MJ, Elshazly MB, Toth PP, Kwiterovich PO, Blumenthal RS, et al. Comparison of a Novel Method vs the Friedewald Equation for Estimating Low-Density Lipoprotein Cholesterol Levels From the Standard Lipid Profile. *JAMA*. 2013;310(19):2061.
14. Lee J, Jang S, Son H. Validation of the Martin Method for Estimating Low-Density Lipoprotein Cholesterol Levels in Korean Adults: Findings from the Korea National Health and Nutrition Examination Survey, 2009-2011. Passi AG, editor. *PLoS One*. 2016;11(1):1–14.

15. Whelton SP, Meeusen JW, Donato LJ, Jaffe AS, Saenger A, Sokoll LJ, et al. Evaluating the atherogenic burden of individuals with a Friedewald estimated LDL-C <70 mg/dl compared to a novel LDL-C estimation method. *J Clin Lipidol*. 2017;11(4):1065–1062.
16. Martin SS, Giugliano RP, Murphy SA, Wasserman SM, Stein EA, Ceška R, et al. Comparison of Low-Density Lipoprotein Cholesterol Assessment by Martin/Hopkins Estimation, Friedewald Estimation, and Preparative Ultracentrifugation. *JAMA Cardiol*. 2018;3(8):749.
17. Wu Y, Li L, Wen T, Li Y-Q. Protective effects of echinacoside on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Toxicology*. 2007;232(1–2):50–6.
18. Khan RA, Khan MR, Sahreen S, Ahmed M, Shah NA. Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation and hyperglycemia in rat. *Toxicol Ind Health*. 2015 Jun 15;31(6):546–53.
19. Garg G, Patil A, Singh J, Kaushik N, Praksah A, Pal A, et al. Pharmacological evaluation of *Convolvulus pluricaulis* as hypolipidaemic agent in Triton WR-1339-induced hyperlipidaemia in rats. *J Pharm Pharmacol*. 2018;70(11):1572–80.
20. Zhang Q, Olatunji OJ, Chen H, Tola AJ, Oluwaniyi OO. Evaluation of the Anti-Diabetic Activity of Polysaccharide from *Cordyceps cicadae* in Experimental Diabetic Rats. *Chem Biodivers*. 2018;15(8) e1800219.
21. Wang Y, Guan M, Zhao X, Li X. Effects of garlic polysaccharide on alcoholic liver fibrosis and intestinal microflora in mice. *Pharm Biol*. 2018;56(1):325–32.
22. Wu Y, Zhou F, Jiang H, Wang Z, Hua C, Zhang Y. Chicory (*Cichorium intybus* L.) polysaccharides attenuate high-fat diet induced non-alcoholic fatty liver disease via AMPK activation. *Int J Biol Macromol*. 2018;118:886–95.
23. Yang TC, Chen YJ, Chang SF, Chen CH, Chang PY, Lu SC. Malondialdehyde mediates oxidized LDL-induced coronary toxicity through the Akt-FGF2 pathway via DNA methylation. *J Biomed Sci*. 2014;21(1):1–12.
24. Oliveira C da S, Beserra BTS, Cunha RSG, Brito AGE, Miranda RCD de, Zeni LAZR, et al. Impact of Roux-en-Y gastric bypass on lipid and inflammatory profiles. *Rev Col Bras Cir*. 2015;42(5):305–10.
25. Anniwaer J, Liu M, Xue K, Maimaiti A, Xiamixiding A. Homocysteine Might Increase the Risk of Recurrence in Patients Presenting with Primary Cerebral Infarction. *Int J Neurosci*. 2018;14:1–17.
26. Zaid M, Hasnain S. Plasma lipid abnormalities in Pakistani population: trends, associated factors, and clinical implications. *Brazilian J Med Biol Res*. 2018;51(9) e7239.
27. Dong Y, Qi Y, Liu M, Song X, Zhang C, Jiao X, et al. Antioxidant, anti-hyperlipidemia

- and hepatic protection of enzyme-assisted Morehella esculenta polysaccharide. *Int J Biol Macromol*. 2018;120(2018):1490–9.
28. dos Santos Nunes MK, Silva AS, de Queiroga Evangelista IW, Filho JM, Gomes CNAP, do Nascimento RAF, et al. Hypermethylation in the promoter of the MTHFR gene is associated with diabetic complications and biochemical indicators. *Diabetol Metab Syndr*. 2017;9(84)2-9.
 29. Vinci MC, Polvani G, Pesce M. Epigenetic Programming and Risk: The Birthplace of Cardiovascular Disease? *Stem Cell Rev Reports*. 2013;9(3):241–53.
 30. Guay S-P, Brisson D, Lamarche B, Biron S, Lescelleur O, Biertho L, et al. ADRB3 gene promoter DNA methylation in blood and visceral adipose tissue is associated with metabolic disturbances in men. *Epigenomics*. 2014;6(1):33–43.
 31. Santana Bezerra H, Severo de Assis C, dos Santos Nunes MK, Wanderley de Queiroga Evangelista I, Modesto Filho J, Alves Pegado Gomes CN, et al. The MTHFR promoter hypermethylation pattern associated with the A1298C polymorphism influences lipid parameters and glycemic control in diabetic patients. *Diabetol Metab Syndr*. 2019;11(1):1-15.
 32. Zheng C, Khoo C, Ikewaki K, Sacks FM. Rapid turnover of apolipoprotein C-III-containing triglyceride-rich lipoproteins contributing to the formation of LDL subfractions. *J Lipid Res*. 2007;48(5):1190–203.
 33. Kurylowicz A, Jonas M, Lisik W, Jonas M, Wicik Z, Wierzbicki Z, et al. Obesity is associated with a decrease in expression but not with the hypermethylation of thermogenesis-related genes in adipose tissues. *J Transl Med*. 2015;13(1):31.
 34. Moll S, Varga EA. Homocysteine and MTHFR Mutations. *Circulation*. 2015;132(1):6–9.
 35. Shorter KR, Felder MR, Vrana PB. Consequences of dietary methyl donor supplements: Is more always better? *Prog Biophys Mol Biol*. 2015;118(1–2):14–20.
 36. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972;18(6):499–502.
 37. Costa, CJM, Franchescinni S, Diniz S A, Persuhn CD, Lima LEF, Silva A et al. 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.
 38. Costa MJ C. Evaluation de l’apport alimentaire vitaminique en Bourgogne (France). *Ann Nutr Metab*. 1986;30(1):21–46.

39. Lima RPA, Lima A, Anderson R, Cristhine R, Luna P, Persuhn DC, et al. Effect of a diet containing folate and hazelnut oil capsule on the methylation level of the ADRB3 gene , lipid profile and oxidative stress in overweight or obese women. *Clin Epigenetics*. 2017;9(110):1–9.
40. de Oliveira Y, Lima RPA, Luna RCP, Monteiro MGCA, da Silva CSO, do Nascimento RAF, et al. Decrease of the DNA methylation levels of the ADRB3 gene in leukocytes is related with serum folate in eutrophic adults. *J Transl Med*. 2018;16(1):152.
41. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and T of HBC in A (Adult TPI. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*. 2002;106:3143–421.
42. Malachias M, Souza W, Plavnik F, Rodrigues C, Brandão A, Neves M, et al. Capítulo 1 - Conceituação, Epidemiologia e Prevenção Primária. *Arq Bras Cardiol*. 2016;107(3):1–108.
43. Miller SA1, Dykes DD PH. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16(3):1215.
44. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. :2017.
45. Guay SP, Brisson D, Lamarche B, Marceau P, Vohl MC, Gaudet D, et al. DNA methylation variations at CETP and LPL gene promoter loci: New molecular biomarkers associated with blood lipid profile variability. *Atherosclerosis*. 2013;228(2):413–20.
46. Houde AA, St-Pierre J, Hivert MF, Baillargeon JP, Perron P, Gaudet D, et al. Placental lipoprotein lipase DNA methylation levels are associated with gestational diabetes mellitus and maternal and cord blood lipid profiles. *J Dev Orig Health Dis*. 2014;5(02):132–41.
47. Lopes-Virella MF, Hunt KJ, Baker NL, Virella G, Moritz T. The levels of MDA-LDL in circulating immune complexes predict myocardial infarction in the VADT study. *Atherosclerosis*. 2012;224(2):526–31.
48. Pokharel Y, Sharma PP, Qintar M, Lu Y, Tang Y, Jones P, et al. High-sensitivity C-reactive protein levels and health status outcomes after myocardial infarction. *Atherosclerosis*. 2017;266:16–23.
49. National Institutes of Health. National Heart, Lung and Blood Institute. Department of Health and Human Services. The seventh report of the joint national committee on

- prevention, detection, evolution and treatment of high blood pressure. EU NIH. 2004;4(5230):1–86.
50. Goff DC et al. ACC/AHA guideline on the assessment of cardiovascular risk: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2014;129(5):2935 – 59.
 51. Pletcher MJ, Moran AE. Cardiovascular Risk Assessment. *Med Clin North Am*. 2017;101(4):673–88.
 52. Kitagawa K, Hosomi N, Nagai Y, Kagimura T, Ohtsuki T, Maruyama H, et al. Cumulative Effects of LDL Cholesterol and CRP Levels on Recurrent Stroke and TIA. *J Atheroscler Thromb*. 2018;25:1–10.
 53. Tsai I-J, Chen C-W, Tsai S-Y, Wang P-Y, Owaga E, Hsieh R-H. Curcumin supplementation ameliorated vascular dysfunction and improved antioxidant status in rats fed a high-sucrose, high-fat diet. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2018;43(7):669–76.
 54. Stanger O, Semmelrock HJ, Wonisch W, Bös U, Pabst E, Wascher TC. Effects of folate treatment and homocysteine lowering on resistance vessel reactivity in atherosclerotic subjects. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;303(1):158–62.
 55. Coffey, M.; Crowder, G.K.; Cheek DJ. Reducing coronary artery disease by decreasing homocysteine levels. *Crit Care Nurse*. 2003;23(1):25–30.
 56. Ference BA, Kastelein JJP, Ray KK, Ginsberg HN, Chapman MJ, Packard CJ, et al. Association of Triglyceride-Lowering LPL Variants and LDL-C–Lowering LDLR Variants With Risk of Coronary Heart Disease. *JAMA*. 2019;321(4):364.
 57. Wilson, P.W.; D’Agostino, R.B.; Levy, D. Belanger, A.M.; Silbershatz, H.; Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation*. 1998;97(18):1834–47.
 58. Otten JJ, Hellwig J P, Linda D, Dietary Reference Intakes: The Essential Guide to Nutrient. Washington, D.C. : National Academies Press; 2006.
 59. Swiger KJ, Martin SS, Blaha MJ, Toth PP, Nasir K, Michos ED, et al. Narrowing Sex Differences in Lipoprotein Cholesterol Subclasses Following Mid-Life: The Very Large Database of Lipids (VLDL-10B). *J Am Heart Assoc*. 2014;3(2):000851.
 60. Mora S, Buring JE, Ridker PM. Discordance of Low-Density Lipoprotein (LDL) Cholesterol With Alternative LDL-Related Measures and Future Coronary Events. *Circulation*. 2014;129(5):553–61.
 61. Retterstøl K, Svendsen M, Narverud I, Holven KB. Effect of low carbohydrate high fat diet on LDL cholesterol and gene expression in normal-weight, young adults: A

- randomized controlled study. *Atherosclerosis*. 2018;279:52–61.
62. Folsom AR. Separate and combined associations of body-mass index and abdominal adiposity with cardiovascular disease: collaborative analysis of 58 prospective studies. *Lancet*. 2011;377(9771):1085–95.

RESULTADO SUPLEMENTAR

TABELA S1. Concentrações de LDL-C dos indivíduos que apresentavam alto risco cardiovascular com base no valor estimado da Pressão Arterial Sistólica de 160 mmHg (5%).

LDL-C Friedewald	LDL- Martin	Medicamento
107	104	Captopril
33	43	Hemax, Clopingel, Domperidona
155	198	Valeriane, Tenadren
240	237	Sinvastatina, Captopril
82	118	Colchicina, Atenolol, Captopril
94	110	Losartana, Diclofenaco
60	87	Losartana, Hidroclorotiazida
145	160	Maleato de Enalapril
72	85	Omeprazol, Sinvastatina, Metformina
212	209	Losartana

*p<0,005; Legenda: LDL-C: Colesterol de Lipoproteína de Baixa Densidade; Média de LDL-C F = 120 mg/dL; Média de LDL-C Martin = 135 mg/dL.

TABELA S2. Concentrações de LDL-C dos indivíduos que apresentavam alto risco cardiovascular com base no valor estimado da Pressão Arterial Sistólica de 140 mmHg (3%).

LDL-C F mg/dL	LDL- Martin mg/dL	Medicamento
107	104	Captopril
131	136	Rivotril, Metformina, Afranil
56	94	Metformina, Omeprazol
240	237	Sinvastatina, Captopril
82	118	Colchicina, Atenolol, Captopril
94	110	Losartana, Diclofenaco

*p<0,005; Legenda: LDL-C: Colesterol de Lipoproteína de Baixa Densidade; F- Friedewald; M- Martin; Média de LDL-C F = 118 mg/dL; Média de LDL-C Martin = 133 mg/dL