



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

THAMIRES RIBEIRO CHAVES

**EFEITO DA INTERVENÇÃO COM FOLATO DIETÉTICO E ÓLEO
DE AVELÃ NOS NÍVEIS DE METILAÇÃO DOS GENES *LEP* E
POMC, PESO CORPORAL E PERFIL LIPÍDICO EM MULHERES
COM EXCESSO DE PESO**

João Pessoa

2021

THAMIRES RIBEIRO CHAVES

**EFEITO DA INTERVENÇÃO COM FOLATO DIETÉTICO E ÓLEO
DE AVELÃ NOS NÍVEIS DE METILAÇÃO DOS GENES *LEP* E
POMC, PESO CORPORAL E PERFIL LIPÍDICO EM MULHERES
COM EXCESSO DE PESO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências da Nutrição.

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

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Raquel Patrícia Ataíde Lima

João Pessoa

2021

C512e Chaves, Thamires Ribeiro.

Efeito da intervenção com folato dietético e óleo de avelã nos níveis de metilação dos genes LEP e POMC, peso corporal e perfil lipídico em mulheres com excesso de peso / Thamires Ribeiro Chaves. - João Pessoa, 2021. 145 f. : il.

Orientação: Maria José de Carvalho Costa.

Coorientação: Raquel Patrícia Ataíde Lima.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Nutrição. 2. Epigenética. 3. Metilação do DNA. 4. Obesidade. 5. Dieta. 6. Folato. 7. Óleo de avelã. I. Costa, Maria José de Carvalho. II. Lima, Raquel Patrícia Ataíde. III. Título.

UFPB/BC

CDU 612.39(043)

THAMIRES RIBEIRO CHAVES

EFEITO DA INTERVENÇÃO COM FOLATO DIETÉTICO E ÓLEO DE
AVELÃ NOS NÍVEIS DE METILAÇÃO DOS GENES *LEP* E *POMC*,
PESO CORPORAL E PERFIL LIPÍDICO EM MULHERES COM
EXCESSO DE PESO

Tese APROVADA em 11 / 02 / 2021

BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Maria José de Carvalho Costa

Orientadora titular

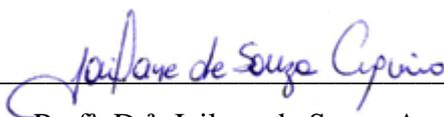
(UFPB/Centro de Ciências da Saúde/Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Nutrição)



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. Jailane de Souza Aquino

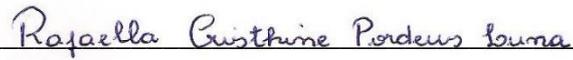
Membro interno – Titular

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



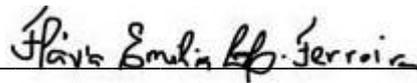
Profª Drª Naila Francis Paula de Oliveira

Membro externo – Titular
(UFPB/ Centro de Ciências Exatas e da Natureza/Departamento de Biologia Molecular)



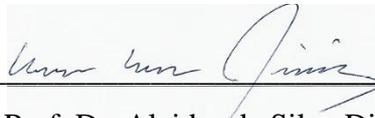
Prof.ª. Dr.ª. Rafaella Cristhine Pordeus Luna

Membro externo – Titular
(UFPI/Centro de Ciências da Saúde/Departamento de Nutrição)



Prof.ª. Dr.ª. Flávia Emilia Leite de Lima Ferreira

Membro interno – Suplente
(UFPB/ Centro de Ciências da Saúde/Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Nutrição)



Prof. Dr. Alcides da Silva Diniz

Membro externo – Suplente
(UFPE/Centro de Ciências da Saúde/Departamento de Nutrição)

Dedico este trabalho a **Deus**, fonte de toda Sabedoria, e donde me vem a Fé, Esperança e o Amor, e a **Maria Santíssima**, meu auxílio fiel e detentora dos meus méritos. A toda minha amada **família**, a minha querida e brilhante, **Prof^a Maria José de Carvalho Costa** e a toda equipe do projeto que esteve envolvida nesta conquista.

AGRADECIMENTOS

“*Dai graças ao Senhor porque Ele é bom; eterna é a sua misericórdia.*” (Salmo 117).

Aos meus pais, *Severino Marcos Chaves e Gislande Ribeiro Chaves*, que sempre acreditaram em mim, me incentivaram e educaram, além de estarem sempre comigo durante essa caminhada, vocês mais do que ninguém merecem todo o meu esforço. Muito obrigada, amo vocês! E ao meu irmão, *Lucas Ribeiro Chaves*, pelo seu incentivo e carinho.

A toda *minha família*, tios, padrinhos, primos, avó paterna, por todo carinho, incentivo e confiança que sempre demonstraram e assim, contribuíram para a conclusão de mais essa etapa.

A minha querida e admirável orientadora, fonte de inspiração na Nutrição, *Professora Doutora Maria José de Carvalho Costa*, exemplo de mestre, por todas as suas palavras de CORAGEM, pelos ensinamentos generosamente doados, por toda paciência e atenção comigo e dedicação em lapidar este projeto. Guardarei com carinho nossa convivência e levarei sempre sua amizade. Muito obrigada por tudo, professora!!!

A minha querida amiga e também coorientadora, *Raquel Patrícia Ataíde Lima*, de um coração tão grande. Sou imensamente grata a você, por todo o esforço e paciência que teve em colaborar na conclusão dessa tese, obrigada por sua amizade!

Ao meu querido *Nonato Gomes de Souza*, por todo carinho, apoio e orações, que alegraram e suavizaram todos os momentos, você fez a diferença nessa caminhada. A toda sua família, por ser uma outra família para mim, e por toda a força com palavras de encorajamento e fé que sempre me deram. A gratidão é sempre renovada a todos vocês.

As minhas queridas amigas, *Marina Ramalho Ribeiro, Ithamara Leite, Thais Miranda, Giovana Cristina, Angelica Albino, Amanda Raposo*, e todos os amigos pelo apoio e preocupação com o andamento do projeto. Em cada momento compartilhado me alegravam essas amizades. Meu muito obrigada!

Aos queridos professores da *banca examinadora*, por tão gentilmente terem aceitado o convite para participação nesta banca, e por terem contribuído com valiosos acréscimos a este projeto!

A todos os meus *colegas do Doutorado*, os quais estiveram comigo junto nesta caminhada e que com certeza também contribuíram na conclusão de mais esta etapa, seja na sala de aula, na troca de conhecimentos, no conselho amigo ou em tantos momentos de companheirismo. Obrigada a todas!.

A todos os meus amigos, dos variados círculos de amizade. Por cada oração, ombro e abraço amigo, sem dúvidas, para cada momento, vocês se fizeram especiais. Obrigada a todos!

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

A toda equipe de coordenadoras e estudantes que abraçaram de maneira voluntariamente generosa este lindo e desafiador projeto, pois acreditaram e foram importantíssimos em cada etapa, como também para a conclusão deste trabalho.

A enfermeira do projeto e amiga *Surama Silva*, por sua disponibilidade e contribuição nas coletas de sangue, que contagiava a todos com sua alegria e disposição às 5 horas da manhã.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Nutrição, a todos os professores do programa por contribuírem com o meu aperfeiçoamento profissional. Aos funcionários do curso de Pós-Graduação, *Carlos e Marcos*, pela paciência e dedicação sempre marcantes nos compromissos diários.

Aos participantes da pesquisa, por confiarem e contribuírem com a Ciência da Nutrição, efetivando a concretização deste trabalho e enriquecendo toda a pesquisa.

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

RESUMO

A seleção de genes candidatos a estudos com obesidade, como a Leptina (*LEP*) e a Proopiomelanocortina (*POMC*) podem fornecer informações sobre os mecanismos epigenéticos relacionados a intervenção dietética subjacentes à regulação do peso corporal e perfil lipídico. O objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito da intervenção com folato dietético e óleo de avelã nos níveis de metilação dos genes *LEP* e *POMC*, peso corporal e perfil lipídico de mulheres com excesso de peso. O presente estudo estava vinculado a um projeto maior intitulado “II Ciclo de Diagnóstico e Intervenção da Situação Alimentar, Nutricional e das Doenças não Transmissíveis mais Prevalentes da População do Município de João Pessoa/PB” (II DISANDNT/PB). Trata-se de um estudo de intervenção duplo-cego, placebo, controlado, desenvolvido com uma subamostra da população do projeto mencionado, constituído por 40 mulheres classificadas com sobrepeso ou obesidade. Estas foram avaliadas antes e após a intervenção em relação ao consumo alimentar, medidas antropométricas, análises bioquímicas e níveis de metilação dos genes *LEP* e *POMC*. As participantes foram randomizadas em quatro grupos: grupo 1 (G1) recebeu 191 µg / dia de folato dietético e 1 capsula de óleo de avelã; o grupo 2 (G2) recebeu 191 µg / dia de folato dietético e 1 cápsula de placebo; O grupo 3 (G3) recebeu 94 µg / dia de folato dietético e 1 cápsula de óleo de avelã; e o grupo 4 (G4) foi orientado a manter os hábitos alimentares. A análise estatística foi realizada com uma análise de variância (ANOVA) comparando os quatro grupos, e após, utilizando teste t de Student e Willcoxon, para analisar cada grupo, usando o software R. Encontrou-se as participantes com idade média de 44±10,1 anos, e após a intervenção apresentaram redução nos níveis de metilação dos genes estudados nos três grupos intervenção, no gene *LEP*: G1 (p=0,008), G2 (p=0,003) e G3 (p=0,005); no gene *POMC*: G1 (p=0,019), G2 (p=0,021) e G3 (p=0,01), e perda de peso no G2 (p=0,005) e G3 (p=0,000). No perfil lipídico, o G1 reduziu os níveis de LDL-c (p=0,043), HDL-c (p=0,000) e Triglicerídeos (p=0,045); no G3 houve redução dos níveis de colesterol total (p=0,001), LDL-c (p=0,000) e HDL-c (p=0,005), além de uma associação no G2 entre os níveis de metilação do *POMC* com triglicerídeos (p=0,00). Foi demonstrado pela primeira vez, o efeito da ingestão de uma dieta contendo folato dietético moderado e cápsula de óleo de avelã na redução dos níveis de metilação dos genes *LEP* e *POMC* e do peso corporal sem alteração do consumo energético, e melhora do perfil lipídico de mulheres com excesso de peso, sendo um potencial resultado para tratamento e prevenção da obesidade.

Palavras – chaves: Epigenética. Metilação do DNA. Obesidade. Dieta.

ABSTRACT

The selection of candidate genes for studies with obesity, such as leptin (*LEP*) and proopiomelanocortin (*POMC*), can provide information on the epigenetic mechanisms related to dietary intervention underlying the regulation of body weight and lipid profile. The objective of this research was to evaluate the effect of the intervention with dietary folate and hazelnut oil on the levels of methylation of the *LEP* and *POMC* genes, body weight and lipid profile of overweight women. The present study were linked to a larger project entitled " II Cycle of Diagnosis and Intervention of the Most Prevalent Food, Nutritional and Transmissible Situation of the Population of the Municipality of João Pessoa / PB (II DISANDNT / JP)". This is a double-blind, placebo, controlled intervention study, developed with a subsample of the population of the aforementioned project, consisting of 40 women classified as overweight or obese. These were evaluated before and after the intervention in relation to food consumption, anthropometric measurements, biochemical analyzes and methylation levels of the *LEP* and *POMC* genes. Participants were randomized into four groups: group 1 (G1) received 191 µg / day of dietary folate and 1 hazelnut oil capsule; group 2 (G2) received 191 µg / day of folate and 1 placebo capsule; Group 3 (G3) received 94 µg / day of folate and 1 capsule of hazelnut oil; and group 4 (G4) was instructed to maintain eating habits. The statistical analysis was performed with an analysis of variance (ANOVA) comparing the four groups, and afterwards, using Student's t-test and Willcoxon, to analyze each group, using the software R. We found the participants with an average age of 44 ± 10.1 years, and after the intervention showed a reduction in the methylation levels of the genes studied in the three intervention groups, in the *LEP* gene: G1 ($p = 0.008$), G2 ($p = 0.003$) and G3 ($p = 0.005$); in the *POMC* gene: G1 ($p = 0.019$), G2 ($p = 0.021$) and G3 ($p = 0.01$), and weight loss in G2 ($p = 0.005$) and G3 ($p = 0.000$). In the lipid profile, G1 reduced the levels of LDL-c ($p = 0.043$), HDL-c ($p = 0.000$) and triglycerides ($p = 0.045$); in G3 there was a reduction in the levels of total cholesterol ($p = 0.001$), LDL-c ($p = 0.000$) and HDL-c ($p = 0.005$), and in G4 a reduction in the values of total cholesterol ($p = 0.004$), LDL- c ($p = 0.001$), HDL-c ($p = 0.000$) and triglycerides ($p = 0.009$). The effect of eating a diet containing moderate dietary folate and hazelnut oil capsule in reducing the methylation levels of the *LEP* and *POMC* genes and decreasing body weight without altering energy consumption, and improving the lipid profile was demonstrated for the first time, being a potential result for treatment and prevention of obesity.

Key-words: Epigenetic. DNA Methylation. Obesity. Diet.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS DA TESE

Figura 1 - Mapa conceitual da Epigenética e surgimento das Doenças Crônicas não Transmissíveis	21
Figura 2 - Mecanismo de Metilação do DNA	23
Figura 3 - Via de Metabolismo do Folato	25
Figura 4 – Via de sinalização hipotalâmica da Leptina.....	31
Figura 5 - Diagrama esquemático do sistema melanocortina e controle do apetite e saciedade.....	34
Figura 6 - Relação da metilação do DNA com o gene <i>POMC</i>	35
Figura 7 . Fluxograma para definição da Amostra do II DISANDN/JP e subamostra do estudo de intervenção	49
Figura 8 . Fluxograma do protocolo de intervenção.....	52

FIGURAS DO ARTIGO I

Figura 1: Comparação entre os valores médios de peso corporal em cada grupo do estudo intervenção e no grupo 4	111
Figura 2: Comparação entre os valores médios de consumo alimentar habitual em cada grupo do estudo intervenção e no grupo 4	112

LISTA DE TABELAS

TABELAS DA TESE

Tabela 1: Composição média dos nutrientes (por 100g)	43
Tabela 2: Dieta consumida pelo Grupo 1 e 2 contendo 300g de vegetais e leguminosas ricos em folato	53
Tabela 3: Dieta consumida pelo Grupo 3 contendo 300g de vegetais e leguminosas.....	53
Tabela 4: Composição em ácidos graxos do óleo de avelã	54

TABELAS DO ARTIGO I

Tabela 1: Primers usados para analisar o status de metilação	108
Tabela 2: Comparação dos níveis de metilação dos genes estudados antes e após intervenção em cada grupo	109

TABELAS DO ARTIGO II

Tabela 1: Caracterização antropométrica, níveis de metilação e deo perfil lipídico antes e depois da intervenção	135
Tabela 2: Descrição e comparação das variáveis antes e depois da intervenção em cada grupo.....	137
Tabela 3: Análise de regressão múltipla do nível de metilação do gene <i>POMC</i> para o grupo 2 do estudo de intervenção	138

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2°DISANDNT/JP	Segundo Diagnóstico e Intervenção da Situação Alimentar, Nutricional e das Doenças Não Transmissíveis Mais Prevalentes de João Pessoa
ABCA1	<i>ATP-binding cassette transporter A1</i> (Transportador de ligação cassete de ATP A1)
ACTH	Hormônio Adenocorticotropico
ADIPOQ	Adiponectina
AG	Ácidos graxos
AgRP	<i>Agouti related-peptide</i> (Proteína relacionada Agouti)
AGM	Ácidos Graxos Monoinsaturados
AGP	Ácidos Graxos Polinsaturados
AGS	Ácidos Graxos Saturados
AGT	Ácidos Graxos Trans
AHA	<i>Association American of Health</i> (Associação Americana do Coração)
APOE	Apolipoproteína E
ARC	<i>Arcuate Nucleus</i> (Nucleo Arqueado)
BMAL1	<i>Brain and Muscle ARNT-Like 1</i> (Cérebro e musculo tipo ARNT)
DCC	Doença Cardiovascular Coronária
DCV	Doença Cardiovascular
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)
CpG	<i>Cytosine-phosphate-Guanine</i> (Citosina – fosfato – Guanina)
CC	Circunferência da Cintura
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DNMT	DNA metiltransferase
DHA	<i>Docosahexaenoic Acid</i> (Ácido Docosahexaenóico)
DCNT	Doenças Crônicas não Transmissíveis
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (Ácido Etilenodiaminotetracético)
ERRO	Éspecies Reativas de Oxigênio
EWAS	<i>Epigenome-wide association study</i> (Estudo de associação em todo o epigenoma)

FAPESQ	Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i> (Organização para Alimentação e Agricultura)
HDL	<i>High Density Lipoproteins</i> (Lipoproteína de alta densidade)
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de Massa Corporal
LEP	Leptina
LEPR	<i>Receptor Leptin</i> (Receptor de Leptina)
LDL	<i>Low Density Lipoproteins</i> (Lipoproteína de baixa densidade)
MCH-R	<i>Melanin Concentrating Hormony Receptor</i> (Receptor Hormonal Concentrado de Melanina)
MSH	<i>Melanocyte-Stimulating Hormones</i> (Hormônio Estimulador de Melanocitos)
MSM	<i>Multiplres Source Methods</i> (Método de Múltiplas Fontes)
MTHFR	<i>Metilenotetrahydrofolate redutase</i> (Metilenotetrahidrofolato redutase)
NIESN	Núcleo Interdisciplinar de Estudos em Saúde e Nutrição
NPY	Neuropeptídeo Y
OMS	Organização Mundial de Saúde
PPAGCR1	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1</i> (Peroxisoma coativador do receptor gama ativado proliferador 1)
PER2	<i>Period Circadian Regulator 2</i> (Regulador do Ritmo Circadiano 2)
POMC	Proopiomelanocortina
PPGCN	Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição
PVN	<i>Paraventricular Nucleus</i> (Nucleo Paraventricular)
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido Ribonucléico)
RVM	Região Variável Metilada
SAM	<i>S-Adenosyl methionine</i> (S- adenosilmetionina)
TAM	Tecido Adiposo Marrom
TNF-a	<i>Tumor Necrosis Factor Alfa</i> (Fator de Necrose Tumoral Alfa)
TG	Triglicerídeos
THF	Tetrahidrofolato
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UFPB

Universidade Federal da Paraíba

WHO

World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1 ASPECTOS DA NUTRIGENÉTICA E NUTRIGENÔMICA	20
2.1.1 Metilação do DNA	22
2.1.2 Interação entre metilação do DNA e folato	24
2.1.3 Interação entre metilação do DNA e gorduras	26
2.1.4 Fatores epigenéticos da obesidade.....	28
2.2 GENES	30
2.2.1 Leptina (<i>LEP</i>).....	30
2.2.2 Proopiomelanocortina (<i>POMC</i>).....	33
2.3 DIETA ANTIOXIDANTE	37
2.3.1 Caracterização do folato e ácido fólico e recomendações nutricionais.....	38
2.4 CARACTERIZAÇÃO DAS GORDURAS E RECOMENDAÇÕES NUTRICIONAIS.....	42
2.4.1 Óleo de avelã	42
2.5 PERFIL LIPÍDICO ASSOCIADO A OBESIDADE	44
2.6 SOBREPESO E OBESIDADE	45
3 ABORDAGEM METODOLÓGICA	48
3.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO	48
3.1.1 Questões éticas	48
3.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA	48
3.2.1 Critérios de inclusão.....	50
3.2.2 Critérios de exclusão	50
3.3 PROTOCOLO DE INTERVENÇÃO	51
3.3.1 Elaboração dos vegetais	53
3.3.2 Capsula de óleo de avelã	54
3.4 COLETA DE DADOS	54
3.5 AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA.....	55
3.6 CONSUMO ALIMENTAR.....	55
3.6.1 Estimativa do consumo alimentar.....	56
3.7 ANÁLISES DO PERFIL LIPÍDICO.....	56
3.8 ANÁLISE DO NÍVEL DE METILAÇÃO	57

3.8.1 Obtenção da amostra e isolamento do DNA genômico	58
3.8.2 Desenho dos primers	58
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	59
4 RESULTADOS	60
5 REFERÊNCIAS	61
6 APÊNDICES	77
APÊNDICE A – CERTIDÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	78
APÊNDICE B – CERTIDÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	79
APÊNDICE C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .	80
7 ANEXOS	81
ANEXO A – FICHA DE EQUIVALENTES	82
ANEXO B – AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA	83
ANEXO C – RECORDATÓRIO ALIMENTAR	84
ANEXO D – LISTA DO SISTEMA DE EQUIVALENTES ATUALIZADA E MODIFICADA PARA USO NO BRASIL	85
ARTIGO 1	100
ARTIGO 2	128

1 INTRODUÇÃO

A metilação do DNA é o mecanismo mais amplamente estudado dentre as modificações epigenéticas destinadas para regular a expressão gênica. Em geral, a metilação silencia a expressão gênica e a desmetilação a promove. O processo de metilação pode ocorrer em sequências de DNA específicas, importantes para o início da transcrição, denominadas regiões promotoras, com isso, a expressão do gene é reduzida ou mesmo inativada (TIFFON, 2018).

Observa-se na literatura informações importantes sobre a metilação do DNA associada à obesidade e síndrome metabólica. A obesidade é uma doença de etiologia multifatorial, envolvendo fatores genéticos, ambientais e obesogênicos (LOPOMO; BURGIO; MIGLIORE, 2016), sendo considerado atualmente um dos principais problemas de saúde pública do mundo (RYAN; KAHAN, 2018). Esta morbidade é considerada uma doença inflamatória de baixo grau, sendo o estado inflamatório crônico de baixo grau da obesidade um importante fator no desenvolvimento de disfunção metabólica relacionada à doença (TELLE-HANSEN *et al.*, 2017).

Com isso, a identificação de genes que determinam a suscetibilidade à obesidade, como os genes *LEP* e *POMC* podem fornecer informações sobre os mecanismos epigenéticos relacionados a intervenção dietética subjacentes à regulação do peso corporal e níveis lipídicos no sangue, o que, por sua vez, pode levar a novas abordagens para tratamento e prevenção (GONZÁLEZ-MUNIESA *et al.*, 2017; ROHDE *et al.*, 2019).

A leptina é uma adipocina de 167 aminoácidos, expressa principalmente nos adipócitos o qual seus níveis circulantes refletem as reservas de energia do corpo no tecido adiposo (TRIANAFYLLOU *et al.*, 2016), codificada pelo gene *LEP*, que regula a fome e saciedade. Em estudo realizado por Crujeiras *et al.*, (2013), observou-se que a metilação do DNA no gene *LEP* (analisado no sangue periférico) foi associada aos níveis de colesterol, LDL, e Índice de Massa Corporal (IMC) e de acordo com Hjort *et al.* (2017), a gordura corporal mostrou-se relacionada positivamente com a metilação do gene *LEP*.

O outro gene envolvido na obesidade, é o pró-hormônio, proopiomelanocortina (POMC), que dá origem a diversos peptídeos e hormônios ativos com uma ampla gama de ações fisiológicas, que está sujeito a alterações epigenéticas que contribuem para a obesidade comum (CANDLER *et al.* 2019). Os níveis de metilação do DNA do sangue periférico no gene *POMC* foram associados ao IMC com níveis mais altos em obesos em comparação com

adultos e crianças com peso normal. Além disso, o ganho de peso está associado ao aumento da metilação do gene *POMC* (KUEHNEN *et al.*, 2012; KUEHNEN *et al.*, 2016).

Portanto, evidências indicam que as modificações epigenéticas têm efeitos importantes sobre a obesidade em humanos (LING *et al.*, 2019), como aquelas dos genes *LEP* e *POMC*. O gene *LEP*, por exemplo é citado na literatura, por sua associação ao IMC, adiposidade central (KROLL *et al.* 2019) e perfil lipídico alterado (HOUDE *et al.*, 2015) por meio de vias envolvidas no comportamento alimentar, ritmo circadiano e no metabolismo lipídico (ROHDE *et al.*, 2019). A Leptina atua de maneira anorética, contribuindo para a homeostase energética via inibição dos sinais de fome e ativação do *POMC* (NEYAZI *et al.*, 2019).

Esses mecanismos epigenéticos, podem ser modulados por fatores ambientais como, componentes alimentares, medicamentos e exposição ambiental podendo induzir modificações, que por sua vez podem afetar a expressão gênica (ARONICA *et al.*, 2017).

Dentre os componentes alimentares, os micronutrientes, como o folato é bem conhecido como doador de carbono para metilação e síntese de DNA e com possível influência no metabolismo energético e lipídico, associado ao maior consumo de frutas e verduras e legumes (KELLY *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2018).

Dietas ricas nesses nutrientes, doadores de metil, podem afetar rapidamente a expressão gênica, especialmente durante o desenvolvimento inicial, quando o epigenoma é estabelecido pela primeira vez, e podem ter efeitos duradouros na vida adulta. Em ratos adultos, uma dieta deficiente em metil diminuiu a metilação do DNA, mas as alterações foram reversíveis quando o folato foi adicionado de volta à dieta (ALAVIAN-GHAVANINI; RUEGG, 2018)

Outro componente alimentar de interesse é o óleo de avelã, rico em ácidos graxos monoinsaturados, porém, quando relacionado com a metilação do DNA, os dados são limitados na literatura. Em estudo realizado por Brons *et al.*, (2010), observou-se que o consumo de uma dieta rica em gordura (60% das calorias totais) aumentou a metilação do DNA no promotor *PPARGC1* no músculo esquelético de homens jovens saudáveis de uma forma reversível. No estudo realizado por Voisin *et al.*, (2015), em que avaliou-se níveis de ingestão de gordura em pré-adolescentes obesos, observou-se que a qualidade da gordura provavelmente influencia em larga escala genômica a metilação do DNA.

Nesse sentido, pesquisas vêm sendo realizadas para entender a influência de diferentes compostos nutricionais, entre eles, o folato e os ácidos graxos monoinsaturados, sobre a alteração dos mecanismos epigenéticos e, conseqüentemente, na regulação da

expressão gênica e a probabilidade de desenvolver ou prevenir doenças (MARTINEZ *et al.*, 2014; BRONS *et al.* 2010). É observado na literatura científica, estudos sobre a relação da dislipidemia no cenário da obesidade com o IMC elevado (MILYANI; AL-AGHA, 2019).

Nesse contexto, a presente tese tem por objetivo geral avaliar o efeito da intervenção com folato dietético e óleo de avelã nos níveis de metilação dos genes *LEP* e *POMC*, peso corporal e perfil lipídico em mulheres com excesso de peso.

E como objetivos específicos: avaliar o consumo de ácidos graxos monoinsaturados totais e oléico, analisar os níveis de metilação dos genes *LEP* e *POMC* da casuística; avaliar o peso corporal e o perfil lipídico da casuística; verificar o efeito da intervenção com folato dietético e óleo de avelã na casuística e relacionar os valores dos níveis de metilação dos genes *LEP* e *POMC* com todas as variáveis descritas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ASPECTOS DA NUTRIGENÔMICA E EPIGENÉTICA

Desde a conclusão do Projeto Genoma Humano, surgiram novas linhas de pesquisa na área da saúde, e também na Nutrição. Através da relação existente entre os nutrientes e o genoma humano originou-se a Nutrigenômica, que tem como objetivo principal conhecer o funcionamento e a interação do genoma com os componentes dietéticos, e com base nesse conhecimento prescrever dietas personalizadas para promover saúde e compreender as várias respostas obtidas através de uma determinada dieta aplicada entre grupos populacionais ou indivíduos (CONTI, 2010; SALES; PELEGRINI; GOERCH, 2014; MCDONALD; GLUSMAN; PRICE, 2016).

Um dos principais focos da Nutrigenômica está voltado na prevenção de doenças crônicas que são mediadas, em parte, pela exposição permanente a certos componentes dietéticos (NUNO; HEUBERGER, 2014). Logo, a Nutrigenômica poderá auxiliar na prevenção de doenças relacionadas com a alimentação, bem como a elaboração de estratégias nutricionais e colaborar para o conhecimento dos efeitos adversos ou benéficos de alguns alimentos ou nutrientes.

A Nutrição personalizada será o futuro em termos de concepção e prescrição de uma dieta para os indivíduos com base no seu genoma e suas variações genéticas, ainda nessa complexa interação entre gene e dieta que pode ser benéfica ou não ao organismo, onde está inserida a epigenética (WATERLAND, 2006; PAVLIDIS *et al.*, 2012; NOECKER; BORESTEIN, 2016).

Entende-se por epigenética um mecanismo associado a mudanças hereditárias na expressão do gene, que não envolvem alterações na sequência do DNA, são reversíveis e ainda podem ser herdadas entre gerações de forma constante (MARTINEZ *et al.*, 2014). Deste modo, a hereditariedade é um parâmetro que indica o grau em que a variabilidade de cada característica em uma população pode ser atribuída a fatores genéticos (CHMURZYNSKA; MLODZIK, 2017).

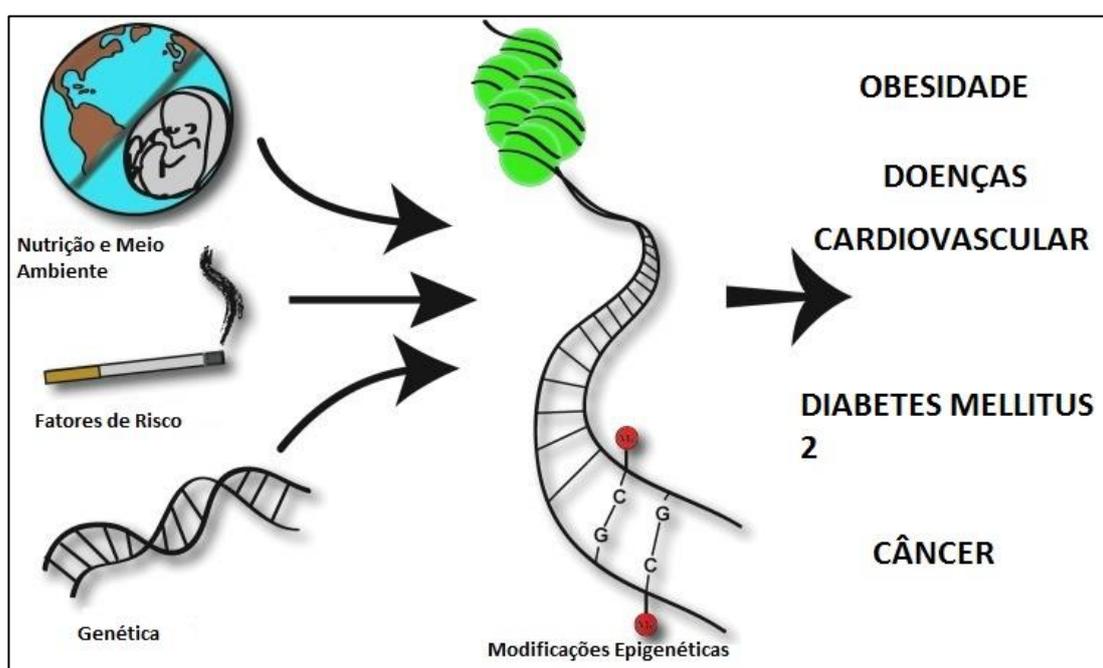
O epigenoma atua como uma ponte entre a genética e o ambiente, e o código epigenético modifica a expressão gênica para determinar o fenótipo final sem alterações nas sequências do DNA. As modificações epigenéticas, como a Metilação do DNA, Modificações de Histonas e RNAs não Codificantes, podem alterar o fenômeno da doença, afetando diretamente o gene alvo, como resposta a sinais ambientais e estados patológicos,

como dieta, exercício, toxinas, estresse oxidativo, inflamação e alterações metabólicas (SUN *et al.*, 2017).

Ao contrário do genoma, o epigenoma pode ser modificado e, assim, alguns marcadores de risco epigenético tem o potencial para ser modificado. Tais modificações podem ser estimuladas por fatores internos tais como: alterações na estrutura da cromatina, vias metabólicas, balanço neuroendócrino, atividades hormonais, polimorfismos genéticos e fatores externos como nutrientes, componentes alimentares bioativos, medicação, tabaco, radiação, organismos infecciosos e estresse (KIM; RYAN; ARCHER, 2013; LIMA *et al.*, 2017), conforme Figura 1.

Dessa forma, o campo da epigenética nutricional consegue desvendar a natureza das interações dos nutrientes com os genes, dando assim mais suporte à nutrigenômica na compreensão da aquisição de novos fenótipos (KANG, 2013; BISHOP; FERGUSON, 2015).

Figura 1 - Mapa conceitual da Epigenética e surgimento das Doenças Crônicas não Transmissíveis.



Fonte: KIM; RYAN; ARCHER 2013 e LIMA *et al.*, 2017

A expressão gênica é regulada de maneira positiva ou negativa pela metilação do DNA, desempenhando importantes funções. É conclusivo que algumas modificações epigenéticas no DNA podem surgir como consequência de mudanças ambientais, incluindo nutrição e exercício, podendo alterar a expressão gênica de maneira estável e hereditária, influenciando em desordens metabólicas, comportamentais e de saúde. Sendo assim estes

fatores tornam a epigenética um mecanismo patogênico importante em desordens complexas, tais como a obesidade (BRAY *et al.*, 2016).

Nesse sentido, segundo Switzeny *et al.*, (2012) e Kauwell, (2008), os fatores ambientais apresentam um impacto significativo sobre o programa epigenético da expressão gênica, e associados ao estresse oxidativo e inflamação tendem a influenciar e desempenhar papel na metilação do DNA. O grupo metil podem ser adicionados ou removidos e são influenciados pela dieta, assim, fatores dietéticos têm sido relacionados com a alteração da metilação do DNA, ocasionando mudanças na expressão gênica.

Logo, mecanismos epigenéticos desempenham funções nas diversas vias envolvidas com a obesidade, incluindo ingestão alimentar, gasto energético e adiposidade (DHASARATHY; ROEMMICH; CLAYCOMBE, 2017). O conhecimento específico poderá levar a possíveis alvos terapêuticos para a prevenção e tratamento resultante de várias desordens metabólicas, como a obesidade.

2.1.1 Metilação do DNA

A metilação do DNA é uma das primeiras modificações epigenéticas encontradas em humanos. É um tipo de modificação pós-replicação que frequentemente ocorre nas citosinas da sequência de dinucleotídeo (CpG) com a ajuda de DNA metiltransferases (DNMTs), que transferem um grupo metil de S-adenil metionina para o quinto carbono de um resíduo de citosina para formar 5-metilcitosina (5mC) (JIN; LIU, 2018).

O silenciamento epigenético é a repressão transcricional de genes específicos ao longo do crescimento e diferenciação celular, sendo o mecanismo pelo qual a cromatina sofre vários tipos de alterações, incluindo modificações de histonas e metilação do DNA (NASIR *et al.*, 2020).

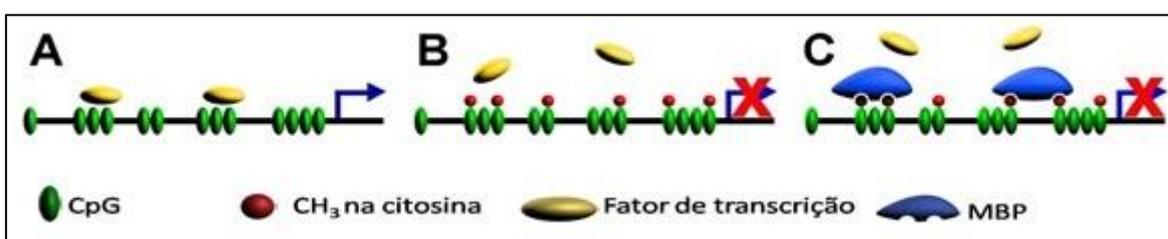
Estas modificações são importantes para a remodelação da cromatina e acessibilidade ao maquinário transcripcional para facilitar e regular a transferência de informação genética (RUSSO *et al.* 2017). Embora sua definição esteja em constante atualização, três aspectos principais estão estabelecidos: sem alterações na sequência do DNA, hereditariedade, plasticidade e reversibilidade (LIND; SPAGOPOULOU, 2018).

Assim, essa metilação ocorrendo na região promotora do gene, em ilhas CpG promove o efeito de silenciamento transcricional da expressão gênica (AUCLAIR; WEBER, 2012), em mamíferos é estabelecida durante a embriogênese (OKANO; XIE; LI, 1998;

BESTOR, 2000) e os padrões de metilação mudam de acordo com as fases de desenvolvimento das células (EHRLICH *et al.*, 1982; LAURENT *et al.*, 2010).

Em geral, a hipermetilação na região promotora do gene pode silenciar a expressão gênica, enquanto a hipometilação promove a atividade gênica. A metilação do DNA foi relatada como sendo associado ao câncer, doenças cardiovasculares, Diabetes Mellitus, hipertensão, osteoartrite, entre outros (MAO *et al.*, 2017). Na Figura 2, observa-se o mecanismo pelo qual a metilação do DNA inibe a transcrição gênica.

Figura 2 - 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.** Proteínas que se ligam à metilcitosina em ilhas CpG bloqueiam a ligação dos fatores de transcrição.

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

Pesquisadores sugeriram que a metilação do DNA deve ser estudada como uma forma mais dinâmica, na qual está determinada pela atividade local de DNA metiltransferase, DNA desmetilases, e enzimas de replicação do DNA, sendo vital para diversos processos de desenvolvimento, através da regulação da expressão do gene e herança epigenética (GUO *et al.*, 2015).

Price *et al.*, (2016), ao avaliarem a metilação do DNA em tecidos humanos objetivando esclarecer se havia uma relação entre defeitos do tubo neural com deficiência no ciclo do metabolismo do carbono (processo que fornece uma unidade de carbono para metilação do DNA), sugeriram que mecanismos como a expressão gênica e deficiência de

vitaminas envolvidas no metabolismo do carbono são linhas de investigações que podem fornecer pistas quanto à etiologia do problema.

Pesquisas epigenéticas têm avançado cada vez mais nos últimos anos, a fim de oferecer ferramentas para melhor compreensão da crescente pandemia da obesidade. A relação entre modificações epigenéticas, incluindo a metilação do DNA, no desenvolvimento da obesidade é cada vez mais evidente, elucidando o aumento desta patologia e de outras doenças crônicas, degenerativas e inflamatórias como o diabetes, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas e câncer (LOPOMO; BURGIO; MIGLIORE, 2016).

Sugere-se que a obesidade e suas complicações estejam ligadas a fatores externos advindos de um ambiente denominado obesogênico, da microbiota intestinal e do desequilíbrio nutricional, acarretando em alterações epigenéticas que resultam no ganho de peso (LOPOMO; BURGIO; MIGLIORE, 2016).

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

2.1.2 Interação entre Metilação do DNA e Folato

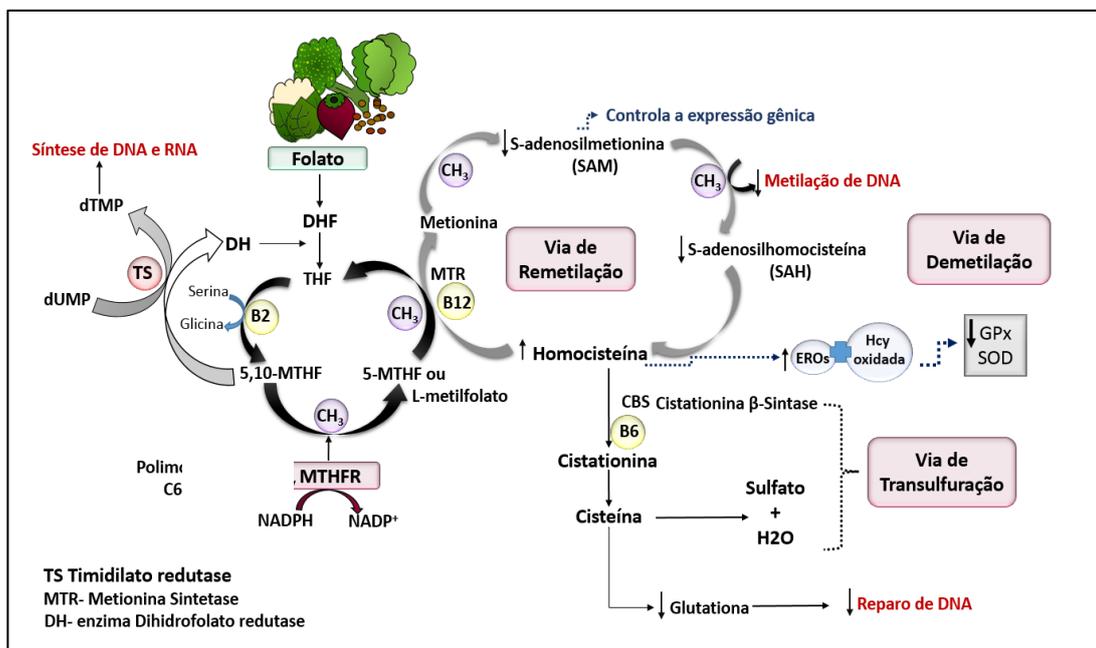
Dentre os nutrientes com função antioxidante podemos citar o folato que age como um doador de carbono para metilação e síntese de DNA, sendo fundamental na geração da S-adenosilmetionina (SAM) (KALANI *et al.*, 2014; CLAYCOMBE; BRISSETE; GHRIB, 2015), doador universal de radical metil (CH_3) utilizado pelas DNMTs para as reações de metilação do DNA.

O folato participa da transferência de unidades de carbono envolvidas na biossíntese de nucleotídeos, no ciclo da metionina e nas reações de metilação biológica, conforme Figura 3.

Como cofator essencial para a biossíntese de novo de nucleotídeos, o folato é importante na síntese, estabilidade e integridade e reparo do DNA. No ciclo da metionina, o 5-metil-tetrahidrofolato (5-metilTHF), transfere grupos simples de metila para homocisteína, catalisada pela metionina sintase, para sintetizar a metionina. Isso assegura a provisão de SAM, o grupo metil primário para a maioria das reações de metilação biológica (MOLL; VARGA, 2015).

Após a doação do grupo metil, o 5-metilTHF é convertido em THF e depois em 5,10-metilenoTHF por serina hidroximetiltransferase. O 5,10-metilenoTHF é um substrato essencial no metabolismo foliar, que pode ser direcionado à biossíntese de nucleotídeos ou à regeneração da metionina. A metileno-tetra-hidrofolato redutase (MTHFR) catalisa a conversão irreversível de 5,10-metilenoTHF em 5-metilTHF (MOLL; VARGA, 2015).

Figura 3 - Via de Metabolismo do Folato



Fonte: Sharp; Little (2004); Hiraoka; Kagawa (2017); ilustrado por Lisboa (2017).

O ácido fólico parece influenciar o metabolismo energético e lipídico, modulando a metilação do DNA e os padrões de expressão gênica. As interações entre genes e dieta continuam sendo importantes determinantes da saúde durante toda a vida, e, portanto, o excesso de ácido fólico pode continuar a promover mudanças no metabolismo energético e lipídico na idade adulta. No entanto, os efeitos do consumo excessivo de ácido fólico no risco da síndrome metabólica e na adiposidade na idade adulta ainda são pouco conhecidos (KELLY *et al.*, 2016).

Alterações epigenéticas tornaram-se mais significativamente associadas com as interações gene-dieta e gene-ambiente, resultando em metabolismo alterado de lipídios, inflamação e outros desequilíbrios metabólicos que levam a doenças cardiovasculares e obesidade (ORDOVAS; ROBERTSON; CLEIRIGH, 2011). Com isso, o folato também desempenha um importante papel nos processos de metilação do DNA e sobre os níveis do perfil lipídico, através da participação de processos reguladores, sendo verificado que níveis

adequados de folato sérico estão associados com aumento do HDL-C e diminuição do LDL-C (HUSEMOEN *et al.*, 2016).

Switzeny *et al.*, (2012), analisaram que uma dieta rica em antioxidantes e vitaminas, especialmente o folato, foi capaz de alterar a metilação do DNA, e compensar lesões epigenéticas induzidas por Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), em indivíduos idosos diabéticos tipo 2.

Essas lesões dizem respeito à desmetilação ocasionada pelo aumento de EROs como resultado da hiperglicemia crônica. A intervenção resultou em metilação significativamente mais alta em duas particulares regiões promotoras, nos genes *MLH1* e *MGMT*, que geram enzimas de reparo do DNA. Os autores consideram que a intervenção nutricional pode ter levado a uma menor carga de EROs e, dessa forma, diminuir os efeitos da desmetilação, sendo a metilação do DNA associado com maior consumo de vegetais (ZHANG *et al.*, 2011).

Assim, um conceito terapêutico importante é que os nutrientes e medicamentos podem ser capazes de reverter padrões epigenéticos anormais e que a programação epigenética, ou reprogramação quando indicado, pode tornar-se mecanismos eficazes que conduzem à melhoria da saúde através da intervenção dietética em pontos específicos do desenvolvimento desses padrões anormais (HANLEY *et al.*, 2010).

2.1.3 Interação entre Metilação do DNA e Gorduras

Os níveis lipídicos podem ser afetados por componentes genéticos através da alteração da expressão gênica destes (WILLER *et al.*, 2013). Ao contrário da sequência de DNA, a metilação do DNA é dinâmica ao longo do tempo e responde ao meio ambiente; portanto, a metilação do DNA também pode ser alterado em resposta aos níveis de lipídios no sangue (BRAUN *et al.*, 2017).

Na relação entre valores de LDL-C e níveis de metilação, observou-se que modificações no perfil de metilação podem estar envolvidos nas alterações da expressão enzimática e na desregulação do metabolismo das gorduras (NUNES *et al.*, 2017), cuja influência de fatores externos, podem regular a transcrição de genes e promover alteração diretamente no código epigenético causando ativação permanente de mediadores inflamatórios com produção sustentada de mediadores pró-inflamatórios (VINCI; POLVANI; PESCE, 2013).

Alguns estudos usando abordagens de genes candidatos relataram que a metilação do DNA em vários, como nos genes *APOE* e *ABCA1*, que estão associados a níveis lipídicos

alterados. Além disso, estudos de associação ampla de epigenoma (EWAS) tornaram-se disponíveis recentemente, oferecendo a possibilidade de identificar associações entre os níveis de lipídios no sangue e metilação do DNA em novos sítios (GUAY *et al.*, 2014; MA *et al.*, 2015).

No entanto, até agora, a maioria dos estudos que investigaram a associação entre a metilação do DNA e os lipídios foram realizadas em populações de pacientes (GUAY *et al.*, 2012; IRVIN *et al.*, 2014; PFEIFFER *et al.*, 2015), enquanto apenas um estudo foi realizado com estudo de base populacional. Como a metilação do DNA pode variar em diferentes estados de saúde, são necessários mais estudos populacionais para explorar essas associações na população em geral (BRAUN *et al.*, 2017).

Em relação à obesidade, diferentes nutrientes estão correlacionados com as mudanças na metilação do DNA. Vários lipídios foram associados com alterações na metilação do DNA, como os Ácidos Graxos Polinsaturados AGP (n-6) no gene *TNF- α* , componentes no óleo de avelã para o gene *ADRB3*, outros ácidos graxos no gene *CLOCK* e triglicerídeos (TG) para os genes *ABCG1*, *ABCA1*, *PHGDH*, *TOMM20* (MILAGRO *et al.*, 2012; HERMSDORFF; MANSEGO; CAMPIÓN, 2013; GUAY *et al.*, 2014; PFEIFFER *et al.*, 2015; TORO-MARTIN *et al.*, 2016; LIMA *et al.*, 2017; TRUONG *et al.*, 2017).

A maioria desses genes desempenha um papel no metabolismo lipídico, sugerindo que: a) lipídios induzem mudanças dinâmicas na metilação do DNA e b) alterações na metilação do DNA podem impactar nos genes da via lipídica sendo de imensa importância para o desenvolvimento da obesidade e comorbidades. Isso é ainda mais reforçado por estudos que destacam a associação dos níveis de lipídios no sangue com a metilação do DNA em todo o genoma, afetando a transcrição de numerosos genes envolvidos no metabolismo lipídico (DEKKERS *et al.*, 2016; BRAUN *et al.*, 2017).

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

Em estudo realizado por Voisin *et al.*, (2015), com adolescentes, no qual realizaram a relação entre os diversos tipos de ácidos graxos em genes diversos e os dados sugerem que as alterações específicas na metilação do DNA pode ter um papel importante nos mecanismos envolvidos das respostas fisiológicas aos diferentes tipos de gordura na dieta.

Os autores observaram que a qualidade da gordura tem influencia sobre o perfil de metilação do DNA em escala genômica.

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

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

2.1.4 Fatores epigenéticos da Obesidade

A obesidade tem etiologia multifatorial, que envolve fatores genéticos e não genéticos (HASLAM; JAMES 2005; XIA; GRANT, 2013). Supostamente, a maioria dos casos de obesidade, podem ser melhor retratados como resultado de um ambiente obesogênico adverso e, de susceptibilidade genética. A susceptibilidade genética pode ser observada por defeitos em diferentes mecanismos homeostáticos (GONZÁLEZ-MUNIESA *et al.*, 2017).

Certamente a exposição a fatores ambientais e obesogênicos é a principal causa do aumento da prevalência de um IMC elevado ao longo dos últimos 30 anos (HASLAM; JAMES, 2005; FINUCANE *et al.*, 2011), que envolve paralelamente alterações epigenéticas induzidas pelo estresse ambiental aumentando a susceptibilidade à obesidade (CRUJEIRAS; CASANUEVA, 2015).

Modificações epigenéticas podem desempenhar um papel causal na obesidade, induzindo a expressão inadequada ou silenciando sequencias reguladoras de genes relacionados à obesidade, levando a desequilíbrios metabólicos. Alternativamente, alterações epigenéticas podem ocorrer como consequência da obesidade, mas uma vez estabelecidas, podem predispor a alterações relacionadas à obesidade, tal como a comorbidade Diabetes *Melittus* tipo 2 (DM2) (DRUMMOND; GILBNEY, 2013).

Em estudo observacional de associação epigenômica de base populacional (EWAS) realizado por Wahl *et al.*, (2017), verificou-se que o IMC está associado a alterações nos níveis de metilação do DNA em 187 *loci* genéticos. Além disso, observou-se evidências para sugerir que essas alterações foram mais provavelmente causadas pela adiposidade do que por uma outra causa. Este mesmo estudo é atualmente o EWAS mais robusto e significativo no campo da obesidade associado a metilação do DNA em termos de tamanho da população, desenho do estudo e métodos utilizados. No entanto, como este foi um estudo observacional e não uma intervenção para perda de peso, a reversibilidade da metilação do DNA associado à obesidade não pôde ser testado.

Seis estudos com intervenção dietética tiveram como objetivo identificar biomarcadores de metilação do DNA como resposta à perda de peso em populações com peso adequado, sobrepeso e obesidade, analisando as diferenças de metilação da linha de base e / ou dos pontos finais entre os que responderam à dieta em nível mais alto ou mais baixo, ou nos que recuperaram o peso *versus* os que não registraram (doravante referidos como "estudos de biomarcadores") (MILAGRO *et al.*, 2012; CRUJEIRAS *et al.*, 2013; LOPEZ – LEGARREA *et al.*, 2013; MANSEGO *et al.*, 2014; PEREZ-CORNAGO *et al.*, 2014; SAMBLAS *et al.*, 2016).

Destaca-se ainda que três estudos de biomarcadores indicam que a metilação inicial dos genes *TNF- α* , *LEP* (CORDERO *et al.*, 2011; CAMPION; MILAGRO; MARTINEZ, 2009), *POMC* e *NPY* (CRUJEIRAS *et al.*, 2013), podem prever perda de peso como resposta ao final da intervenção. Especificamente, na linha de base, dietas com alta resposta mostraram níveis mais baixos de metilação na região promotora do gene *LEP* (-47%, $p < 0,05$) e *TNF- α* (-39%, $p = 0,071$, $r = 0,74$; $p = 0,021$) (CAMPION; MILAGRO; MARTINEZ, 2009) do que o grupo não respondedor, enquanto homens obesos que recuperaram o peso após a dieta apresentou maior nível de metilação no gene *POMC* (+26%; $p = 0,020$) e menor nível de metilação no gene *NPY* (-22%; $p = 0,033$) em comparação com o grupo não respondedor à dieta.

Com isso, percebe-se que a metilação do DNA de genes relacionados a obesidade é específica do tecido (adiposo subcutâneo ou visceral) e parece ser altamente afetada pelos metabólitos lipídicos e outros fatores alimentares. Não há dúvida de que as alterações na metilação do DNA em certos genes se correlacionam não apenas com o IMC e a obesidade geral, mas também com o desenvolvimento de comorbidades como DM2 ou dislipidemia (ROHDE *et al.*, 2019).

2.2. GENES

2.2.1 Leptina (*LEP*)

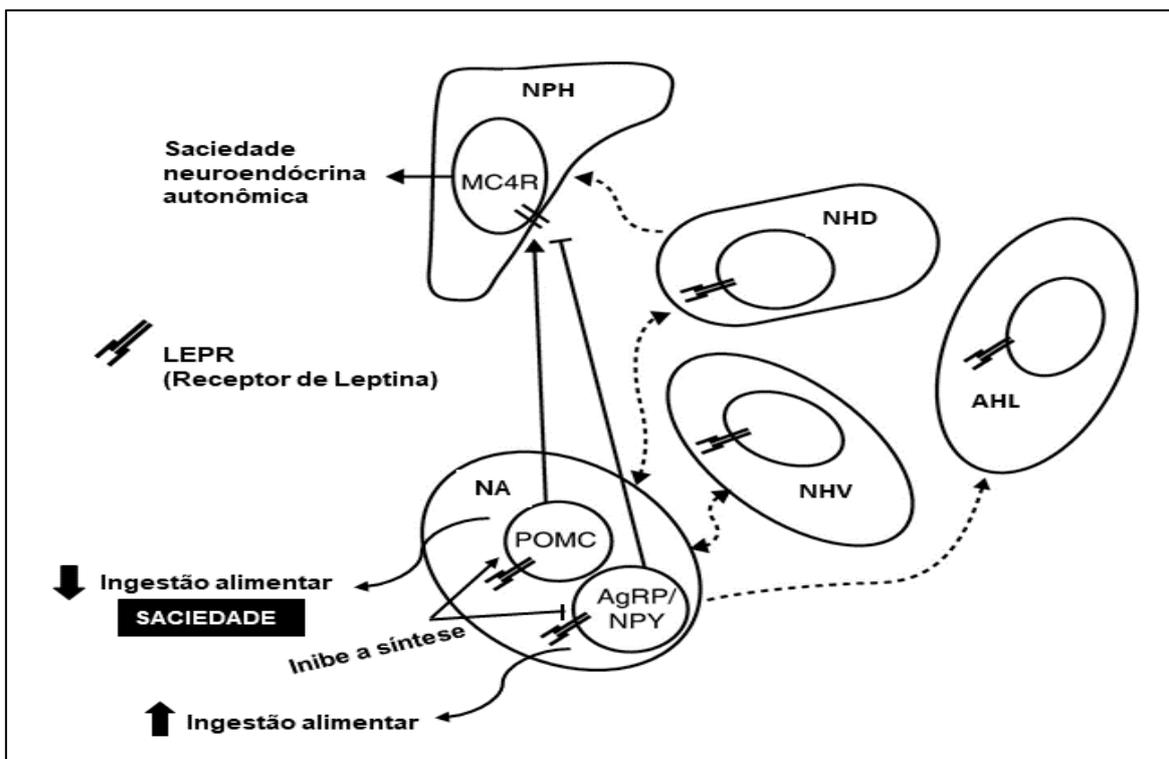
O gene *LEP* está localizado no cromossomo (chr7:128,241,278-128,257,629) e codifica a proteína leptina. A leptina é um hormônio, secretado pelo tecido adiposo que regula a homeostase energética, a função neuroendócrina, o metabolismo, a função imunológica e outros sistemas através de seus efeitos no sistema nervoso central e tecidos periféricos. Os níveis circulantes da leptina são diretamente proporcionais à quantidade de gordura corporal, refletindo assim o status dos estoques de energia a longo prazo (TURCOT *et al.*, 2018).

A leptina, interage com um circuito neural complexo e controla a ingestão de alimentos, ativando neurônios anorexigênicos que sintetizam o pró-opiomelanocortina e inibem os neurônios orexigênicos que sintetizam o peptídeo relacionado Agouti (AgRP) e neuropeptídeo Y (NPY). Além de regular a ingestão de alimentos, a leptina aumenta o gasto de energia através da atividade do nervo simpático (TURCOT *et al.*, 2018).

A leptina atua em duas vias: nos neurônios POMC e no NPY e AgRP para suprimir a ingestão de alimentos e promover o gasto de energia (MYERS;COWLEY;MUNZBERG, 2008). Um mecanismo pelo qual a leptina aumenta o gasto de energia é através da promoção da termogênese do Tecido Adiposo Marrom (TAM). A ação da leptina no hipotálamo aumenta a atividade do nervo simpático para o TAM, aumentando tanto a expressão da proteína desacopladora quanto a atividade do TAM (COMMINS *et al.*, 2000; MORRISON; MADDEN;TUPONE, 2014). O principal papel do sistema melanocortina no controle do peso corporal é ressaltado pela acentuada obesidade em humanos e roedores com mutações nulas nos genes da Leptina (*LEP*), Receptor de Leptina (*LEPR*) ou *POMC* (COLL, 2007).

Em continuidade a via de sinalização da leptina, esta sinaliza através do receptor *LEPR* reduzindo o desejo de comer e estimulando a termogênese (WUNDERLICH; HÖVELMEYER;WUNDERLICH, 2013). O *LEPR* após ser ativado induz a fosforilação de fatores de transcrição, e isso fornece a ligação metabólica entre os níveis de leptina e as muitas vias homeostáticas de energia a jusante que regula, que incluem crescimento, gasto calórico e controle glicêmico (FAIRBROTHER *et al.*, 2018), conforme figura 4.

Figura 4 – Via de sinalização hipotalâmica da Leptina



Fonte: Allison; Myers (2014); Adaptado por Chaves (2021)

Legenda: Ação hipotalâmica da leptina. A leptina atua através do seu receptor (LEPR) nos neurônios em uma série de núcleos hipotalâmicos interconectados para regular a saciedade, a função neuroendócrina e o tônus autonômico. No núcleo arqueado, a leptina controla o sistema da melanocortina por meio de suas ações opostas nos neurônios POMC e AgRP, onde a ativação do POMC inibe a síntese dos neurônios orexígenos. NA, núcleo arqueado; NHV, núcleo hipotalâmico ventromedial; NHD, núcleo hipotálamo dorsomedial; AHL, área hipotalâmica lateral; NHP, núcleo hipotalâmico paraventricular; MC4R, receptor de melanocortina 4; POMC, pró-opiomelanocortina; AgRP, peptídeo relacionado à agouti.

Além do controle comportamental em relação à ingestão de alimentos e secreção de corticosteróides adrenais, a leptina circulante induz seus efeitos via receptor de LEPR (CHEN *et al.*, 1996), a forma longa de seu receptor, que é expressa especificamente em áreas do cérebro com papel na alimentação e no gasto de energia. Em indivíduos com peso normal, se a leptina estiver diminuída devido à redução do tecido adiposo branco, como durante a fome prolongada, induzirá a sinalização orexigênica, o que resulta em menor uso de energia e interrupção da homeostase da glicose (FLAK; MYERS, 2016).

O mecanismo pelo qual essa via é desregulada é complexo e foi demonstrado que inclui fatores com níveis variados de influência, como inibição do feedback, respostas inflamatórias, glicose e estresse no retículo endoplasmático. Os níveis circulantes de leptina aumentam em humanos obesos e também em modelos animais, mas o mecanismo de feedback essencial que promove a redução do comportamento alimentar e o aumento do gasto energético falha (PAN; MYERS, 2018).

Curiosamente, os receptores de leptina continuam a responder ao aumento da leptina. Isto parece que é atingido um ponto final no obeso apesar do aumento da sinalização do receptor de leptina-leptina, mas que altos níveis contínuos de sinalização do receptor de leptina induzem resistência à leptina e "limitam" a amplitude do sinal (PAN; MYERS, 2018).

O gene *LEP* é um gene que chama atenção pois, as suas concentrações plasmáticas da proteína codificada por esse gene são aumentadas em indivíduos obesos (HOUDE *et al.*, 2015; HJORT *et al.*, 2017), e regula a transcrição do gene *POMC* que codifica a proopiomelanocortina. Independentemente da diminuição do consumo de alimentos e do peso corporal, a sinalização de leptina através de neurônios hipotalâmicos POMC que diminuem potencialmente a glicemia e aumenta a atividade locomotora, prevenindo assim a hiperglicemia de camundongos *Lepr^{db/db}* deficiente em receptores leptídeos obesos, gravemente diabéticos e hipoativos (SILVA *et al.*, 2016).

As mutações dos genes *LEP*, *LEPR*, *POMC* e Receptor de Melanocortina 4(*MC4-R*) induzem a obesidade severa em roedores e em seres humanos, ressaltando a importância da sinalização central de leptina-melanocortina para a regulação do balanço energético (PERFILYEV *et al.*, 2017). Além disso, a obesidade humana é frequentemente associada à resistência à leptina caracterizada por uma incapacidade da leptina para diminuir o peso corporal. Em geral, observa-se que a resistência à leptina é um fator relevante na patogênese da obesidade e que, dentre os mecanismos moleculares envolvidos, as modificações epigenéticas podem contribuir para a expressão da leptina e distúrbios de sinalização na obesidade (CRUJEIRAS; CASANUEVA, 2015).

Considerando que as marcas epigenéticas são reversíveis e modificáveis pelo ambiente e podem estar envolvidas na resistência à leptina associada à obesidade, as modificações epigenéticas no gene *LEP* e nos genes das suas vias de sinalização podem constituir um alvo terapêutico para o desenho de sensibilizadores de leptina para contrariar a resistência à leptina comumente observada na obesidade. Os nutrientes e compostos alimentares que demonstraram modificar ligeiramente os padrões epigenéticos de diferentes linhas e tecidos celulares poderiam ajudar a induzir a sensibilidade à leptina e a melhorar o fenótipo obesogênico (CRUJEIRAS; CASANUEVA, 2015).

Alguns estudiosos relataram que variantes genéticas nos genes das adipocinas, especificamente o gene *LEP* da leptina e Adiponectina (*ADIPOQ*), estão associadas ao IMC e à adiposidade central. A leptina sinaliza ao hipotálamo que os requisitos de energia estão sendo atendidos e que não é necessária mais ingestão de alimentos (LAURSEN *et al.*, 2017).

A leptina também ativa neurônios anorexígenos e orexigênicos que são responsáveis pela inibição e estimulação da alimentação, respectivamente. O aumento da leptina e a diminuição das concentrações de adiponectina podem reduzir o apetite e a ingestão calórica e, portanto, resultar em um balanço energético mais negativo (KROLL *et al.*, 2019).

2.2.2 Proopiomelanocortina (POMC)

O gene *POMC* está localizado no cromossomo (chr2:25,160,853-25,168,903) e codifica a proteína proopiomelanocortina. O proopiomelanocortina, é um pró-hormônio, que origina numerosos peptídeos e hormônios ativos com uma ampla gama de fatores e ações fisiológicas. No cérebro, o *POMC* é expresso no núcleo arqueado (ARC) do hipotálamo, da hipófise e do tronco encefálico. A proteólise pós-translacional específica do tecido do *POMC* dá origem aos hormônios ativos ACTH (hormônio adrenocorticotrópico), α -, β - e γ -MSH (hormônio estimulador de melanócitos) e β -endorfina. Populações diferentes de neurônios POMC produzem quantidades diferentes de hormônios ativos dependentes dos níveis de expressão de conversões de pró-hormônios, por exemplo: - os corticotróficos da hipófise anterior produzem predominantemente ACTH, enquanto os melanotróficos do hipotálamo produzem predominantemente α - e β -MSH (TODA *et al.*, 2017).

Windholz *et al.*, (2017), citaram como sendo o *LEP* e *POMC* os genes da obesidade. Um conjunto diferente de neurônios produz a pró-opiomelanocortina - peptídeos de melanocortina derivados, que atuam como fatores de saciedade (HENRY *et al.*, 2015). Vários são os estudos que investigam os genes *LEP* e *POMC* em ratos (KLEIN; TYRLIKOVA, 2017; CIFANI *et al.*, 2015; DESAI;HANG;ROSS, 2016), porém são escassos estudos em humanos. Perfilyev *et al.*, (2017) e Crujeiras *et al.*, (2013) sugeriram que a metilação do DNA do gene *POMC* no sangue podem prever a recuperação do peso após a dieta hipocalórica.

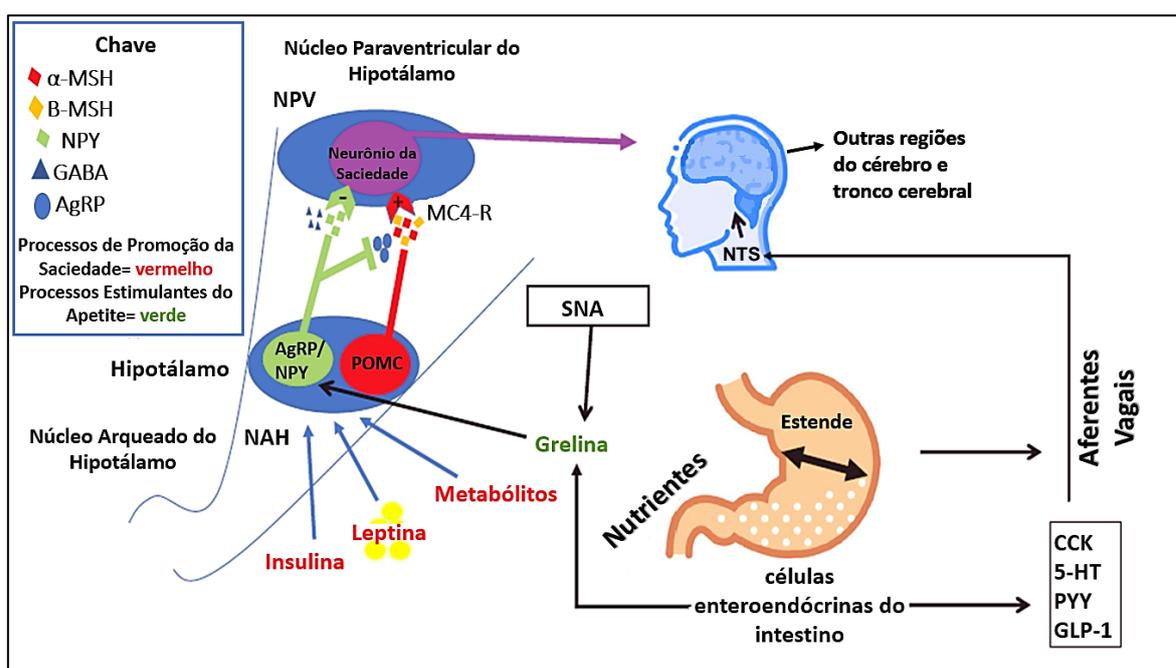
O *POMC* é um componente essencial do sistema da melanocortina, uma complexa rede de sinais sistêmicos e vias neurais que regulam a ingestão de alimentos e o balanço energético. Os neurônios hipotalâmicos POMC se ligam com a Leptina (BALTHASAR *et al.*, 2004), glicose (PARTON *et al.*, 2007) e insulina (QIU *et al.*, 2014) e regulam o balanço energético ao induzir saciedade e aumento do gasto energético (TODA *et al.*, 2017).

A saciedade através da ativação do gene *POMC* é mediada por ações de α - e β -MSH no MC4R, do Núcleo Paraventricular (PVN) hipotalâmico. Um grupo oposto de neurônios orexígenos, peptídeo relacionado à gouti (AgRP) e neuropeptídeo Y (NPY) recebe entradas

sistêmicas da grelina (liberadas por enteroendócrinas células) e têm a ação oposta aumentando o apetite e diminuindo gasto energético antagonizando o MC4R e inibindo diretamente neurônios da saciedade no PVN (TODA *et al.*, 2017; ANDERMANN; LOWELL, 2017).

O término da refeição (saciedade) é causado pela ativação de aferentes vagais dos receptores de estiramento do estômago e pela liberação induzida por nutrientes de fatores enteroendócrinos (CCK, 5HT, PYY, GLP-1). Os aferentes vagais enviam projeções para o NTS (Núcleo do Trato Solitário) para provocar o término da refeição (CANDLER *et al.*, 2019), conforme Figura 5.

Figura 5 - Diagrama esquemático do sistema melanocortina e controle do apetite e saciedade.



Fonte: Candler *et al.* 2019; Adaptado por Chaves (2021)

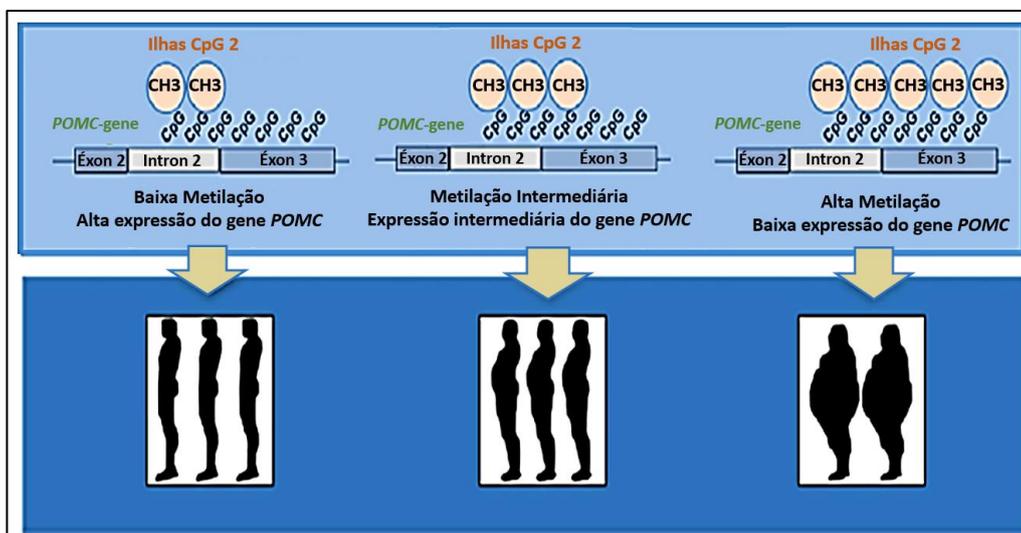
Legenda: POMC; Proopiomelanocortina, AgRP; Peptídeo relacionado à Agouti, NPY; neuropeptídeo Y, α -MSH; hormônio estimulador do alfa-melanócito, β -MSH; hormônio estimulador de beta-melanócitos, MC4R; receptores de melanocortina 4, GABA; ácido gama-aminobutírico, NTS; núcleo do trato solitário, CCK; colecistoquinina, 5HT; 5-hidroxitriptamina, PYY; Péptido YY, GLP-1; peptídeo 1 do tipo glucagon, ARC; núcleo arqueado do hipotálamo, NPV; núcleo paraventricular do hipotálamo, ANS; sistema nervoso autônomo.

Perturbações do sistema de melanocortina podem levar a distúrbios do balanço energético, como obesidade. Por exemplo, indivíduos com mutações bi-alélicas de perda de função no POMC demonstram precocemente hiperfagia, obesidade grave (devido à deficiência de α - / β -MSH) e insuficiência adrenal (devido à deficiência de ACTH). Foi demonstrado que os portadores de variantes heterozigotas têm um aumento do risco de desenvolver obesidade, mas sem insuficiência adrenal (FAROOQI *et al.*, 2006) sugerindo um efeito de dosagem gênica no balanço energético.

A expressão hipotalâmica no gene *POMC* é regulada principalmente pela leptina circulante periférica. Mediada pelo receptor de leptina na região hipotalâmica a ligação da leptina aos neurônios do *POMC* ativam um mecanismo de transdução de sinal que inclui a ativação e a ligação de vários fatores de transcrição para a região promotora no gene *POMC*. Verificou-se que, em formas comuns de obesidade, os animais e seres humanos tornam-se resistentes à leptina, um fenômeno associado à redução da regulação da homeostase energética (MARCO *et al.*, 2014).

O gene *POMC* é relatado na literatura por representar um bom candidato para investigar os efeitos potenciais das diferenças de metilação na expressão gênica e na obesidade, por meio do IMC (KÜHNEN *et al.*, 2016) e ainda encontraram-se na literatura, estudos com adultos e análise de metilação no sangue, em que a metilação do *POMC* humano está correlacionada com o peso corporal individual, como pode-se observar na Figura 6.

Figura 6 - Relação da metilação do DNA com o gene *POMC*.



Fonte: Adaptado de Kühnen *et al.* 2016.

Em relação aos estudos com animais, Zheng *et al.*, (2014), verificaram ratos foram expostos a uma dieta de alta energia na gestação e uma dieta de alta energia pós-natal, observou-se um efeito modulador na metilação do gene *POMC*. Com dois grupos de ratos; FS-FS (dieta com alto teor de gordura e sacarose, fornecida às mães e filhos do desmame) e C-C (dieta de controle alimentada às mães e filhos do desmame). O grupo FS-FS demonstrou maior massa corporal e peso na idade adulta, embora com maior expressão de *POMC* e menor nível de metilação médio na região promotora do gene *POMC* em comparação aos controles (metilação média \pm DP = FS-FS $37,5 \pm 1,7\%$ vs C-C $46,3 \pm 3,5\%$, $p = 0,03$). Apesar

de examinar a mesma região genômica, isso é diferente da observação relatada por Marco *et al.*, (2014, 2016), em que foi relatada maior nível de metilação do *POMC* em filhotes expostos a uma dieta rica em gordura na gestação.

Nos estudos realizados por Marco *et al.*, (2014, 2016), os filhotes foram desmamados com uma dieta isocalórica e, portanto, as diferentes dietas pós-natais poderiam explicar a diferença na metilação do *POMC* relatada após a exposição de alta energia na gestação. Outra explicação potencial é que Zheng *et al.*, (2014) estudaram ratos machos desde o desmame, em contraste com o uso de ratos fêmeas (para análise de expressão / metilação hormonal e *POMC*) examinadas por Marco *et al.*, (2014).

Em resumo, há uma forte evidência de uma associação entre uma dieta rica em gordura no pré-natal e a hipermetilação da prole nas regiões reguladoras do *POMC* que persistem até a idade adulta (MARCO *et al.*, 2014; MARCO *et al.*, 2016; RAMAMOORTHY *et al.*, 2018). Foi relatado um potencial efeito modulador da dieta FS (gordura e sacarose) pós-natal na metilação do *POMC* (ZHENG *et al.* 2014), no entanto, Ramamoorthy *et al.* (2018), não demonstraram influência adicional de uma dieta pós-natal de alta energia sobre a hipermetilação já observada naquelas com exposição pré-natal à dieta rica em gordura.

Kuhnen *et al.*, (2012), foram os primeiros a examinar a relação entre metilação do gene *POMC* e obesidade em humanos. Em um estudo de caso-controle comparando 71 crianças obesas e 36 com peso normal, eles relataram uma diferença significativa na metilação de *POMC* em uma região variável metilada (RVM) sobrepondo o limite de intron2 / exon3 (metilação 25% peso normal vs. 40% obeso, $p < 0,001$). Esse achado foi replicado em um segundo estudo de caso-controle em crianças com resultados comparáveis.

Uma associação entre hipermetilação do *POMC* na RVM e IMC foi demonstrada nos neurônios de cadáveres adultos. Um aumento de 10% na metilação foi associado a um aumento de 2,8 kg / m² no IMC (KÜHNEN *et al.* 2016). Não houve associação entre IMC e metilação do DNA na ilha CpG na região promotora do *POMC* (KUHNNEN *et al.*, 2012).

Existem evidências em crianças e adultos de que a hipermetilação na RVM do gene *POMC* RVM no intron2 / exon3 está associado à obesidade (KUHNNEN *et al.*, 2012, KÜHNEN *et al.*, 2016). Há um número de evidências que sugerem que essa região do gene *POMC* é supostamente influenciado por fatores nutricionais e status periconcepcionais. Associação entre metilação do gene *POMC* e peso corporal não foi replicado em outros estudos que examinaram diferentes regiões do gene (YOO *et al.*, 2014; ÁCS *et al.*, 2017; KWON *et al.*, 2018). Os resultados de dois estudos em crianças mostram uma associação

entre Metilação do gene *POMC* no exon 3 e níveis alterados de lipídios (YOO *et al.*, 2014; KWON *et al.*, 2018).

Há também evidências preliminares em crianças que a metilação do gene *POMC* está associada à elevada insulina em jejum (YOO *et al.*, 2014). Crujeiras *et al.*, (2013), relataram uma associação entre a hipermetilação na região promotora do gene *POMC* e recuperação de peso após uma intervenção de controle de peso que demonstra como a medição de metilação do gene *POMC* pode informar a estratificação de risco clínico e ajudar a orientar intervenções personalizadas.

Porém, há também relatos de associações entre a metilação do gene *POMC* e resultados metabólicos que parecem independentes do IMC ou adiposidade. Yoo *et al.*, (2014), relataram triglicerídeos significativamente mais altos em jejum (embora não colesterol total) nas crianças com idade 7 a 9 anos nos grupos que apresentaram maiores níveis de metilação do gene *POMC* comparado ao grupo com menos níveis de metilação. Isso ocorre apesar de não haver diferença no IMC ou no percentual de gordura corporal entre os grupos. Kwon *et al.*, (2018), relataram associação significativa entre a metilação no sítio CpG no éxon 3 e os níveis mais baixos de colesterol HDL (lipoproteína de alta densidade) ($\beta = -0,23$, $p = 0,048$) após o ajuste para idade, sexo e IMC.

2.3 COMPOSTOS DIETÉTICOS ANTIOXIDANTES

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

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

O consumo de vegetais tem sido associado com a diminuição da incidência e mortalidade por uma variedade de doenças relacionadas com a obesidade, incluindo diabetes tipo 2 e as doenças cardiovasculares (COOPER *et al.*, 2012; HERMSDORFF *et al.*, 2010), que são condições de estresse oxidativo e inflamação crônica (KIZHAKKUTTU;

WIDLANSKY, 2010). Estas associações têm sido atribuídas ou a uma interação entre micro e macronutrientes ou aos nutrientes isolados.

Nos últimos anos, uma série de estudos estão sendo realizados para entender a influência de diferentes compostos nutricionais (macronutrientes, micronutrientes, fitoquímicos, antioxidantes, etc.) sobre a alteração de modificações epigenéticas e, conseqüentemente, na regulação da expressão gênica e a probabilidade de desenvolver ou prevenir doenças (MARTINEZ *et al.*, 2014).

Os micronutrientes modulam o sistema imunológico e exercem uma ação protetora ao reduzir a oxidação de LDL-colesterol através da indução de enzimas antioxidantes (BEYDOUN *et al.*, 2011). Para Jones (2012), um fator importante para se estudar a metilação do DNA, é o fato de poder ser modificada por fatores ambientais e intrínsecos. Portanto, a dieta é um fator muito influente na origem da doença metabólica, e ambos os componentes dietéticos específicos, bem como mudanças de regimes alimentares globais podem afetar os níveis de metilação do DNA (JACOBSEN *et al.*, 2012).

2.3.1 Caracterização do Folato e Ácido Fólico e recomendações nutricionais

A palavra folato é de origem latina *folium* (folha), nutriente naturalmente derivado de alimentos, principalmente de vegetais folhosos verdes escuros. O ácido fólico, por sua vez, tem várias denominações como vitamina B9, folacin, vitamina M, Folvite, ácido pteroil-L-glutâmico entre outras (Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia., 2021), uma vitamina hidrossolúvel sinteticamente produzida e encontrada em suplementos e alimentos fortificados, a forma sintética do folato. Assim embora os termos ácido fólico e folato sejam usados alternadamente, seus efeitos metabólicos são distintos (WIEN *et al.*, 2012; NIH, 2014; SAINI; NILE; KEUM, 2016).

O folato encontrado nos alimentos é constituído por uma mistura de poliglutamatos reduzidos, estando presente, em sua maioria, em vegetais de cor verde, leguminosas e frutas cítricas (NIH, 2014). O ácido fólico (monoglutamato) é um membro sintético da família do folato comumente usado em alimentos e suplementos fortificados devido à sua estabilidade e baixo custo (CHAN; BAYLER; O'CONNOR, 2013).

A quantidade de ingestão recomendada varia entre 200 a 400 mcg, no entanto a recomendação mais aceita é a proposta pela OMS (Organização Mundial de Saúde), que é de 400 mcg/dia (FAO, 2001). Um consumo adequado deste nutriente, em sua forma natural

ou sintética, é importante para intervenções de redução dos níveis de homocisteína e prevenção de doenças (KRAWINKEL *et al.*, 2014).

A fortificação dos alimentos e a utilização de suplementos com ácido fólico para efeitos de promoção da saúde possuem *pool* crescente de evidências auxiliando na prevenção e também no tratamento de doenças, especialmente em ensaios como um medicamento anti câncer. Apesar do efeito da suplementação de ácido fólico durante o período de pré concepção na redução da incidência de defeitos do tubo neural esteja bem consolidada (YI *et al.* 2011; MARCHETTA *et al.* 2015; WHO, 2015; GROSSE *et al.* 2016), os resultados acerca deste efeito em outras doenças ainda é contraditório, necessitando de novos estudos (LIEW, 2017).

A eficácia da suplementação de ácido fólico na dieta sobre a redução do risco de doença cardiovascular, aneurisma aórtico abdominal, tem sido cada vez mais evidenciada em meta-análises com humanos e ratos, nas quais foram observadas. O aumento das concentrações de folato no sangue, redução da homocisteína e diminuição da peroxidação de LDL (LI *et al.*, 2016).

Evidências observacionais humanas associaram a alta ingestão de ácido fólico ao aumento do risco de câncer colorretal e de próstata (FIFE *et al.*, 2011); função imune prejudicada (SAWAENGSRISRI *et al.*, 2016) e cognição prejudicada (MORRIS *et al.*, 2005). Evidências observacionais adicionais associaram o status de folato à obesidade, desencadeando investigações sobre a relação entre a ingestão de ácido fólico e o metabolismo lipídico e energético (BIRD *et al.*, 2015).

Van Wijk *et al.*, (2012), sugeriram em seu estudo que o ácido fólico na dieta, pode influenciar o perfil de ácidos graxos, particularmente o ácido docosa-hexaenóico (DHA), um importante ácido graxo ômega-3, por induzir a síntese de fosfolípidos tais como fosfatidilcolina e fosfatidil etanolamina.

2.4 LIPÍDIOS DIETÉTICOS E RECOMENDAÇÕES NUTRICIONAIS

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

Posteriormente, para controlar a obesidade, as diretrizes alimentares têm focado na redução da ingestão total de gordura por quase quatro décadas. Mesmo após um grande conjunto de evidências mostrarem os efeitos benéficos à saúde dos ácidos graxos insaturados, as restrições totais de gordura permaneceram, bem como o aumento gradual na prevalência global de sobrepeso e obesidade (BEULEN *et al.*, 2018).

A diretriz europeia de obesidade para adulto recomenda primariamente a redução de alimentos ricos em gordura, principalmente em gordura saturada, além da diminuição de carboidratos refinados, açúcar e bebidas açucaradas. A dieta mediterrânea é apresentada com um bom perfil de gorduras, contendo alimentos ricos em ácidos graxos ômega-3 e monoinsaturadas, como as nozes, queijo de cabra, azeite e abacate (SCHUTZ *et al.*, 2019).

Tradicionalmente, os óleos e gorduras alimentares são vistos apenas pelo seu conteúdo energético, com base no consumo energético excessivo, ao desenvolvimento da obesidade e ao aumento do risco de doenças cardiometabólicas. Essa visão levou à promulgação de recomendações alimentares com base na ingestão total de gordura e, posteriormente, a recomendações amplas sobre frações de ácidos graxos (saturados *versus* insaturados) (SCHWAB *et al.*, 2014).

No entanto, evidências mais recentes apresentam uma visão mais sutil; os efeitos metabólicos dos lipídios sobre a saúde, podem variar de acordo com suas composições específicas de ácidos graxos e estruturas moleculares (SCHWAB *et al.*, 2014).

Os lipídios da dieta consistem principalmente de triglicerídeos, uma molécula composta por três ácidos graxos e um esqueleto de glicerol. Os ácidos graxos diferem em vários aspectos: - Primeiro, eles são caracterizados pelo número de ligações dupla. Os ácidos graxos saturados (AGS) não têm ligações dupla, enquanto os ácidos graxos monoinsaturados (AGM) têm uma ligação dupla e os ácidos graxos poliinsaturados (AGP) têm duas ou mais ligações dupla. Essas ligações dupla têm a configuração cis ou trans. A maioria dos ácidos graxos insaturados da dieta tem a configuração cis, mas os ácidos graxos trans (AGT) também estão presentes; - Segundo, a posição da ligação dupla varia; - Terceiro, os ácidos graxos diferem no comprimento da cadeia, embora o número de átomos de carbono seja geralmente um número par (MENSINK, 2016).

O AGS mais abundante na dieta possui 16 (C16: 0; ácido palmítico) ou 18 (C18: 0; ácido esteárico) átomos de carbono, enquanto proporções menores de AGS têm 14 (C14: 0; ácido mirístico) ou 12 (C12: 0; ácido láurico) átomos de carbono. Algumas gorduras (por exemplo, óleo de coco e gordura láctea) também contêm ácidos graxos com menos de 12 átomos de carbono. O cis-AGM mais abundante é o ácido oléico (C18: 1), e o cis-AGP mais

abundante é o ácido linoléico (C18: 2n-6) e o ácido α -linolênico (C18: 3n-3). As evidências existentes sugerem que a ingestão de ácidos graxos é um dos principais determinantes do perfil lipídico e lipoprotéico sérico (MENSINK, 2016).

Em condições experimentais, os ácidos graxos da dieta modulam o equilíbrio de energia devido ao comprimento da cadeia, ao grau de insaturação e à posição e configuração de ligações duplas que afetam seu destino metabólico. Cadeia curta (C: 2-4) e cadeia média (C: 6-12), os ácidos graxos aumentam o gasto de energia devido à sua oxidação preferencial versus esterificação, mas são consumidos em quantidades relativamente baixas (<1% energia) na dieta americana (RAATZ *et al.*, 2017).

Reduzir ácidos graxos específicos, em vez de redução da gordura total, poderia reduzir eventos cardiovasculares em 14% (HOOPER *et al.*, 2016), tal redução é justificada por uma pequena escala de estudos nutricionais em voluntários com síndrome metabólica onde demonstraram que uma dieta com gorduras monoinsaturadas melhora a função endotelial pós-prandial e diminuição plasmática do ICAM-1 (Molécula de Adesão Intracelular 1) solúvel, em comparação com uma dieta enriquecida em gorduras saturadas (PEREZ-MARTINEZ *et al.*, 2010).

A OMS recomenda uma redução das gorduras saturadas para <10% de energia diária com a substituição de carboidratos ou gorduras monoinsaturadas, para a prevenção das doenças cardiovasculares (CHANG *et al.*, 2016). Já, as Diretrizes Dietéticas (USDA, 2010) para Americanos, recomendam que menos de 10% das calorias sejam consumidas como gordura saturada, além de destacar que o consumo menor que 7% de calorias provenientes de gordura saturada podem reduzir ainda mais o risco das doenças cardiovasculares.

Corroborando com estes estudos, Frahnou *et al.*, (2017), reiteraram que dietas ricas em gordura, enriquecidas em ácidos graxos saturados, não sejam saudáveis, induzindo dislipidemia e resistência à insulina, aumentando a inflamação vascular e promovendo a obesidade.

2.4.1 Óleo de Avelã

Por definição, os nozes são frutos secos, com uma semente em que a parede do ovário torna-se difícil na maturidade. Entre as mais populares nozes comestíveis, destacam-se: Amêndoas (*Prunus amygdalis*), Avelãs (avelã), Nozes (*Juglans regia*), e Pistácios (*Pistachia vera*). Outras nozes comestíveis comuns são Pinhões (*Pinus pinea*), Castanha de caju (*Anacardium occidentale*), Nozes pecãs (*Carya illinoensis*), Macadâmia (*Macadamia*

integrifolia) e Castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*). A definição dos consumidores também inclui Amendoim (*Arachis hypogaea*), que são botanicamente amendoim, mas são amplamente identificados como parte do grupo de alimentos denominado nozes (BRUFAU; BOATELLA; RAFECAS, 2006; ROS; MATAIX, 2006).

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

Em estudos de intervenção observou-se os efeitos benéficos de nutrientes e compostos bioativos de alimentos na regulação de expressões gênicas. Nesse sentido, foi relatado que consumir uma dieta mediterrânea reduz a expressão pós-prandial de genes que codificam proteínas relacionadas à inflamação, estresse do retículo endoplasmático, aterogênese e estresse oxidativo (YUBERO-SERRANO *et al.*, 2012; CAMARGO *et al.*, 2012). Além disso, a alta ingestão de ácidos graxos monoinsaturados através do consumo de azeite tem sido associada a uma baixa expressão de genes envolvidos na inflamação e armazenamento lipídico anormal (CAMARGO *et al.*, 2012; VARELA *et al.*, 2013).

O consumo destas fontes de lipídios tendem a ser mais comum na dieta mediterrânea, como o azeite de oliva e nozes, com estudos relatando que estas dietas são uma estratégia tão ou mais eficaz para perda de peso (ESPOSITO *et al.*, 2011).

Quanto ao perfil lipídico as nozes são consideradas benéficas, devido ao seu baixo conteúdo em ácidos graxos saturados e rica em ácidos graxos mono e poli-insaturadas, como observa-se na Tabela 1. Quando comparada as outras nozes a avelã se destaca na quantidade de ácido fólico (113mg) sendo a mais rica neste nutriente, está em segundo lugar quanto ao teor de ácidos graxos monoinsaturados (45,7g) (USDA, 2017).

Tabela 1 - Composição média dos nutrientes por 100g.

Nozes	Calorias (kJ)	Lipídio (g)	AGS (g)	AGM (g)	AGP (g)	LA (g)	ALA (g)	Fibras (g)	Ác. Fólico (µg)
Amêndoas	2418	50,6	3,9	32,2	12,2	12,2	0,00	8,8	29
Castanha do Brasil (Pará)	2743	66,4	15,1	24,5	20,6	20,5	0,05	8,5	22

Nozes	Calorias (kJ)	Lipídio (g)	AGS (g)	AGM (g)	AGP (g)	LA (g)	ALA (g)	Fibras (g)	Ác. Fólico (µg)
Castanha do Brasil	2314	46,4	9,2	27,3	7,8	7,7	0,15	5,9	25
Avelã	2629	60,8	4,5	45,7	7,9	7,8	0,09	10,4	113
Macadâmia	3004	75,8	12,1	58,9	1,5	1,3	0,21	6,0	11
Amendoins	2220	49,2	6,8	24,4	15,6	15,6	0,00	25,8	8,5
Noz pecã	2889	72,0	6,2	40,8	21,6	20,6	1,00	9,2	8,4
Pinhões (seco)	2816	68,4	4,9	18,8	34,1	33,2	0,16	3,7	34
Pistache	2332	44,4	5,4	23,3	13,5	13,2	0,25	9,0	51
Nozes	2738	65,2	6,1	8,9	47,2	38,1	9,08	6,4	98

Abreviações: AGS, ácidos graxos saturado ; AGM, ácidos graxos monoinsaturados; AGP, ácidos graxos poliinsaturados; LA, ácido linoleico (ômega 6); ALA, ácido α -linolênico (ômega 3).

Fonte: US Department of Agriculture Nutrient Data Base at: http://www.nal.usda.gov/fnic/cgi-bin/nut_search.pl (Acessado em 12 Ago 2017).

A proporção de ácidos graxos insaturados/saturados do óleo de avelã é tida como alta (em média 13:1). Além disso, a proporção de ácidos graxos polinsaturados/saturados foi de 1,23:2,87 nas variedades de avelã. Sabe-se que conselhos dietéticos tendem a diminuir a quantidade de gorduras totais e colesterol para atingir uma proporção de AGP/AGS maior que 1. Avelãs podem ser correlacionadas com prevenção de doenças cardiovasculares por causa de sua composição de ácidos graxos, baseada principalmente em AGM que protegem as lipoproteínas de baixa densidade contra a oxidação (POURFARZARD; MEHPOUR, 2017).

Damavandi *et al.* (2013), demonstraram que a substituição de 10% do total de calorias diárias com avelãs cruas sem sal poderiam preservar o colesterol da lipoproteína de alta densidade em pacientes com diabetes tipo 2, mas não foi visto na glicemia de jejum, colesterol total, colesterol de lipoproteína de baixa densidade e níveis de triglicerídeos.

Perna *et al.* (2016), realizaram uma revisão sistemática e uma meta-análise para avaliar as consequências de vários ensaios e estimar o resultado global do consumo de avelãs no perfil sérico de lipídios e resultados de peso corporal. Os resultados mostraram que uma dieta enriquecida com avelã diminuiu o LDL-C e mostra uma tendência para a redução do colesterol total, sem diminuir HDL-C, enquanto os triglicerídeos e IMC permanecem substancialmente inalterados.

Estes dados verificaram um efeito potencialmente favorável na doença cardiovascular, propondo a necessidade de mais pesquisas com estudos de intervenção a longo prazo e grandes grupos de estudo, a fim de confirmar subsequentemente e apoiar o consumo de avelãs para beneficiar o padrão de colesterol fisiológico no soro (Perna *et al.* 2016).

2.5 PERFIL LIPÍDICO ASSOCIADO A OBESIDADE

As Doenças Cardiovasculares (DCV) são um exemplo das doenças não transmissíveis mais predominantes, amplamente conhecidas como a principal causa de mortalidade no mundo, estando associados com a obesidade e dislipidemia (NASCIMENTO *et al.* 2012).

O perfil lipídico alterado mais comum associado à obesidade são triglicerídeos e LDL-C elevados e níveis reduzidos de HDL-C, já altos níveis séricos de HDL-C estão associados à longevidade e o baixo nível de HDL-C está associado a um risco cardiovascular aumentado, particularmente se o colesterol sérico e os TGs também estiverem elevados. Entre diferentes características que contribuem para a síndrome metabólica, um perfil lipoproteico anormal desempenha o papel básico, com valores de LDL-C atingindo o parâmetro padrão-ouro para avaliação do risco de DCV (MILYANI; AL-AGHA, 2019).

Sob condições normais, o corpo mantém a homeostase da gordura através de um equilíbrio finamente ajustado entre a síntese e o catabolismo dos ácidos graxos. Quando a ingestão de gordura excede as necessidades metabólicas do corpo, o excesso de gordura se acumula como triglicerídeo no tecido adiposo (GRADINARU *et al.*, 2015).

O acúmulo prolongado de gordura e a sobrecarga dos estoques adiposos acabam levando a um transbordamento de gordura, o que leva ao aumento dos níveis lipídicos na circulação, na forma de LDL e acúmulo hepático, causando esteatose. É esse excesso lipídico que constitui a fração gordurosa responsável pelo fenômeno da lipotoxicidade. O LDL plasmático elevado interage com o ânion superóxido ($O \cdot^- 2$), levando à produção de LDLs oxidados, que são indutores primários da desregulação das células endoteliais e promovem apoptose e eventos cardiovasculares (GRADINARU *et al.*, 2015).

A obesidade está, geralmente, associada a aumento de Triglicerídeos no plasma. A dislipidemia inclui hipertrigliceridemia, redução HDL-C e aumento do número de partículas pequenas e densas de LDL. Segundo a OMS, os distúrbios cardiovasculares são uma das morbimortalidades responsáveis por 3 em cada 10 mortes devido à dislipidemia. É previsto

um aumento para a morte anual de 23,3 milhões até 2035. A dislipidemia é um importante fator de risco para Doença Cardíaca Coronária (DCC), que é a principal causa de morte nos Estados Unidos (SUNEETHA, 2018).

2.6 SOBREPESO E OBESIDADE

A prevalência da obesidade quase triplicou nas últimas décadas e representa um problema de saúde pública. A obesidade é o resultado de um desequilíbrio crônico de energia, pelo qual a ingestão de energia excede o gasto energético. Existem diferentes fatores que levam a esse desequilíbrio e, potencialmente, ao excesso de peso corporal, incluindo acesso a alimentos de baixo custo, com baixo valor nutricional e energia, estilo de vida sedentário, comportamento alimentar e aumento do consumo de alimentos processados, industrializados, bebidas açucaradas, entre outros (JIANG *et al.*, 2018).

Alguns autores também indicam que o gasto total de energia é impulsionado pela atividade diária total, que é determinada principalmente pela ocupação. No entanto, na última década, alguns estudiosos demonstraram uma contribuição genética para o consumo de energia (HASSELBALCH, 2010; LIVINGSTONE *et al.*, 2015).

A obesidade é uma doença crônica que acomete grande parte da população mundial. Para classificar esta condição em adultos, existem vários indicadores, dentre eles o IMC que é um indicador considerado simples, onde o peso corporal (kg) é dividido pelo quadrado da altura em metros (kg/m^2). Segundo a OMS, um indivíduo com um $\text{IMC} \geq 25$ é considerado com sobrepeso e um $\text{IMC} \geq 30$ é considerado obeso (WHO, 2016). O IMC pode ser complementado pela medição da circunferência da cintura para discriminar a obesidade subcutânea e a obesidade visceral (SAHAKYAN *et al.*, 2015).

De acordo com a OMS (2018), cerca de 39% da população mundial está acima do peso e 13% está obesa. No Brasil, o panorama da obesidade está em concordância com o quadro mundial, pesquisas apontam que mais de 50% da população está acima do peso (ABESO, 2016).

Isto é um dado bastante preocupante, pois indivíduos obesos apresentam um estado crônico subclínico de inflamação, levando a múltiplos distúrbios metabólicos, alterações no tecido adiposo reflete no estresse oxidativo, que é um desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes, estas reações causam danos oxidativos no DNA que pode levar a consequências deletérias à integridade do genoma (LUMENG *et al.*, 2007; BERQUIST; WILSON, 2012; CAO, 2014).

A obesidade além de ser considerada um dos maiores problemas de saúde pública do mundo, contribui para o aumento do risco de diversas outras doenças crônicas, tais como hipertensão, doenças cardiovasculares, intolerância a glicose, dislipidemia, diabetes mellitus tipo 2 e outras co-morbidades (ELIA; CONDORELLI, 2015).

A alimentação é um fator crucial, envolvido na fisiologia da obesidade, de modo que a ingestão de alimentos em excesso e permanente, pode ter um efeito deletério levando ao estresse oxidativo, inflamação crônica, disfunção a nível mitocondrial e adiposidade (CAMPS *et al.*, 2016). Neste sentido, a obesidade desencadeia, através de processos inflamatórios e estresse oxidativo gerados pelo excesso de tecido adiposo, diversas outras doenças crônicas não transmissíveis tais como hipertensão arterial, doenças cardiovasculares e diabetes mellitus (WU *et al.*, 2016).

Na obesidade, observa-se o tecido adiposo marrom, pensado para essencialmente desaparecer no primeiro ano de vida, e o tecido adiposo branco, considerado secretor de mediadores inflamatórios, provavelmente contribui para complicações secundárias, como o diabetes mellitus tipo 2 (BENTON *et al.*, 2015).

O tecido adiposo branco desempenha um papel importante na inflamação, às concentrações séricas de vários marcadores inflamatórios, incluindo o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e a interleucina-6 (IL-6) são elevadas em indivíduos com excesso de peso e obesos. A obesidade, especialmente obesidade visceral, é agora vista como uma doença inflamatória de baixo grau (DAHLMAN *et al.*, 2015).

A inflamação crônica sistêmica contribui para ansiedade, depressão, declínio cognitivo, resistência à insulina e princípio de diabetes mellitus tipo 2 em adultos, obesidade e doença de Parkinson. Um estudo de base populacional com adultos obesos, objetivando avaliar a associação entre a dor crônica e obesidade, concluiu que as pessoas que eram obesas mostraram-se duas vezes mais propensas a ter dor que interferia moderadamente ou extremamente com as atividades da vida diária, havendo uma forte associação entre dor crônica e obesidade (ALLEN *et al.*, 2016; RESCIGNO *et al.*, 2017). O *status* de obesidade, considerando um alto índice de massa corporal, foi atribuído ao aumento de um ambiente "obesogênico", que inclina o equilíbrio entre a ingestão e gasto energético, impulsionando os indivíduos para o aumento da adiposidade ao longo de linhas ambientalmente determinadas. Apesar disso, é importante perceber que, dentro do mesmo ambiente, nem todos os indivíduos tornam-se com excesso de peso ou desenvolvem obesidade (GONZÁLEZ-MUNIESA *et al.*, 2017).

Na perspectiva da obesidade também deve-se levar em consideração o *status* socioeconômico, o ambiente e os comportamentos pessoais e as interações genótipo-fenotípico para entender a obesidade, pois todos esses fatores afetam a ingestão de alimentos, o *turnover* dos nutrientes, a termogênese e a utilização lipídica de ácidos graxos. O controle do peso corporal e a composição deve considerar a ingestão e o gasto energético e a deposição de gordura, que estão interligados e sob uma regulação integral pelos sistemas neural e endócrino (BHUPATHIRAJU; HU, 2016).

3 ABORDAGEM METODOLÓGICA

3.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo clínico de intervenção duplo cego, placebo, controlado, 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.* 2016), financiado pela FAPESQ/MS/CNPq, aprovado através do edital 001/2013, que

foi conduzida no período de maio de 2015 a março de 2016, o qual gerou um banco de dados representativo da população das zonas leste e oeste do Município de João Pessoa, Paraíba.

3.1.1 Questões éticas

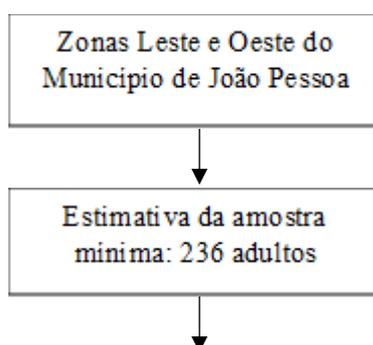
O estudo de base populacional ao qual está vinculado a presente tese, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da UFPB, sob protocolo nº 0559/2013 (APÊNDICE A), assim como, o estudo de intervenção, aprovado sob o nº 0478/2015, CAAE: 48703115.0.0000.5188 (APÊNDICE B). Ambos os estudos seguiram as normas éticas para pesquisa envolvendo seres humanos, constantes da Resolução 466/2012 do Conselho Nacional da Saúde/Comissão Nacional de Ética em Pesquisa. A presente pesquisa foi também submetida e cadastrada no Clinical Trials, sob o número NCT 02846025.

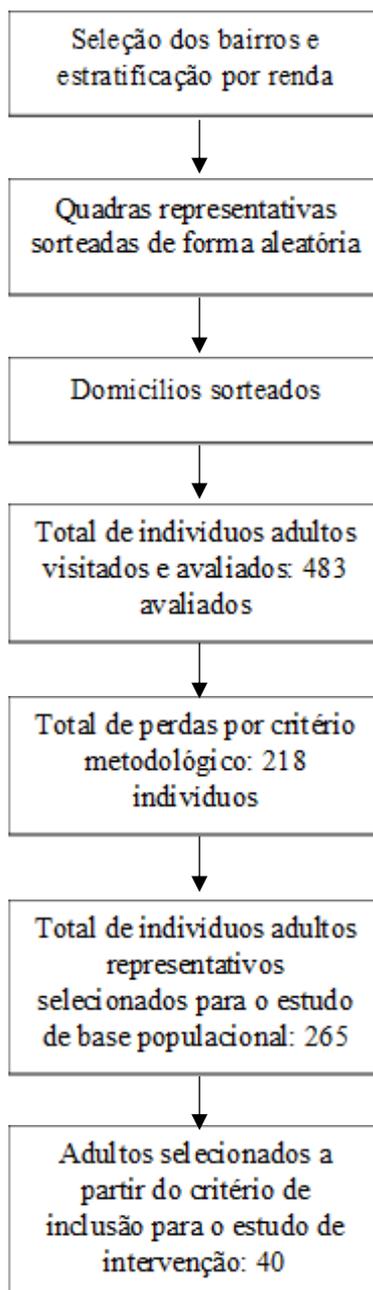
Para o desenvolvimento da presente pesquisa, os indivíduos que aceitaram participar da intervenção foram esclarecidos sobre os objetivos do estudo, que estava em conformidade com as diretrizes éticas, para que estes ao serem elucidados consentissem a participação assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE C).

3.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA

A presente tese foi desenvolvida posteriormente a identificação de quadras sorteadas do município de João Pessoa e identificação dos domicílios. Após identificação dos indivíduos, levando em consideração os critérios de inclusão, estes foram selecionados a partir da amostra de adultos que aceitaram participar do II DISANDNT/JP, conforme fluxograma abaixo (figura 7).

Figura 7. Fluxograma para definição da Amostra do II DISANDN/JP e subamostra do estudo de intervenção.





Fonte: Própria

O presente estudo intervencional foi realizado com uma sub amostra originada dos participantes do II DISANDNT/JP (COSTA *et al.*, 2016), incluindo os indivíduos que apresentaram os critérios de inclusão, sendo estes adultos do sexo feminino, devido a maior aceitação em participar da pesquisa em relação ao sexo masculino, permitindo assim também um grupo homogêneo.

A amostra para a intervenção foi selecionada por randomização em blocos usando Stata® 13.0 software (College Station, Texas, USA), com base em artigo publicado com intervenção dietética e níveis de metilação do DNA (LIMA *et al.*, 2017), portanto,

considerou-se para o estudo um $n = 40$ mulheres adultas classificadas com sobrepeso ou obesidade.

3.2.1 Critérios de Inclusão

- Mulheres que concordassem com a assinatura do TCLE;
- Mulheres com função cognitiva preservada;
- Mulheres adultas com idade entre 20 e 59 anos;
- Mulheres com classificação de sobrepeso ou obesidade;

3.2.2 Critérios de Exclusão

- Mulheres que modificaram seu estilo de vida 3 meses antes do início do estudo;
- Mulheres etilistas ou tabagistas;
- Mulheres que tomam medicamentos conhecidos por interferir com o metabolismo do ácido fólico (nos últimos 3 meses), como antiácidos e anticonvulsivantes;
- Indivíduos que fazem uso de suplementos em geral, como óleo de peixe ou outros ácidos graxos;
- Gestantes ou planejando engravidar durante o período do estudo.

3.3 PROTOCOLO DE INTERVENÇÃO

Após avaliação dos critérios de elegibilidade, as mulheres foram orientadas a ter peso estável, hábitos alimentares e nível de atividade física constantes aos que foram encontrados durante a linha de base (SWITZENY *et al.*, 2012), bem como receberam um plano dietético individual uma semana antes de iniciar a intervenção dietética.

O cálculo do gasto energético total para manutenção do peso das mulheres com sobrepeso e obesidade foi realizado com base no sistema de equivalentes (COSTA *et al.*, 2013) (ANEXO A).

A recomendação dos macronutrientes foram distribuídos conforme o recomendado pela American Heart Association – AHA (2010), Carboidratos 45 – 65% (recomendado 55%), Proteína 10 – 35% (recomendado 15%), Gordura Total 25 – 35% (recomendado 30%).

Não foram autorizados a participar do estudo as participantes que pretendiam mudar hábitos alimentares com relação a dieta proposta, a frequência de atividade física ou peso corporal dentro do período de estudo (SWITZENY *et al.*, 2012). Todas as terapias médicas dos indivíduos continuaram inalteradas ao longo do estudo.

Antes do início da intervenção, as 40 mulheres foram alocadas em quatro grupos com 10 participantes em cada grupo, através de randomização utilizando o Software STATA versão 14.0 para Windows e três grupos iniciaram o plano dietético individual para manutenção do peso com foco para os vegetais e leguminosas com ação antioxidante e ricos em folato, sendo ainda convidadas a consumir alimentos fortificados com ácido fólico e alimentos naturalmente ricos em folato para alcançar uma ingestão habitual de folato próxima da EAR ($\geq 400 \mu\text{g}$), esta quantidade foi para o grupo de intervenção 1 e 2, o grupo 3 recebeu uma quantidade inferior (aproximadamente a metade do consumo dos grupos 1 e 2) e o grupo 4 foi o grupo controle.

Ainda referente a intervenção, os participantes dos três grupos receberam aconselhamento com nutricionista, responsável pela presente pesquisa e todo o material impresso de forma gratuita incluindo os alimentos pré-embalados, sendo também entregues cápsulas de óleo de avelã, utilizadas como fonte de gordura monoinsaturada. As sessões de aconselhamento com o nutricionista foram oferecidas diariamente nas residências durante todo o período da intervenção, exceto para o grupo 4, onde o acompanhamento foi semanal, para manutenção dos hábitos alimentares, conforme figura 8.

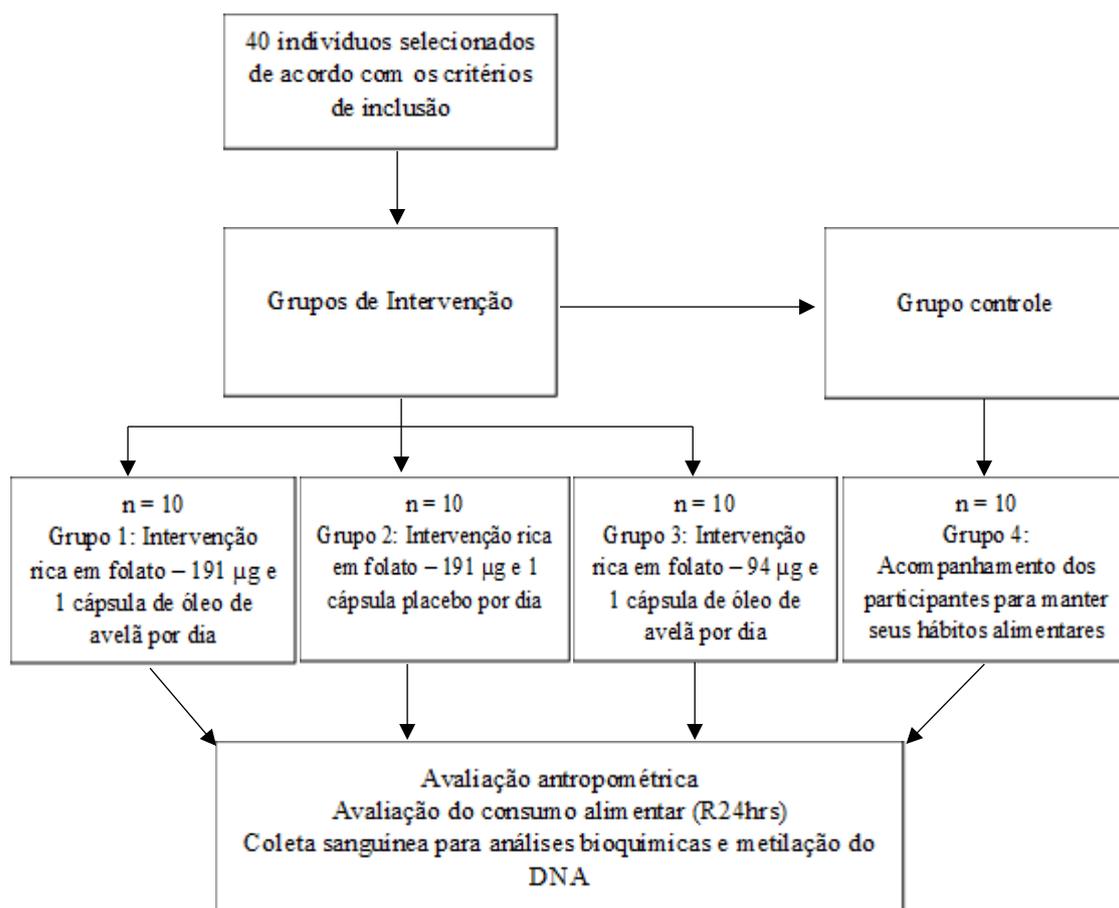
Grupo 1 = neste grupo, os indivíduos receberam, durante o período de 08 semanas diariamente, a intervenção dietética diária com, 300 g de vegetais ricos em folato - $191 \mu\text{g}$ e adicionalmente receberam 01 cápsula contendo 25 mg óleo de avelã por dia.

Grupo 2 = neste grupo, os indivíduos receberam, durante o período de 08 semanas diariamente, a intervenção dietética diária contendo 300 g de vegetais ricos em folato - $191 \mu\text{g}$ e 01 cápsula placebo.

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

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

Figura 8. Fluxograma do protocolo de intervenção.



Fonte: Própria, adaptando de LIMA *et al.*, 2017.

3.3.1 Elaboração dos Vegetais

Os vegetais foram entregues de forma individualizada, diariamente nos domicílios, no período de 08 semanas, correspondentes a 60 dias, referente a quantidade necessária de acordo com a dieta AHA (2010), a composição de vegetais, foi distribuída conforme a tabela 2 e 3 descritas abaixo:

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

	Alimento	Quantidade (g)	Folato (µg)
Semana 1 e 5	Lentilha cozida escorrida	110	149,3
	Milho doce cozido escorrido	60	13,8
	Cenoura Crua	55	10,54
	Abobrinha cozida, inclui pele	75	18,2
	TOTAL	300	191,8
Semana 2 e 6	Brócolis cozido, escorrido	100	108
	Soja madura cozida	100	54
	Alface, folha verde	50	19

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

Fonte: TACO, 2011

Tabela 3. Dieta consumida pelo Grupo 3 contendo 300g de vegetais ricos em folato.

	Alimento	Quantidade (g)	Folato (µg)
Semana 1 e 5	Tomate, verde	75	6,75
	Beterraba, cozida, escorrida	50	40
	Alface, folhas verdes	25	9,50
	Couve flor cozido escorrido, sem sal	75	30,75
	Pepino com casca	75	5,25
	TOTAL	300	94,75
Semana 2 e 6	Abóbora, cozidos, escorridos, sem sal	125	11,25
	Brócolis cozido, escorrido	50	54
	Alface, folha verde	25	9,5
	Milho doce cozido escorrido	75	11,04
	Couve flor cozido escorrido, sem sal	25	10,25
	TOTAL	300	96,04
Semana 3 e 7	Acelga, crua	25	3,5
	Pepino com casca	75	5,25
	Soja madura cozida	150	81
	Tomate, verde	50	4,5
	TOTAL	300	94,5
Semana 4 e 8	Cenoura crua ralada	60	11,5
	Ervilha cozida	75	14,25
	Alface, folha verde	50	19
	Abobrinha cozida, inclui pele	75	18,2
	Beterraba, cozida, escorrida	40	32
	TOTAL	300	94,95

Fonte: TACO, 2011

3.3.2 Cápsula de óleo de avelã

Os indivíduos, do grupo 1 e 3, receberam ainda diariamente, no período de 08 semanas, 01 cápsula com 25g de óleo de avelã, manipulada em um laboratório particular e

utilizada no protocolo de intervenção como fonte de gordura monoinsaturada (LIMA *et al.*, 2017).

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

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

Ácidos graxos (25g)	Avelã (g)
Saturados	2,06
Palmítico	1,39
Esteárico	0,62
Monoinsaturado	20,15
Oleico	20,13
Poliinsaturados	2,64
Linoléico	2,60
Linolênico	0,03

Fonte: FREITAS; NAVES, 2010.

3.4 COLETA DE DADOS

Realizada pela equipe do II DISANDNT/PB, composta de pesquisadores (alunos de graduação e graduados do curso de Nutrição, mestrands e doutorands do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição - PPGCN da UFPB), devidamente treinados no início da coleta de dados. Esta equipe foi responsável pela aplicação de questionários de consumo alimentar, avaliação antropométrica e análises bioquímicas durante as visitas nas residências.

Os dados antropométricos, de consumo alimentar e testes bioquímicos foram coletados antes da intervenção, durante a intervenção repetiu-se a aplicação do recordatório de 24h. Após o término das 08 semanas, foi realizada uma nova avaliação antropométrica, análise da ingestão dietética do recordatório alimentar de 24h e coleta sanguínea para realização dos testes bioquímicos e metilação do DNA.

3.5 AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA

As medições de peso e altura foram realizadas em triplicata, e utilizou-se a média dos três valores. A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda os seguintes pontos de índice de massa corporal de corte para classificar o estado de peso em adultos de 20 a 59 anos de idade: $< 18,5 \text{ kg} / \text{m}^2$ (baixo peso), $18,5 - 24,9 \text{ kg} / \text{m}^2$ (peso normal), $25,0 - 29,9 \text{ kg} / \text{m}^2$ (excesso de peso), $30,0 - 39,9 \text{ kg} / \text{m}^2$ (obesidade), e $\geq 40 \text{ kg} / \text{m}^2$ (extremamente obesas) (WHO, 2000) (ANEXO B).

3.6 CONSUMO ALIMENTAR

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

O recordatório foi aplicado quatro vezes, os dois primeiros com intervalo de 15 dias, antes do início da intervenção, tendo como objetivo o conhecimento dos hábitos alimentares para subsidiar a elaboração do cardápio que foi implementado e comparação do consumo ao final do estudo. Após a primeira semana, foi aplicado o terceiro R24h para verificar a adesão ao aconselhamento nutricional proposto. E ao fim das oito semanas foi aplicado o quarto R24h a fim de analisar a ingestão habitual de calorias e dos nutrientes, com a finalidade de verificar se houve adesão as recomendações e alteração no consumo alimentar em geral e de folato após a intervenção.

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

Foi utilizado um álbum de desenhos de alimentos com medidas caseiras nas três dimensões (pequena, média, grande e extragrande), desenhados com base no peso real do consumo médio de alimentos validados para esta população, com o objetivo de quantificar

de forma mais eficaz o tamanho das porções consumidas, minimizando prováveis deficiências de memória dos indivíduos entrevistados (LIMA *et al.*, 2008; ASCIUTTI *et al.*, 2005).

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

3.6.1 Estimativa do Consumo Habitual

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

3.7 ANÁLISES DO PERFIL LIPÍDICO

A coleta das amostras de sangue foram realizadas na residência de cada participante da intervenção, previamente avisadas e submetidas a um jejum de 12 horas, por uma equipe treinada e coordenada por uma enfermeira. O sangue coletado da veia braquial, com auxílio de um garrote, posicionado na linha média do braço, foi mantido em tubos estéreis de 4 mL à vácuo, um com ativador de coágulo para analisar o soro e o outro para analisar o plasma com anticoagulante Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA), sendo conservados em caixa térmica com gelo por no máximo duas horas.

Foram realizadas análises bioquímicas do perfil lipídico, ao final da aplicação do 1º Recordatório de 24 horas e da avaliação antropométrica, bem como após a conclusão das 8 semanas de intervenção nutricional do presente estudo.

As amostras foram inicialmente centrifugadas até que se obtivesse o soro e foram armazenados em tubos Eppendorf, plásticos e estéreis, estocados a -20 °C para posterior análise no Laboratório de Estudos do Treinamento Físico Aplicado ao Desempenho e a Saúde, do Departamento de Educação Física da UFPB.

Para a avaliação do perfil lipídico foi utilizado os kits para a dosagem de Colesterol Total (Labtest® do Brasil pelo método enzimático – Trinder), sendo o CT desejável com ou sem jejum <190 mg/dL, lido em 500 nm. Colesterol HDL (Labtest® do Brasil pelo método de Precipitação), sendo o HDL desejável com ou sem jejum >40 mg/dL, lido em 500 nm. Triglicérides (Labtest® do Brasil pelo método enzimático –Trinder), sendo o HDL desejável com ou sem jejum <150 mg/dL, lido em 505 nm. E o valor do LDL foi de acordo com o cálculo proposto por Friedewald, Levy e Fredrickson (1972), pela seguinte fórmula: Colesterol LDL (cálculo) = Colesterol Total – Colesterol HDL – Triglicerídeos / 5.

Para as análises, foi utilizado o analisador bioquímico automático Labmax 240 premium, do fabricante Labtest (Lagoa Santa/MG, Brasil). Previamente a cada sequência de análise, era realizada a calibragem do equipamento de análise com o calibrador da série “Calibra” da Labtest®, para avaliar precisão de estimativas dos marcadores bioquímicos e verificar se estavam nos parâmetros recomendados pelo fabricante do equipamento utilizado. Como valores de referência desejáveis: Colesterol (<200 mg/dL), LDL (100 – 129 mg/dL), HDL (> 60 mg/dL), TG (<150 mg/dL). Estas análises foram realizadas no Laboratório de Estudos do Treinamento Físico Aplicado ao Desempenho e a Saúde, do Departamento de Educação Física da Universidade Federal da Paraíba.

3.8 ANÁLISE DO NÍVEL DE METILAÇÃO

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

3.8.1 Obtenção da amostra e Isolamento do DNA genômico

Para obtenção de leucócitos foi realizada a coleta sanguínea pela manhã em mesmo horário, antes e após a conclusão da intervenção. O DNA do sangue periférico foi isolado utilizando o QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) seguindo o protocolo

descrito pelo fabricante. O DNA genômico foi modificado por bissulfito do kit de conversão de bissulfito Cells-to-CpG™ (Applied Biosystems, Life Technologies, Califórnia) de acordo com as instruções do fabricante. A amplificação por PCR e a análise de High Resolution Melting (HRM) foram realizadas a partir do equipamento Applied Biosystems 7500 Fast System (LIMA et al. 2017).

A PCR foi realizada num volume total de 20µl contendo: AmpliTaq® Gold 360 Buffer, 10x, 25mM Mg Chloride, Melt/Doctor™ HRM Dye (20x), 25nM de cada iniciador com as sequências dos primers (5' a 3') para os genes *LEP* e *POMC*. A sequência dos primers foram obtidas a partir da região promotora depositada na base de dados Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu/>) com a utilização do Software MethPrimer (<https://www.urogene.org/methprimer/>). O programa qPCR consistiu de uma ativação enzimática inicial a 95 ° C por 10 min, seguido por 40 ciclos de 15s a 95 °C, 60 s a 60 ° C e uma extensão final a 95 ° C 10s, 60°C 60s, 95°C 15s e 60°C 15s. As amostras foram analisadas de forma randomizada por grupos de intervenção, todas as análises foram realizadas em placas de PCR em triplicata.

As curvas de fusão foram normalizadas pelo cálculo da 'linha de melhor ajuste' entre duas regiões de normalização antes e após a diminuição da fluorescência principal representando a fusão do produto de PCR usando o software Applied Biosystems 7500 Fast Software do Sistema v 2.0.

3.8.2 Desenhos dos primers

Para avaliar os níveis de metilação do DNA, na região promotora dos genes *LEP* e *POMC*, o desenho dos primers foram obtidos a partir da base de dados Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu/>) com a utilização do Software MethPrimer (<https://www.urogene.org/methprimer/>). O MethPrimer aceita uma sequência de DNA como entrada, executa uma conversão digital de bissulfito da sequência de entrada e, em seguida, seleciona primers na sequência convertida. Os resultados da seleção de primers são entregues por meio de um navegador da Web em visualizações de texto e gráficos (LI; DAHIYA, 2002). Os primers utilizados estão nos artigos 1 e 2 em anexo.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os objetivos propostos, uma análise descritiva das características da amostra foi realizada primeiramente utilizando a média e o desvio padrão antes e após a intervenção. Os

dados foram avaliados quanto à normalidade usando o teste de ShapiroWilk (SIEGEL, 1997). A análise estatística foi realizada com o software R versão 3.6.2. Após ser utilizada a análise de variância (ANOVA) para comparar os efeitos da intervenção entre os 4 grupos, foi feita uma comparação dos valores iniciais e finais após a intervenção dietética, as variáveis normais e não normais foram analisadas pelo teste t de Student e de Wilcoxon, respectivamente.

Para determinar se havia relações significativas entre os valores dos níveis de metilação dos genes *LEP* e *POMC* e perfil lipídico, foram propostos os modelos de regressão linear descritos a seguir:

Modelo 1: μ Níveis de metilação do gene *LEP* = $\beta_0 + \beta_1 * \text{Idade} + \beta_2 * \text{Colesterol Total} + \beta_3 * \text{LDL-C} + \beta_4 * \text{HDL-C} + \beta_5 * \text{Triglicerídeos}$.

Modelo 2: μ Níveis de metilação do gene *POMC* = $\beta_0 + \beta_1 * \text{Idade} + \beta_2 * \text{Colesterol Total} + \beta_3 * \text{LDL-C} + \beta_4 * \text{HDL-C} + \beta_5 * \text{Triglicerídeos}$.

Para todas as análises estatísticas, os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4 RESULTADOS

Os resultados estão apresentados na forma de dois artigos originais. O artigo 1 (Intervenção com folato dietético e óleo de avelã reduz níveis de metilação dos genes *LEP* e *POMC* e peso corporal: um estudo randomizado) aborda o impacto da intervenção com folato dietético e óleo de avelã na redução dos níveis de metilação do gene *LEP* nos grupos que receberam as duas intervenções: G1 ($p=0,00$) e G3 ($p=0,00$), e no grupo que recebeu apenas intervenção com folato dietético, G2 ($p=0,00$); resultado semelhante nos níveis de metilação do gene *POMC* com redução nos três grupos intervenção: G1 ($p=0,01$), G2 ($p=0,02$) e G3 ($p=0,01$), e perda de peso no G2 ($p=0,00$) e G3 ($p=0,00$).

O artigo 2 (Níveis de metilação dos genes *LEP* e *POMC* após intervenção com folato dietético e óleo de avelã no perfil lipídico de mulheres com excesso de peso) aborda o efeito da intervenção com folato dietético e óleo de avelã na redução dos níveis de metilação dos genes *LEP* e *POMC* e sua relação com as mudanças no perfil lipídico de mulheres com excesso de peso. Observou-se diminuição dos níveis de metilação após intervenção para ambos os genes em todos os grupos, exceto para o gene *LEP* e o grupo controle (G4), onde as diferenças não foram significativas. Quanto ao perfil lipídico, diferenças significativas foram encontradas nos grupos intervenção G1 (para LDL, $p=0,043$; HDL, $p=0,000$ e triglicerídeos, $p=0,045$), G3 (para colesterol total, $p=0,000$, LDL, $p=0,000$ e HDL, $p=0,005$), além de uma associação no G2 entre os níveis de metilação do *POMC* com triglicerídeos ($p=0,000$).

5 REFERÊNCIAS

- ABESO. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica. **Mapa da Obesidade**. Disponível em: abeso.org.br/atitude-saudavel/mapa-obesidade. Acesso em: agosto, 2016.
- ÁCS, O. *et al.* Methylation status of CYP27B1 and IGF2 correlate to BMI SDS in children with obesity. **Obesity Facts**, v. 10, n. 4, p. 353-362, 2017.
- AHA (American Heart Association). **Dietary Guidelines for American**. 2010. Disponível em: https://www.heart.org/idc/groups/heartpublic/@wcm/@adv/documents/downloadable/ucm_312853.pdf.
- ALAVIAN-GHAVANINI, A.; RUEGG, J. Understanding Epigenetic Effects of Endocrine Disrupting Chemicals: From Mechanisms to Novel Test Methods. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicologic**, v. 122, p. 38–45, 2018.
- ALLEN, S. A. *et al.* Two colliding epidemics – obesity is independently associated with chronic pain interfering with activities of daily living in adults 18 years and over; a cross-sectional, population-based study. **BMC Public Health**. v. 16, n.1, p. 1-9, 2016.
- ALLISON, M. B.; MYERS, M. G. Connecting leptin signaling to biological function. **Journal of Endocrinology**, v. 223, n. 1, p. 25-35, 2014.
- ANDERMANN, M. L.; LOWELL, B. B. Toward a wiring diagram understanding of appetite control. **Neuron**, v. 95, n. 4, p. 757–778, 2017.
- ARONICA, L. *et al.* A systematic review of studies of DNA methylation in the context of a weight loss intervention. **Epigenomics**, v. 9, n. 5, p. 769-787, 2017.
- ASCIUTTI, L. S. R. *et al.* **Manual de porções média em tamanho real baseado no programa dietsys para estudo de base populacional**. UFPB, 2005.
- ASLIBEKYAN, S. *et al.* DNA methylation patterns are associated with n–3 fatty acid intake in Yupik people. **The Journal of Nutrition**, v.144,p. 425-430, 2014.
- ATTWOOD, J. T.; YUNG, R. L.; RICHARDSON, B. C. DNA methylation and the regulation of gene transcription. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 59, p. 241-257, 2002.
- AUCLAIR, G.; WEBER, M. Mechanisms of DNA methylation and demethylation in mammals. **Biochimie**, v. 94, p. 2202-2211, 2012.
- BALTHASAR, N. *et al.* Leptin Receptor Signaling in POMC Neurons Is Required for Normal Body Weight Homeostasis. **Neuron**, v. 42, p. 983–991, 2004.
- BENTON, M. C. *et al.* An analysis of DNA methylation in human adipose tissue reveals differential modification of obesity genes before and after gastric bypass and weight loss. **Genome Biology**, v. 16, n. 8, p. 1-21, 2015.

BERQUIST, R. B.; WILSON, M. D. Pathways for repairing and tolerating the spectrum of oxidative DNA lesions. **Cancer Letters**, v. 327, p. 61-72, 2012.

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

BEULEN, Y. *et al.* Quality of Dietary Fat Intake and Body Weight and Obesity in a Mediterranean Population: Secondary Analyses within the PREDIMED Trial. **Nutrients**, v. 10, p. 1-13, 2018.

BEYDOUN, M. A. *et al.* Serum antioxidant status is associated with metabolic syndrome among U.S. adults in recent national surveys. **The Journal of Nutrition**, v. 141, n. 5, p. 903-913, 2011.

BIRD, J. K. *et al.* Obesity is associated with increased red blood cell folate despite lower dietary intakes and serum concentrations. **The Journal of Nutrition**, v. 145, 79–86, 2015.

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

BRAUN, E. V. K. *et al.* Epigenome-wide association study (EWAS) on lipids: the Rotterdam Study. **Clinical Epigenetics**, v. 9, n. 15, p. 1-12, 2017.

BRAY, G. A. *et al.* Management of obesity. **Lancet**, v. 387, n. 10031, p. 1947- 1956, 2016.

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

BRUFAU, G.; BOATELLA, J.; RAFECAS, M. Nuts, source of energy and macronutrients. **British Journal of Nutrition**, v. 96, p. 24-28, 2006.

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

CAMARGO, A. *et al.* Expression of proinflammatory, proatherogenic genes is reduced by the Mediterranean diet in elderly people. **The British Journal of Nutrition**, v. 108, p. 500–508, 2012.

CAMPS, J. *et al.* Paraoxonases, mitochondrial dysfunction and non-communicable diseases. **Chemico-Biological Interactions**, v. 259, p. 382-387, 2016.

CANDLER, T. *et al.* Epigenetic regulation of *POMC*; implications for nutritional programming, obesity and metabolic disease. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 54, p. 1-18, 2019.

CAO, H. Adipocytokines in obesity and metabolic disease. **Journal of Endocrinology**, v. 220, p 47-59, 2014.

CHAN, Y. M.; BAILEY, R.; O'CONNOR, D. L. Folate. **Advances in Nutrition**, v. 4, p. 123–125, 2013.

CHANG, L. F. *et al.* Adverse effects on insulin secretion of replacing saturated fat with refined carbohydrate but not with monounsaturated fat: A randomized controlled trial in centrally obese subjects. **Journal of Clinical Lipidology**, v. 10, n. 6, p. 1431-1441, 2016.

CHEN, H. *et al.* Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. **Cell**, v. 84, p. 491–495, 1996.

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

CIFANI, C. *et al.* Regulation of hypothalamic neuropeptides gene expression in diet induced obesity resistant rats: possible targets for obesity prediction?. **Frontiers in Neuroscience**, v. 9, n. 187, p. 1-9, 2015.

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

COOPER, A. J. *et al.* Fruit and vegetable intake and type 2 diabetes: EPIC-Interact prospective study and meta-analysis. **European Journal Clinical Nutrition**. v. 66, n. 10, p. 1082–1092, 2012.

COLL, A. P. Effects of pro-opiomelanocortin (POMC) on food intake and body weight: mechanisms and therapeutic potential?. **Clinical Science**, v. 113, p. 171–182, 2007.

COMMINS, S. P. *et al.* Central leptin regulates the UCP1 and ob genes in brown and white adipose tissue via different beta-adrenoceptor subtypes. **Journal Biology Chemistry**, v. 275, p. 33059–67, 2000.

CONTI, A. Nutrigenômica: a ciência da nutrição na era pós-genoma. **Food Ingredientes Brasil**, n.15, p. 44-46,2010.

CORDERO, P. *et al.* Leptin and TNF-alpha promoter methylation levels measured by MSP could predict the response to a low-calorie diet. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 67, n. 3, p. 463-70, 2011.

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

COSTA, M. J. C. *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.

CRUJEIRAS, A. B. *et al.* Association of weight regain with specific methylation levels in the NPY and POMC promoters in leukocytes of obese men: A translational study. **Regulatory Peptides**, v. 186, p. 1–6, 2013.

CRUJEIRAS, A. B.; CASANUEVA, F. F. Obesity and the reproductive system disorders: epigenetics as a potential bridge. **Human Reproduction Update**, v. 21, n.2, p. 249–261, 2015.

DAHLMAN, I. *et al.* The fat cell epigenetic signature in post-obese women is characterized by global hypomethylation and differential DNA methylation of adipogenesis genes. **International Journal of Obesity**, v. 39, p. 910–919, 2015.

DAMAVANDI, R. D. *et al.* Effects of halzenuts consumption on fasting blood sugar and lipoproteins in patient with type 2 diabetes. **Journal of Research in Medical Sciences**, v. 18, n. 4, p. 314-321, 2013.

DEKKERS, K. F. *et al.* Blood lipids influence DNA methylation in circulating cells. **Genome Biology**, v. 17, p. 1–15, 2016.

DESAI, M.; HAN, G.; ROSS, M. G. Programmed hyperphagia in offspring of obese dams: altered expression of hypothalamic nutrient sensors, neurogenic factors and epigenetic modulators. **Appetite**, v. 99, p. 193-199, 2016.

DHASARATHY, A.; ROEMMICH, J. N.; CLAYCOMBE, K. J. Influence of maternal obesity, diet and exercise on epigenetic regulation of adipocytes. **Molecular Aspects of Medicine**, v.54, p. 37-49, 2017.

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

DRUMMOND, E. M.; GIBNEY, E. R. Epigenetic regulation in obesity. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 16, n. 4, p. 392–397, 2013.

EHRlich, M. *et al.* Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. **Nucleic Acids Research**, v.10, p. 2709–2721, 1982.

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

ESPOSITO, K. *et al.* Mediterranean diet and weight loss: meta-analysis of randomized controlled trials. **Metabolic Syndrome and Related Disorders**, v.9, n.1, p.1-12, 2011.

FAIRBROTHER, U. *et al.* Genetics of Severe Obesity. **Current Diabetes Reports**, v. 18, n. 85, p. 1-9, 2018.

FAO (Food and Agriculture Organization). **Organization of the United Nations. Human Vitamin and Mineral Requirements**, Food and Nutrition Division, 2001. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-y2809e.pdf>. Acesso jan/2021.

FLAK, J. N.; MYERS, M. G. Minireview: CNS mechanisms of leptina action. **Molecular Endocrinology**, v. 30, p. 3–12, 2016.

FAROOQI, I. S. *et al.* Heterozygosity for a POMC-null mutation and increased obesity risk in humans. **Diabetes**, v. 55, n. 9; 2549-53, 2006.

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.

FIFE, J. *et al.* Folic acid supplementation and colorectal cancer risk: A meta-analysis. **Colorectal Disease**, v. 13, p. 132–137, 2011.

FINDEISEN, H. M.; KAHLES, F. K.; BRUEMMER, D. Epigenetic regulation of vascular smooth muscle cell function in atherosclerosis. **Current Atherosclerosis Reports**, v.15,n.4, p. 319, 2013.

FINUCANE, M. M. *et al.* National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. **The Lancet**, v. 377, p. 557-567, 2011.

FRAHNOW, T. *et al.* Pfeiffer Heritability and responses to high fat diet of plasma lipidomics in a twin study. **Scientific Reports**, n. 3750, p. 1-11, 2017.

FREITAS, J. B.; NAVES, M. M. V. Composição química de nozes e sementes comestíveis e sua relação com a nutrição e saúde. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 2, p. 269-279, 2010.

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

GODIC, A. *et al.* The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.2014, p. 1-6, 2014.

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

GRADINARU, D. *et al.* Oxidized LDL and NO synthesis – biomarkers of endothelial dysfunction and ageing. **Mechanisms Ageing Development**, v. 151, p. 101–113, 2015.

GROSSE, S. D. *et al.* Retrospective assessment of cost savings from prevention: Folic acid fortification and spina bifida in the U.S. **American Journal of Preventive Medicine**, v. 50, n. 1, p. S74–S80, 2016.

GUAY, S. P. *et al.* Epigenome-wide analysis in familial hypercholesterolemia identified new loci associated with high-density lipoprotein cholesterol concentration. **Epigenomics**, v. 4, n. 6, p. 623–39, 2012.

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.

GUO, X. *et al.* Structural insight into autoinhibition and histone H3-induced activation of DNMT3A. **Nature**, v. 517, p. 640-644, 2015.

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

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

HANLEY, B. *et al.* Metabolic imprinting, programming and epigenetics a review of present priorities and future opportunities. **British Journal of Nutrition**, v.104, p.1–25, 2010.

HASLAM, D. W.; JAMES, W. P. Obesity. **The Lancet**, v. 366, p. 1197–1209, 2005.

HASSELBALCH, A. L. Genetics of dietary habits and obesity—A twin study. **Danish Medical Bulletin**, v. 57, n. 9, B4182, 2010.

HENRY, F. E. *et al.* Cell type-specific transcriptomics of hypothalamic energy-sensing neuron responses to weight-loss. **eLife**, v. 4, p. 1-30, 2015.

HERMSDORFF, H. H. M. *et al.* Fruit and vegetable consumption and proinflammatory gene expression from peripheral blood mononuclear cells in young adults: a translational study. **Nutrition Metabolism**, v. 7, n. 42, p. 1-11, 2010.

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

HIRAOKA, M.; KAGAWA, Y. Genetic polymorphisms and folate status. **Congenital Anomalies**, v. 57, n. 5, p. 142-149, 2017.

HJORT, L. *et al.* 36 h fasting of young men influences adipose tissue DNA methylation of *LEP* and *ADIPOQ* in a birth weight-dependent manner. **Clinical Epigenetics**, v. 9, n. 40, p. 1-12, 2017.

HOOPER, L. *et al.* Reduced or modified dietary fat for preventing cardiovascular disease. **The Cochrane Database of systematic Reviews**, v.134, p. 182 - 183 ,2016.

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.29, p. 1-10, 2015.

HUSEMOEN, L. L. N. *et al.* Mendelian randomisation study of the associations of vitamin B12 and folate genetic risk scores with blood pressure and fasting serum lipid levels in three Danish population-based studies. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, n. 5, p. 1-7, 2016.

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

IRVIN, M. R. *et al.* Epigenome-wide association study of fasting blood lipids in the genetics of lipid-lowering drugs and diet network study. **Circulation**, v. 130, n. 7, p. 565–72, 2014.

JACOBSEN, S. C. *et al.* Effects of short-term high fat overfeeding on genome-wide DNA methylation in the skeletal muscle of healthy young men. **Diabetologia**, v.55, p. 3341–3349, 2012.

JIANG, L. *et al.* A genome-wide association study of energy intake and expenditure. **PLoS ONE**, v. 13, n. 8, p. 1-18, 2018.

JIN, Z.; LIU, Y.; DNA Methylation in human diseases. **Genes & Diseases**, v. 5, p. 1-8, 2018.

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

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

KALANI, A. *et al.* Role of microRNA29b in blood-brain barrier dysfunction during hyperhomocysteinemia: an epigenetic mechanism. **Journal Cerebral Blood Flow Metabolism**, v. 34, p. 1212–1222, 2014.

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

KELLY, K. B. *et al.* Excess Folic Acid Increases Lipid Storage, Weight Gain, and Adipose Tissue Inflammation in High Fat Diet-Fed Rats. **Nutrients**, v. 8, n. 594, p. 1-13, 2016.

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

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

KLEIN, P.; TYRLIKOVA, I. Prevention of epilepsy: should we be avoiding clinical trials?. **Epilepsy & Behavior**, v. 72, p. 188-194, 2017.

KRAWINKEL, M. B. *et al.* Revised DA-CH intake recommendations for folate: how much is needed&quest. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, n. 6, p. 719-723, 2014.

KROLL, C. *et al.* Associations of ADIPOQ and LEP Gene Variants with Energy Intake: A Systematic.**Nutrients**, v. 11, n. 4, p. 1-14, 2019.

KUEHNEN, P. *et al.* An Alu element-associated hypermethylation variant of the POMC gene is associated with childhood obesity. **PLoS Genetics**, v. 8, n. 3, p. 1-12, 2012.

KUHNEN, P. *et al.* Interindividual Variation in DNA Methylation at a Putative POMC Metastable Epiallele Is Associated with Obesity. **Cell Metabolism**, v. 24, n. 3,p. 502-509, 2016.

KWON, E. J. *et al.* Association between the DNA methylations of POMC, MC4R, and HNF4A and metabolic profiles in the blood of children aged 7–9 years. **BMC Pediatrics**, v. 18, n. 121, p. 1-8, 2018.

LAURENT, L. *et al.* Dynamic changes in the human methylome during differentiation. **Genome Research**, v. 20, p. 320–331, 2010.

LAURSEN, T. L. *et al.* Leptin, adiponectin, and ghrelin responses to endurance exercise in different ambient conditions. **Temperature**, v. 4, p. 166–175, 2017.

LIEW, S. C. Folic acid and diseases – supplement it or not?. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 62, n. 1, p. 90-100, 2017.

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

LI, Y. *et al.* Folic Acid Supplementation and the Risk of Cardiovascular Diseases: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. **Journal American Heart Association**, v. 5, n. 8 p. e003768, 2016.

LI, Q. *et al.* Folate deficiency and aberrant DNA methylation and expression of FHIT gene were associated with cervical pathogenesis. **Oncology Letters**, v. 15, p. 1963-1972, 2018.

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. **Impacto da ingestão do folato e cápsula de óleo de avelã nos níveis de metilação do gene ADRB3, LEP e POMC, perfil antropométrico, lipídico e estresse oxidativo.** 2017. 148p. (Tese de Doutorado) – Universidade Federal da Paraíba, 2017.

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.

LIND, M. I.; SPAGOPOULOU, F. Evolutionary consequences of epigenetic inheritance. **Heredity**, v. 121, p. 205–209, 2018.

LING, C. *et al.* Epigenetic regulation of PPARGC1A in human type 2 diabetic islets and effect on insulin secretion. **Diabetologia**, v. 51, n. 4, p. 615-22, 2008.

LISBOA, J. V. C. **Influência do polimorfismo C677T no gene MTHFR relacionado à suplementação de uma dieta com folato nos valores de interleucinas, homocisteína e TNF-alfa em mulheres obesas e com sobrepeso.** 2017. 116p. (Dissertação de Mestrado) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017.

LIVINGSTONE, K. M. *et al.* Associations between FTO genotype and total energy and macronutrient intake in adults: A systematic review and meta-analysis. **Obesity of Review**, v. 16, p. 666–678, 2015.

LOPEZ-LEGARREA, P. *et al.* SERPINE1, PAI-1 protein coding gene, methylation levels and epigenetic relationships with adiposity changes in obese subjects with metabolic

syndrome features under dietary restriction. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 53, n. 3, p. 139-144, 2013.

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

LUMENG, C. N. *et al.* Increased Inflammatory Properties of Adipose Tissue Macrophages Recruited During Diet-Induced Obesity. **Diabetes**, v. 56, n. 1, p. 16-23, 2007.

MA, Y. *et al.* Genetic variants modify the effect of age on APOE methylation in the Genetics of Lipid Lowering Drugs and Diet Network study. **Aging Cell**, v. 14, n. 1, p. 49–59, 2015.

MANSEGO, M. L. *et al.* SH2B1 CpG-SNP is associated with body weight reduction in obese subjects following a dietary restriction program. **Ann. Nutr. Metab.** 66(1)

MAO, S. Q. *et al.* Hypomethylation of interleukin-6 (IL-6) gene increases the risk of essential hypertension: a matched case–control study. **Journal of Human Hypertension**, p. 1–7, 2017.

MARCHETTA, C. M. *et al.* Assessing the association between natural food folate intake and blood folate concentrations: a systematic review and Bayesian meta-analysis of trials and observational studies. **Nutrients**, v. 7, p. 2663–2686, 2015.

MARCO, A. *et al.* Overweight and CpG methylation of the *Pomc* promoter in offspring of high-fat-diet-fed dams are not “reprogrammed” by regular chow diet in rats. **The FASEB Journal**, v. 28, n. 9, p. 4148 – 4157, 2014.

MARCO, A. *et al.* DNA CpG Methylation (5-Methylcytosine) and Its Derivative (5-Hydroxymethylcytosine) Alter Histone Posttranslational Modifications at the *Pomc* Promoter, Affecting the Impact of Perinatal Diet on Leanness and Obesity of the Offspring. **Diabetes**, v. 65, p. 2258-2267, 2016.

MARTINEZ, J. A. *et al.* Epigenetics in Adipose Tissue, Obesity, Weight Loss, and Diabetes. **Advances in nutrition**, v. 5, p. 71-81, 2014.

MCDONALD, D.; GLUSMAN, G.; PRICE, N. D. Personalized nutrition through big data. **Nature Biotechnology**, v. 34, p. 152-154, 2016.

MENSINK, R. P. **Effects of saturated fatty acids on serum lipids and lipoproteins: a systematic review and regression analysis.** Geneva: World Health Organization; 2016. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/246104/9789241565349-eng.pdf;jsessionid=C796BACB7E33D7B581126460ACDF4ACE?sequence=1>. Acesso jan/2021.

MILAGRO, F. I. *et al.* CLOCK, PER2 and BMAL1 DNA methylation: association with obesity and metabolic syndrome characteristics and monounsaturated fat intake. **Chronobiology International Journal**, v. 29, p.1–15, 2012.

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. 12-15, 1988.

MILYANI, A. A.; AL-AGHA, A. E. The effect of body mass index and gender on lipid profile in children and adolescents in Saudi Arabia. **Annals of African Medicine**, v. 18, n. 1, p. 42-46, 2019.

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

MORRIS, M. C. *et al.* A. Dietary folate and vitamin B12 intake and cognitive decline among community-dwelling older persons. **Archives Neurology**, v. 62, p. 641–645, 2005.

MORRISON, S. F.; MADDEN, C. J.; TUPONE, D. Central neural regulation of brown adipose tissue thermogenesis and energy expenditure. **Cell Metabolism**, v. 19, p. 741–56, 2014.

MSM – The Multiple Source Method. **Departament of Epidemiology of the German Institute of Human Nutrition Potsdam** –Disponível em <https://msm.dife.de/tps/msm/>. Acesso em jan/2021

MYERS, M. G.; COWLEY, M. A.; MUNZBERG, H. Mechanisms of leptin action and leptin resistance. **Annual Review of Physiology**, v. 70, p. 537–556, 2008.

NASCIMENTO, H. *et al.* Cardiovascular risk factors in Portuguese obese children and adolescents: Impact of small reductions in body mass index imposed by lifestyle modifications. **Open Biochemistry Journal**, v. 6, p. 43-50, 2012.

NASIR, A. *et al.* Nutrigenomics: Epigenetics and cancer prevention: A comprehensive review. **Critical reviews in food science and nutrition**,v.20,n.8, p. 1375 - 1387, 2020.

NEYAZI, A. *et al.* Association of Leptin Gene DNA Methylation With Diagnosis and Treatment Outcome of Anorexia Nervosa. **Frontiers in Psychiatry**, v. 10, p. 1-11, 2019.

NIH, Dietary supplement fact sheet. Folate. Health Information. **Office of Dietary Supplements**, US National Institutes of Health, 2014. Disponível em: <<http://ods.od.nih.gov/factsheets/Folate-HealthProfessional>>. Acesso jan/2021

NOECKER, C.; BORENSTEIN, E. Getting Personal About Nutrition. **Trends in Molecular Medicine**, v. 22, n. 2, p. 83–85, 2016.

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

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

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

PAN, W. W.; MYERS, M. G. Jr. Leptin and the maintenance of elevated body weight. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 19, n. 2, p. 95-105, 2018.

PARTON, L. E. *et al.* Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. **Nature**, p. 449, n. 7159, p. 228-32, 2007.

PAVLIDIS, C. *et al.* Ascertainment and critical assessment of the views of the general public and healthcare professionals on nutrigenomics in Greece. **Personalized Medicine**, v. 9, p. 201–210, 2012.

PEREZ-CORNAGO, A. *et al.* DNA hypermethylation of the serotonin receptor type-2A gene is associated with a worse response to a weight loss intervention in subjects with metabolic syndrome. **Nutrients**, v. 236, n. 6, p. 2387-403, 2014.

PEREZ-MARTINEZ, P. *et al.* Dietary fat differentially influences regulatory endothelial function during the postprandial state in patients with metabolic syndrome: from the LIPGENE study. **Atherosclerosis**, v. 209, p.533–538, 2010.

PERNA, S. *et al.* Effects of Halzenut Consumption on Bloos Lipids and Body Weight: A systematic review and Bayesian Meta-Analysis. **Nutrients**, v. 8, n. 12, p. 747, 2016.

PFEIFFER, C. *et al.* Decreased global DNA methylation in the white blood cells of high fat diet fed vervet monkeys (*Chlorocebus aethiops*). **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 70, n. 3, p. 725-733, 2014.

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.

PERFILYEV, A. *et al.* Impact of polyunsaturated and saturated fat overfeeding on the DNA-methylation pattern in human adipose tissue: a randomized controlled trial. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 8, p. 1-10, 2017.

POURFARZAD, A.; MEHPOUR, G. R. Health Benefits of Hazelnut. **EC Nutrition**, v. 8, n. 3, p. 101-105, 2017.

PRICE, E. M. *et al.* Profiling placental and fetal DNA methylation in human neural tube defects. **Epigenetics & Chromatin**, v. 9, n. 6, p. 1-14, 2016.

Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia. Resumo do composto PubChem para CID 135398658, Ácido Fólico. Disponível em <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Folic-acid> . Acesso jan/ 2021.

QIU, J. *et al.* Insulin excites anorexigenic proopiomelanocortin neurons via activation of canonical transient receptor potential channels. **Cell Metabolism**, v. 19, n. 4, p. 682-93, 2014.

RAATZ, S. K. *et al.* Relationship of the Reported Intakes of Fat and Fatty Acids to Body Weight in US Adults. **Nutrients**, v. 9, n. 438, p. 1-13, 2017.

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

RAMAMOORTHY, G, T. *et al.* Maternal overnutrition programs epigenetic changes in the regulatory regions of hypothalamic Pomc in the offspring of rats. **International Journal of Obesity**, v. 42, n. 8, p. 1431-1444, 2018.

RESCIGNO, T. *et al.* Bioactive Nutrients and Nutrigenomics in Age-Related Diseases. Review. **Molecules**, v. 22, n. 1, p. 105, 2017.

ROHDE, K. *et al.* Genetics and epigenetics in obesity. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 92, p. 37–50, 2019.

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

RYAN, D. H.; KAHAN, S. Guideline Recommendations for Obesity Management. **The Medical Clinics of North American**, v. 102, n. 1, p. 49-63, 2018.

RUSSO, G. L. V. *et al.* Dietary polyphenols and chromatin remodeling. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 12, p. 2589–99, 2017.

SAHAKYAN, K.R. *et al.* Normal-weight central obesity: implications for total and cardiovascular mortality. **Annals of Internal Medicine**, v. 163, p.827–835, 2015.

SAINI, R. K.; NILE, S. H.; KEUM, Y. S. Folates: Chemistry, analysis, occurrence, biofortification and bioavailability. **Food Research International**, v. 89, p. 1–13, 2016.

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

SAMBLAS, M. *et al.* Methylation on the Circadian Gene BMAL1 Is Associated with the Effects of a Weight Loss Intervention on Serum Lipid Levels. **Journal of Biological Rhythms**, v. 31, n. 3, p. 308-17, 2016.

NUNES, M. K. D. S. *et al.* Hypermethylation in the promoter of the MTHFR gene is associated with diabetic complications and biochemical indicators. **Diabetology and Metabolic Syndrome**, v. 9, n. 84, p. 2-9, 2017.

SAWAENGSRRI, H.; *et al.* High folic acid intake reduces natural killer cell cytotoxicity in aged mice. **Journal of Nutrition Biochemistry**, v. 30, p. 102–107, 2016.

SCHUTZ, D. D. *et al.* European Practical and Patient Centred Guidelines for Adult Obesity Management in Primary Care. **Obesity Facts**, v. 12, n. 1, p. 40-66, 2019.

SCHWAB, U. *et al.* Effect of the amount and type of dietary fat on cardiometabolic risk factors and risk of developing type-2 diabetes, cardiovascular disease, and cancer: A systematic review. **Food Nutrition Research**, v. 58, p. 1-26, 2014.

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

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

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

SILVA, J. P. *et al.* Epigenomic and metabolic responses of hypothalamic POMC neurons to gestational nicotine exposure in adult offspring. **Genome Medicine**, v. 8, n. 1, p. 93, 2016.

SUN, J. *et al.* Role of Epigenetic Histone Modifications in Diabetic Kidney Disease Involving Renal Fibrosis. **Journal of Diabetes Research**, v. 2017, p.1 – 11, 2017.

SUNEETHA, K. Study of Lipid Profile in Obese and Non-obese Students in Acharya Nagarjuna University. **International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 10, n. 2, p. 40-42, 2018.

SWITZENY, O. J. *et al.* Vitamin and antioxidant rich diet increases MLH1 promoter DNA methylation in DMT2 subjects. **Clinical Epigenetics**, v. 4, n. 1, p. 19, 2012.

TACO. **Tabela brasileira de composição de alimentos** / NEPA – UNICAMP.- 4. ed. rev. e ampl. -- Campinas: NEPA- UNICAMP, 2011. 161 p.

TELLE-HANSEN, V. H. *et al.* Does dietary fat affect inflammatory markers in overweight and obese individuals?-a review of randomized controlled trials from 2010 to 2016. **Genes and Nutrition**, v. 4, p. 12-26, 2017.

TIFFON, C. The Impact of Nutrition and Environmental Epigenetics on Human Health and Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, p. 1-19, 2018.

TODA, C. *et al.* POMC Neurons: From Birth to Death. **Annual Review of Physiology**, v. 10, n. 79, p. 209–236, 2017.

TORO-MARTIN, J. *et al.* Methylation quantitative trait loci within the TOMM20 gene are associated with metabolic syndrome-related lipid alterations in severely obese subjects. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 8, p. 1–10, 2016.

TRIANAFYLLOU, G. A.; PASCHOU, S. A.; MANTZOROS, C. S. Leptin and Hormones: Energy Homeostasis. **Endocrinology and metabolism clinics of North America**, v. 45, p. 633-645, 2016.

TRUONG, V. *et al.* Blood triglyceride levels are associated with DNA methylation at the serine metabolism gene PHGDH. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1–16, 2017.

TURCOT, V. *et al.* Protein-altering variants associated with body mass index implicate pathways that control energy intake and expenditure in obesity. **Nature Genetics**, v. 50, p. 26–41, 2018.

USDA (Department of Agriculture The United States). **Report of the Dietary Guidelines Advisory Committee on the Dietary Guidelines for Americans: to the Secretary of Agriculture and the Secretary of Health and Human Services**. Washington, DC: USDA and US DHHS, 2010. Disponível em https://www.dietaryguidelines.gov/sites/default/files/2020-07/ScientificReport_of_the_2020DietaryGuidelinesAdvisoryCommittee_first-print.pdf. Acesso jan/2021.

VAN WIJK, C. J. *et al.* Combined dietary folate, vitamin B-12, and vitamin B-6 intake influences plasma docosahexaenoic acid concentration in rats. **Nutrition Metabolism**, v.9,p.49,2012.

VARELA, L. M. *et al.* The effects of dietary fatty acids on the postprandial triglyceride-rich lipoprotein/apoB48 receptor axis in human monocyte/macrophage cells. **Journal Nutrition and Biochemistry**, v. 24, p. 2031–2039, 2013.

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. 241–53, 2013.

VOISIN, S. *et al.* Dietary fat quality impacts genome-wide DNA methylation patterns in a cross-sectional study of Greek preadolescents. **European Journal of Human Genetics**, v. 23, p. 654–662, 2015.

VOLKOV, P. *et al.* A Genome-Wide mQTL Analysis in Human Adipose Tissue Identifies Genetic Variants Associated with DNA Methylation. **Gene Expression and Metabolic Traits**, v. 2, p. 1-31, 2016.

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

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

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). **Guideline: Optimal Serum and Red Blood Cell Folate Concentrations in Women of Reproductive Age for Prevention of Neural Tube Defects**. Geneva: World Health Organization, 2015. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/161988/9789241549042_eng.pdf?sequence=. Acesso em jan/2021.

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

WIEN, T. N. *et al.* Cancer risk with folic acid supplements: A systematic review and meta-analysis. **British Medical Journal Open**, v. 2, n. 1, 2012.

WILLER, C. J. *et al.* Discovery and refinement of loci associated with lipid levels. **Nature Genetics**, v. 45, n. 11, p. 1274–83, 2013.

WINDHOLZ, J. *et al.* Copy number variations in "classical" obesity candidate genes are not frequently associated with severe early-onset obesity in children. **Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism**, v. 30, n. 5, p. 507-515, 2017.

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.

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

WU, P. *et al.* Serum TNF- α , GTH and MDA of high-fat diet-induced obesity and obesity resistant rats. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 24, n. 3, p. 333-336, 2016.

WUNDERLICH, C. M.; HÖVELMEYER, N.; WUNDERLICH, F. T. Mechanisms of chronic JAK-STAT3-SOCS3 signaling in obesity. **JAK-STAT**, v. 2, n. 2, p. 1-8, 2013.

XIA, Q.; GRANT, S. F. A. The genetics of human obesity. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1281, n. 1, p. 178-90, 2013.

YI, Y. *et al.* Economic burden of neural tube defects and impact of prevention with folic acid: a literature review. **European Journal of Pediatrics**, v. 170, n. 11, p. 1391–1400., 2011.

YOO, J.Y. *et al.* Can proopiomelanocortin methylation be used as an early predictor of metabolic syndrome? **Diabetes Care**, v. 37, n. 3, p. 734–739, 2014.

YUBERO-SERRANO, E. M. *et al.* Mediterranean diet supplemented with coenzyme Q10 modifies the expression of proinflammatory and endoplasmic reticulum stress-related genes in elderly men and women. **The Journals of Gerontology: Series A, Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 67, p. 3–10, 2012.

ZHANG, F. F. *et al.* Dietary patterns are associated with levels of global genomic DNA methylation in a cancer free population. **Journal of Nutrition**, v. 141, p.1165–1171, 2011.

ZHENG, J. *et al.* DNA methylation: the pivotal interaction between early-life nutrition and glucose metabolism in later life. **British Journal of Nutrition**, v. 112, n. 11, p. 1850-7, 2014.

APÊNDICE

APÊNDICE 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.


Dr. Eliane Marques D. Sousa
Coordenadora do CER/CCS/UFPB
Mat. SIAPE: 0332618

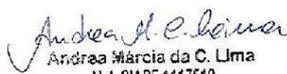
APÊNDICE B – CERTIDÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

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 9ª Reunião realizada no dia 22/10/2015, o Projeto de pesquisa intitulado: **“EFEITO DA DIETA RICA EM ANTIOXIDANTES E ÓLEO DE NOZ NO PERFIL DE METILAÇÃO DO DNA EM GENES RELACIONADOS AO METABOLISMO DE LIPÍDEOS E PROCESSO INFLAMATÓRIO”**, da pesquisadora Raquel Patrícia Ataíde Lima. Prot. nº 0478/15. CAAE: 48703115.0.0000.5188.

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


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

APÊNDICE C - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



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



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

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

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

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

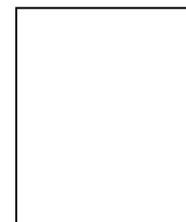
Destacamos neste termo que:

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

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

Participante ou responsável: _____

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



Impressão dactiloscópica (polegar direito)

Contato:

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

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

ANEXOS

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

Peso atual:_____ (em kg)

Altura atual:_____ (em m)

Circunferência do braço:_____ (em cm)

Dobra cutânea tricipital:_____ (em cm)

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

ANEXO C - 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
Almoço				(p25 – p50 – p75 – p100)
Lanche				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.
Jantar				Descrever neste recordatório se consome chá, caso sim, que tipo de chá, como também quantidade de água e horário.
Lanche Noturno				
Preferências Alimentares:				Descrever o tipo de cocção: -
Aversões Alimentares:				Fritura
				-Grelhado
				-Cozido
				- Assado

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

1 - EQUIVALENTES CEREAIS

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

Abreviaturas:

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

Feijão, ervilha, lentilha (FEL)

Alimentos Amiláceos preparados com Gordura (APG)

PÃES

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

CEREAIS E GRÃOS

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

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

VEGETAIS RICOS EM AMIDO

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

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

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

BISCOITOS E LANCHES

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

FEIJÕES, ERVILHAS E LENTILHAS

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

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

ALIMENTOS AMILÁCEOS PREPARADOS COM GORDURA

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

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

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

2 - EQUIVALENTE FRUTA

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

FRUTAS FRESCAS, CONGELADAS E ENLATADAS SEM AÇÚCAR

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

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

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

* 3 ou mais gramas de fibras por porção

•• Boa fonte de vitamina C

*** Boa fonte de vitamina A

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

3 – EQUIVALENTE LEITE

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

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

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

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

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

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

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

“Ler também estudo sobre prébiótico e probióticos capítulo 1”

4 – DOCES SOBREMESAS E OUTROS CARBOIDRATOS

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

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

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

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

5 – EQUIVALENTE VEGETAIS

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

½ xícara de legumes cozidos ou suco de legumes

1 xícara de legumes crus

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

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

*** Boa fonte de vitamina A

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

6 – EQUIVALENTE CARNE

CARNE MUITO MAGRA E SUBSTITUTOS

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

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

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

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

CARNES MAGRAS E SUBSTITUTOS

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

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

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

CARNES DE TEOR MÉDIO DE GORDURA E SUBSTITUTOS

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

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

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

CARNES DE ALTO TEOR DE GORDURA E SUBSTITUTOS

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

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

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

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

7 – EQUIVALENTE GORDURA

Uma porção corresponde a 5 g de lipídios e 45 kcal. Para crianças em idade pré-escolar uma porção de equivale a 37 kcal, aproximadamente 1 equivalente do adulto, que corresponde a aproximadamente 1 colher de chá rasa de gordura.

GORDURAS MONOINSATURADAS

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

GORDURAS POLINSATURADAS

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

GORDURAS SATURADAS

Bacon	Cozido	1 fatia
	Gordura	1 colher de chá
Manteiga	Tira	1 colher de chá
	Batida	2 colheres de chá
	Teor de gordura reduzido	1 colher de sopa

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

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

8 – ALIMENTOS LIVRES

BEBIDAS

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

SUBSTITUTOS DOCES

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

CONDIMENTO

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

TEMPEROS

Alho	Molho inglês
Ervas	Molho de soja

Especiarias

Molho de pimenta ardida

Pimenta

9 – LISTA DE ALIMENTOS DE COMBINAÇÃO

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

ARTIGO 1

Intervenção com folato dietético e óleo de avelã reduz níveis de metilação dos genes

***LEP e POMC* e peso corporal: um estudo randomizado**

TITULO DA REVISTA: Clinical Epigenetics

ÁREA: Nutrição

QUALIS: A1

INSS: 1868-7083

FATOR DE IMPACTO: 5.028

Intervention with dietary folate and hazelnut oil reduces methylation levels of *LEP* and *POMC* genes and body weight: a randomized trial

Abstract

Background: The prevalence of obesity has almost tripled in recent decades, representing a serious public health problem, among the various genes, cited genes that encode *LEP* and *POMC*, genes related to obesity, potentially associated to energy imbalance. Our objective was to assess the effect of dietary folate intervention and hazelnut oil at the methylation levels of the *LEP* and *POMC* genes and in weight loss. **Results:** Double-blind, placebo intervention study controlled with 40 overweight adult women. Participants were randomized into four groups for 8 weeks: G1, 300 g of vegetables and 191 µg / day of folate and hazelnut oil; G2, 300 g of vegetables and 191 µg / day of folate and placebo; G3, 300 g of vegetables and 94 µg / day of folate and hazelnut oil; G4, the individuals were only accompanied. Were evaluated: food consumption and anthropometric measurements. After the intervention, the participants presented reduction in the methylation levels of the studied genes in the three intervention groups in the *LEP* gene: G1 (49.20±14.78%; 42.60±11.91%), G2 (47.60±15.17%; 42.30±16.41%) and G3 (46.60±12.58%; 39.60±12.46%), before and after, respectively, in the *POMC* gene: G1 (43.50±11.45%; 38.10±9.97%), G2 (43.60±14.29; 39.30±13.61%) and G3 (40.80±13.70%; 36.40±13.38%) before and after, respectively, and weight loss in G2 (83.32±20.89kg; 80.56±20.90kg) and G3 (76.63±7.00kg; 73.48±6.70kg) before and after, respectively. **Conclusions:** The effect of eating a diet containing moderate dietary folate and hazelnut oil capsule on reducing the methylation levels of *LEP* and *POMC* genes and reducing body weight without altering energy consumption was demonstrated for the first time and is a potential result for treatment and prevention of obesity.

Keywords: Obesity. Epigenetics. Leptin. Proopiomelanocortin. Food consumption. Vegetables. Hazelnut oil.

BACKGROUND

The prevalence of obesity has almost tripled in recent decades, representing a serious public health problem (1, 2) in the world and in Brazil, highlighting that this morbidity is one of the three major global problems of today (3). Obesity is a consequence of an imbalance between excess consumption due to poor eating habits and an unhealthy lifestyle. Therefore, the prevalence of obesity suggests a deregulation of the appetite and energy homeostasis, with food intake and energy expenditure being regulated by short and long-term hormonal and neural signals, through the modulation of the expression of orexigenic and anorectic neuropeptides in the hypothalamus and in other brain regions involved in the control of this homeostasis (4, 5).

Obesity is of multifactorial origin, including among these factors the interaction of genetic predisposition, which induces inappropriate expression of genes or silencing others, and homeostasis deregulation of appetite and energy, which can lead to metabolic imbalances (6). Results from a wide range of genomic studies with associations of genetic variants that correlate with obesity explain less than 4% of body weight variability. Therefore, other mechanisms such as epigenetic alterations may play a role in the regulation of body weight (7).

Among the variables involved with DNA and body weight methylation that can help in understanding the results are food consumption variables (8), anthropometric measurements (9), and biochemistry (10).

Among the various genes, Windholz *et al.* (11) cited genes that encode *LEP* and *POMC*, genes related to obesity, potentially associated to energy imbalance. The *LEP* gene produces the hormone leptin, expressed as a proportion of body fat, plays a role in energy homeostasis and appetite regulation (12). Leptin expression is regulated by DNA methylation of the *LEP* gene promoter, which has been shown to be altered in obese patients (13). Leptin interacts with a complex neural circuit to control food intake, activating anorexic neurons that synthesize POMC (14).

The *POMC* gene produces proopiomelanocortin, a pro-hormone that plays an important role in the brain in regulating appetite, body weight, and energy homeostasis (15). High levels of *POMC* methylation have been associated with weight gain in children (16). In this sense, *LEP* and *POMC* genes are good candidates to investigate the potential effects of changes in methylation levels on obesity (17).

Among the predisposing factors of this morbidity, the environmental obesogens, such as inadequate folate consumption, involved in DNA synthesis and methylation (18, 19, 20) stands out among these factors. However, consuming the amounts recommended by Dietary Reference Intake (DRI) folate, from the usual consumption of different vegetables, is not always feasible, probably due to the large volume of them to fulfill these recommendations.

Considering also that most specialists recommend up to 5 portions of different vegetables per day and emphasizing that even after the advent of food production fortified with vitamins and/or minerals, either in the USA, Europe (21, 22), and even particularly in João Pessoa/Paraíba/Brazil (23, 24, 25), an inadequate intake of folate is observed, however, in most of these studies the average plasma values of folate were within the reference values.

As for fats, they also perform important functions in epigenetic modulation (26, 27, 28). In this sense, according to Voisin *et al.* (29) qualitative and quantitative effects occur regarding fat intake on transcription modification of key genes involved in pathways related to lipid and glucose metabolism and/or inflammation.

In this aspect, hazelnut oil, rich in monounsaturated fat has a possible involvement in the methylation process and in the regulation of expression of genes related to weight control and an association is found between the methylation levels of these genes and the consumption of monounsaturated fats in women with normal weight, overweight and obese (30). As well as folate, an important cofactor in DNA synthesis, which participates in the donation of methyl groups

regulating methylation reactions, the adequate state of folate, i.e., plasma values within the reference values being an important determinant in the normal status of DNA methylation (31).

Therefore, the present study aimed to evaluate the effect of dietary folate and hazelnut oil intervention on the methylation levels of *LEP* and *POMC* genes and on weight loss.

Materials and Methods

Study Characterization

This is a double-blind, placebo-controlled intervention study linked to a population-based study entitled " II Ciclo de Diagnóstico e Intervenção da Situação Alimentar, Nutricional e das Doenças não Transmissíveis mais Prevalentes da População do Município de João Pessoa/PB (II DISANDNT/JP)II [Cycle of Diagnosis and Intervention of the Most Prevalent Food, Nutritional and Transmissible Situation of the Population of the Municipality of João Pessoa / PB (II DISANDNT / JP)]" (32), conducted between May 2015 and May 2016.

Inclusion criteria for the study were: adult women, aged 20 to 59 years, overweight or obese, body mass index (BMI) 25.0-35.0 kg / m², with different socioeconomic levels, drug users or not (except those who interfered with folic acid metabolism in the last three months), and with preserved cognitive function. The exclusion criteria were: alcoholism, smoking, neuropsychiatric disorders, use of drugs known to interfere with folic acid metabolism (in the last 3 months), use of multivitamin or mineral supplements, use of anorexics or anabolic substances, chronic diseases affecting the endocrine and metabolic system, pregnancy, plans to become pregnant, and weight loss during the study period.

After screening, 40 adult women were selected by convenience sample and were duly instructed as to the study objectives according to the ethical guidelines; subjects consented to

participate by signing an informed consent form. The trial was approved by the CCS/UFPB Research Ethics Committee under protocol number 0569/15 and registered in clinical trials under NCT 04523532.

Intervention Protocol

The participants were recruited in February 2016, based on the aforementioned population-based project. The women were followed for 9 weeks, the first week referring to the allocation of participants in the groups and were also given an individual dietary plan, with the end of the intervention in May 2016.

After assessing the eligibility criteria, the women were instructed to maintain the same weight, eating habits and physical activity levels found during the initial assessment (33) and were also given an individual dietary plan 1 week before starting the intervention. All drug treatments remained unchanged throughout the study. At the end of the study, all participants received nutritional counseling for weight loss.

To calculate energy expenditure, the DRI formulas were used to maintain body weight. Macronutrients were distributed according to American Heart Association (AHA) recommendations (34), and the calculation and analysis of nutrients present in the recommended diet were performed using the food equivalent system proposed by Costa (35). The diet contained the following distribution of macronutrients: carbohydrates: 45-65% (recommended level of 55%), protein: 10-35% (recommended level of 15%), and total fat: 25-35% (recommended 30% level).

Before the intervention began, the 40 women were allocated to four groups with 10 each, through randomization using STATA Software version 14.

Group 1 (G1), in which subjects received 300 g of vegetables and legumes containing an average of 191 µg / day of folate and 1 capsule of hazelnut oil (25 g); group 2 (G2), in which subjects

received 300 g of vegetables and legumes containing an average of 191 μg / day of folate and 1 capsule of placebo; group 3 (G3), in which subjects received 300 g of vegetables and legumes containing on average 94 μg / day of folate and 1 capsule of hazelnut oil (25 g); and group 4 (G4), in which subjects were only accompanied and maintained their regular eating habits.

To achieve the planned folate concentrations for each group, the following foods were used: lentils, soybeans, corn, peas, carrots, zucchini, lettuce, chard, beetroot, broccoli, cauliflower, tomato and cucumber. The hazelnut oil capsule offered was composed basically of monounsaturated fat (68%), rich in oleic acid. Each group was composed of 10 women, who received vegetables and vegetables rich in folic acid daily for a total period of 8 weeks.

Nutritional and Dietary Evaluation

The body weight was measured in triplicate and the average of the three values was used. To evaluate the habitual food consumption of individuals, four 24 Hour Food Recalls (R24h) were applied, the first two were applied before the beginning of the intervention, with the objective of knowing the eating habits to subsidize the preparation of the menu and after the plateau week, the third R24h was applied to verify adherence to the proposed nutritional counseling.

At the end of the 8-week intervention period, the fourth R24h was applied in order to analyze the habitual intake of calories and nutrients, in order to verify if there was adherence to the recommendations and change in food consumption in general and folate after the intervention.

To complete the R24h, a food photo album with home measurements was used and based on the average food intake validated for this population, minimizing possible biases of this method (36, 37).

Food was analyzed by Dietwin nutrition software, the Multiple Source Method (MSM) was used to estimate the individual's regular intake of repeated measurements over a given period; variation in intake was not affected by the method (38).

The other anthropometric variables and biochemical analyses of lipid profile and oxidative stress were already described in a previous study by Lima *et al.* (39), with the exception of the methylation levels of the *LEP* and *POMC* genes and differences in the groups before and after the intervention on body weight, food consumption of folate, oleic acid and monounsaturated fats.

Level Methylation Analysis for *LEP* and *POMC* genes

Blood collection occurred in the morning at the same time, before and after the completion of the intervention. The peripheral blood DNA was isolated using the Minikit Genomic DNA PureLink™ (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) following the protocol described by the manufacturer. The genomic DNA was modified by bisulfite from the Cells-to-CpG bisulfite conversion kit™ (Applied biosystems, Life Technologies, California) according to the manufacturer's instructions. PCR amplification and High-Resolution Melting (HRM) analysis were performed in the Applied Biosystems 7500 Fast System (39) software.

The PCR was performed on a total volume of 20µl containing: AmpliTaq® Gold 360 Buffer, 10x, 25mM Mg Chloride, Melt/Doctor™ HRM Dye (20x), 25nM from each primer with the primer sequences (5' to 3') for the *LEP* and *POMC* genes, according to table 1. The qPCR program consisted of an initial enzymatic activation at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 15 s at 95°C, 60 s at 60°C and a final extension at 95°C 10s, 60°C 60s, 95°C 15s and 60°C 15s. The samples were analyzed in a randomized manner by intervention groups, all analyzes were performed on PCR plates in triplicate.

Table 1. Primers used to analyze methylation status.

Gene	Primers (F/R)	T _A (°C)	Product (bp)	Sites CpG	Genomic Location
<i>LEP</i>	5' GCTGGTCCTTGCGCCATAGT3'	59°	275 bp	4	chr7:128,241,278-128,257,629
	5' CGGCCCGATCACAACTTGCG3'				
<i>POMC</i>	5'ACGGCTCCTGACTTCTGCTC 3'	59.8°	143 bp	5	chr2:25,160,853-25,168,903
	5'ACGGCTCCTGACTTCTGCTC 3'				

F – forward; R – reverse; T_a – annealing temperature

The fusion curves were normalized by calculating the 'best fit line' between two normalization regions before and after the main fluorescence decrease representing the fusion of the PCR product using the software provided with HRM, Applied Biosystems 7500 FAST System v 2.0 Real Time PCR Software.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using software R version 3.6.2. Values are shown as mean \pm standard deviation (SD) of continuous variables. After comparing the four groups (ANOVA), a comparison was made before and after intervention in each group. Among the significant results, to check if there were differences (between the means) in the study variables, before and after the intervention in each group, the t and Wilcoxon tests were used, for paired samples, for normal and non-normal data, respectively. Regarding data normality, the Kolmogorov-Smirnov test was used. The level of significance adopted for all analyses was 5%.

Results

The population was composed by 40 overweight women, presenting the following characteristics: age, 44 ± 10.1 years, weight before intervention was 77.7 ± 14.1 kg and after intervention, 74.4 ± 14 kg. Regarding other socioeconomic, demographic, epidemiological, biochemical and lifestyle variables, Lima *et al.*, 2017, observed that there were no significant differences before the intervention between the groups, as well as no differences in the methylation levels of the two genes studied before the intervention between the groups.

Table 2 shows the comparison of means on the methylation levels of *LEP* and *POMC* genes in the groups before and after the intervention and in the control group oriented to maintain dietary habits. From the analyses of the differences in the groups before and after the intervention regarding the methylation levels of the *LEP* and *POMC* genes, significant differences can be observed between the methylation levels of these genes in the three intervention groups, but only for the methylation levels of the *POMC* gene in the control group was there a difference.

Table 2. Comparison of methylation levels of the genes studied before and after intervention in each group.

Groups	Before	After	p-value
Group 1			
Intervention with 191 μ g of folate + hazelnut oil capsule			
<i>LEP</i> methylation (%)	49.20 ± 14.78	43.50 ± 11.91	0.0085 ^{*1}
<i>POMC</i> methylation (%)	43.50 ± 11.45	39.50 ± 9.97	0.0190 ^{*1}
Group 2			
Intervention with 191 μ g of folate + placebo capsule			
<i>LEP</i> methylation (%)	$47.60 \pm 15,17$	42.30 ± 16.41	0.0034 ^{*1}
<i>POMC</i> methylation (%)	$43.60 \pm 14,29$	39.30 ± 13.61	0.0190 ^{*1}

Group 3			
Intervention with 94 µg of folate + hazelnut oil capsule			
<i>LEP</i> methylation (%)	46.60 ± 12.58	39.60 ± 12.46	0.0056* ¹
<i>POMC</i> methylation (%)	40.80 ± 13.70	36.40 ± 13.38	0.0109* ¹
Group 4			
Oriented to maintain eating habits			
<i>LEP</i> methylation (%)	45.70 ± 14.97	36.40 ± 14.31	0.0762 ¹
<i>POMC</i> methylation (%)	38.70 ± 13.43	33.80 ± 12.19	0.0176* ¹

1-test t; *-statistically significant

Figure 1 shows the comparison between the average body weight values in each group before and after the intervention and in the control group oriented to maintain eating habits. In group 1, after the intervention with dietary folate and hazelnut oil capsule, no statistically significant difference was observed between body weight values. In group 2, after the intervention containing dietary folate, and in group 3, with intervention containing less dietary folate (moderate) and hazelnut oil, a reduction in body weight values was observed with significant results. Regarding group 4, which were oriented to maintain their eating habits, it was observed that there were changes in their eating habits from the significant differences found in body weight comparing the moments before and after the intervention, as well as from a greater consumption of folate (p-value = 0.005, results not demonstrated) and monounsaturated fat (p-value = 0.000, results not demonstrated), occurring the same in relation to the intervention groups, that is, with significant differences.

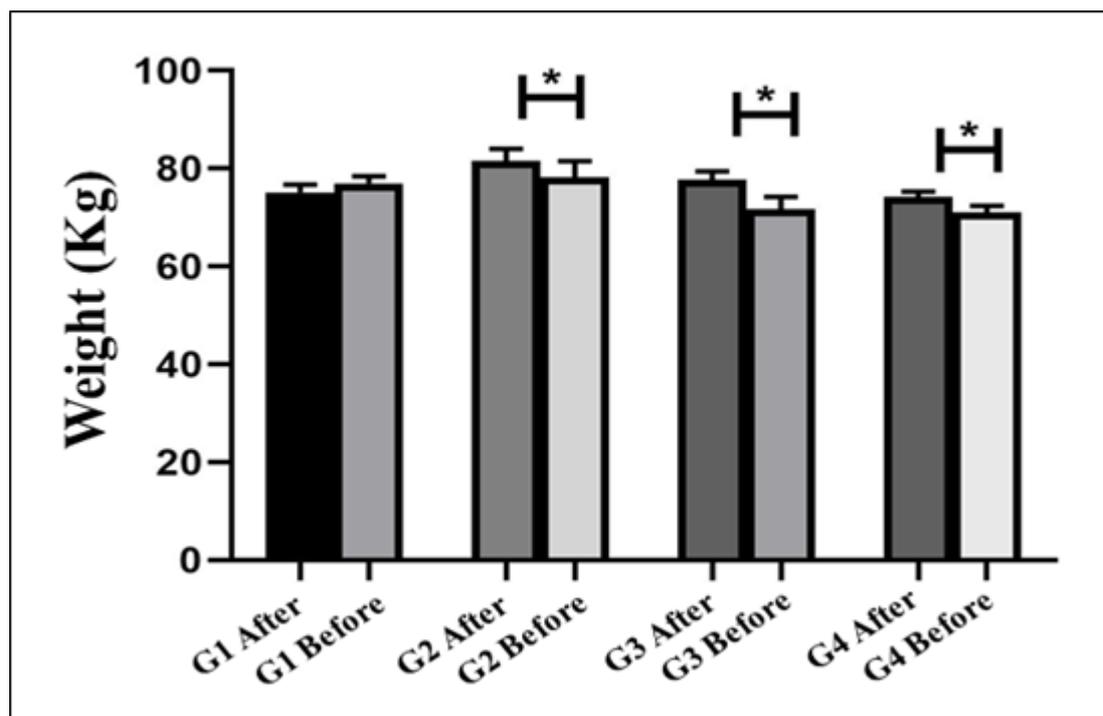


Figure 1. Comparison between the mean body weight values in each intervention study group and in group 4 (mean \pm standard deviation). G1 x G1, p-0.373; G2 x G2, p-0.005, G3 x G3, p-0.000; G4 x G4, p-0.000.

Figure 2 shows the comparison between the mean values of usual food consumption of folate, monounsaturated fat, oleic acid and total calories in each group before and after the intervention and in the control group oriented to maintain eating habits. In group 1, after the intervention with dietary folate and hazelnut oil capsules, a statistically significant difference was observed between the values of habitual consumption of folate (figure 2A), monounsaturated fat (figure 2B) and oleic acid (figure 2C). In group 2, after intervention containing dietary folate, an increase in the usual consumption of folate was observed with significant results (figure 2A).

In relation to group 3, after intervention with dietary folate in moderate amounts and hazelnut oil capsules, statistically significant differences were observed in the increased consumption of folate (figure 2A), monounsaturated fat (figure 2B) and oleic acid (figure 2C). As for group 4, which were oriented to maintain their eating habits, it was observed that there were changes in their eating habits

from the significant differences found in the consumption of folate and monounsaturated fat comparing the moments before and after intervention.

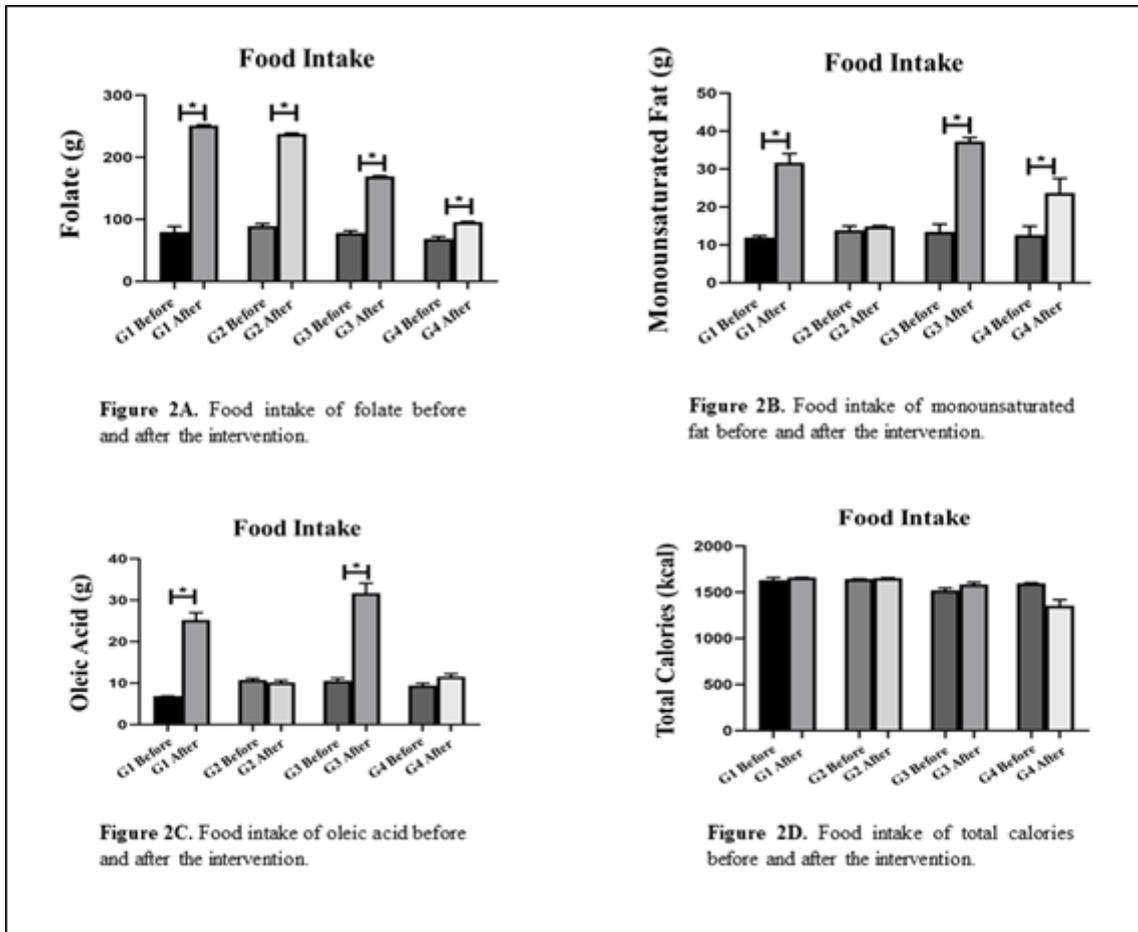


Figure 2. Comparison between the mean values of usual food consumption in each intervention study group and in group 4 (mean \pm standard deviation). **2A:** G1xG1, p-0.001; G2xG2, p-0.001; G3xG3, p-0.001; G4xG4, p-0.005. **2B:** G1xG1, p-0.000; G3xG3, p-0.000; G4xG4, p-0.000. **2C:** G1xG1, p-0.005; G3xG3, p-0.000.

Discussion

In the present study, a reduction in the methylation levels of *LEP* and *POMC* genes and body weight loss were observed in group 3, with diet containing moderate amounts of dietary folate and

hazelnut oil with no change in energy consumption when comparing the moments before and after intervention, as well as in group 2 with intervention containing more dietary folate.

Probably, the consumption of a greater amount of dietary folate (median of 164 μg as intervention + 86 μg of the usual diet = 250 μg of folate, corresponding to 62.5% of the Estimated Average Requirement (EAR) together with an intervention with hazelnut oil, rich in monounsaturated fats (median of 17.39g as intervention + 13g of the usual diet = 30.39g corresponding to 18.7% of the total calories), interfered so that there was no change in body weight in group 1, although not changing the consumption of total calories.

From this result it is pertinent to discuss the amounts used in the literature of these nutrients that may be related to levels of methylation and weight loss, considering that the diet remained isocaloric before and after the intervention.

In this aspect, low dietary folate and monounsaturated fatty acids consumption was observed in most studies (29, 33), as it occurred in the present study, where folate consumption ranged from medians of 66 μg to 250 μg before and after intervention, respectively, and from 11.38g (6.08% of the total caloric value of the diet) to 34.90g (9, 19% of the total caloric value of the diet) of monounsaturated fat consumption before intervention in the three intervention groups representing low to moderate consumption of monounsaturated fatty acids (MUFAs), so the supplementation with these two nutrients as an intervention in the present study was pertinent, as it contributed to come closer to the recommendations of the EAR of 400 μg of folate (40) and of MUFA <20% (41).

The mechanisms that explain the relationship between folate metabolism and obesity are still limited (42). Scholars have demonstrated significant associations between serum folate, DNA methylation, BMI and body fat percentage (43). In total, these findings corroborate the hypothesis that a greater intake of folate could act as a protective factor against obesity by epigenetic mechanisms, involving the reduction of homocysteine values.

In the present study, with the consumption of the intervention with folate and hazelnut oil, rich in MUFA, a reduction in the methylation levels of the *LEP* and *POMC* genes and in body weight was also observed. In another study of this same group it was observed that the diet with folate and hazelnut oil was associated with decreased level of methylation of the *ADRB3* gene (39).

In the study by Voisin *et al.* (29), who studied relationships between different types of fatty acids and different genes in adolescents, the authors highlighted specific alterations in DNA methylation that may play an important role in the mechanisms involved in physiological responses to different types of fat in the diet, the authors also observed that fat quality is likely to influence DNA methylation on a genomic scale, as occurred in the present study in the G3 group.

As for the different types of fatty acids, these can influence DNA methylation associated with gene repression or activation. Food intake of MUFA can affect the methylation levels of some cytosines, perhaps contributing to modulate the expression of, for example, the circadian cycle gene (30). In this sense, MUFAs have been related to the prevention of metabolic changes, including obesity (44). However, the mechanisms underlying the effects of different types of fatty acids on epigenetic marks are not yet fully known (19).

In this respect, different types of fatty acids have different oxidation and deposition rates that may contribute to fat accumulation and weight gain. Scholars have shown the positive effects of MUFA on weight control, increasing the postprandial fat oxidation induced by dietary thermogenesis compared to polyunsaturated fatty acids (45, 46). By measuring the isotope-labeled fatty acids, some scholars found that MUFA oxidation was higher than n-6 polyunsaturated fatty acids in an animal model (47) with similar results in humans (48).

Regarding the relationship between *LEP* gene methylation levels and body weight, it has been reported that plasma leptin concentrations are increased in obese individuals (49). However, specific populations demonstrated opposite results, as in the study by Neiazy *et al.* (50), when verifying that patients with anorexia nervosa presented levels of *LEP* gene methylation below the cutoff value

($30.94 \pm 13.2\%$ vs. controls with $34.53 \pm 14.6\%$) presented an increase in BMI over time, while those above the cutoff point had a decrease in BMI. Similar results were obtained by Houde *et al.* (13), demonstrating that lower levels of DNA methylation of the *LEP* gene in blood cells were associated with higher BMI in severely obese men and women.

A previous study showed that a decrease in the level of methylation of the *LEP* gene in blood tissue was associated with an increase in plasma leptin levels (51). Although no expression analysis was performed in this study, the profile found may be associated with increased expression of *LEP*, which could explain the observed weight loss, since *LEP* is involved in the coordinated regulation of food consumption (satiety) and energy expenditure (52).

Corroborating the results of the present study, in a study to evaluate the methylation profile and expression of the *LEP* gene in obese women, a hypocaloric diet-induced weight loss was observed, accompanied by hypomethylation of *LEP* in association with increased expression of *LEP* in the white fat tissue and liver (53), however, in the present study the weight loss occurred with an intervention for weight maintenance, highlighting the possible role of methylation levels, evaluated in the blood.

Researchers suggest that the methylation levels of gene *LEP* are hyper-methylated in obesity. A high-fat diet initially reduced the methylation of the *LEP* promoter for up to 8 weeks, but prolonged high-fat diet for more than 12 to 14 weeks increased the methylation of the *LEP* gene, especially in epididymal fat in adult and obese rats (54, 55).

In addition, in studies with fetal metabolic programming in humans and rodent models it was observed that lower levels of *LEP* methylation in blood, placenta, liver and muscle are associated with risk for obesity and metabolic diseases in the offspring (56, 57, 58), highlighting that in the present study there was a reduction in methylation levels and weight, but that because they were women with a not very high BMI, 29.2 ± 5.1 kg/m² (results already published in the study by Lima *et*

al. (39), the methylation levels before the intervention were not high either, but even so the effect of the intervention occurred, reducing these levels and body weight.

Regarding genes, *POMC* is mainly expressed in nervous tissue (15) and *LEP* in fat tissue (58), however, these genes were also demonstrated to be expressed in blood tissue and methylation levels were modulated by environmental factors (alcohol intake) showing association with their expression (51, 60).

This system acts in a regulatory manner, and involves the opposite actions of *POMC* (anorexigenic) and agouti-related protein (orexigenic) in response to circulating hormones and nutrients that reflect the availability of energy. Arched nucleus neurons regulate both food consumption and metabolic rate. Identifying the factors that regulate the *POMC* neuron is an important step in the development of effective therapies against obesity (61).

Still regarding the *POMC* gene, lower levels of methylation were also observed in relation to lower body weight in the literature (7, 15, 62) and in the present study. It is known that *LEP*-coded leptin regulates *POMC* transcription (63), which can lead to greater expression of this gene influencing body weight reduction in overweight groups, from the intervention performed in the present study that contributes to reducing methylation levels and regulating the increase in energy expenditure and consequently the metabolic rate.

The control group in the present study also presented a reduction in body weight, which may be justified due to the fact that these are women classified as overweight and obese, who although committed not to change their lifestyle, but because the study involved nutritionists in home visits carried out, it was observed that they may have changed their usual food consumption as already justified in literature (64-66).

In fact, the results of the present study corroborate the literature demonstration that monounsaturated fats and dietary folate can modulate the levels of DNA methylation and be called nutriepigenetic regulators (30, 67, 68). Nutriepigenetic regulation can be an important tool in the

control of the most varied conditions and pathologies, since by modulating the levels of methylation of a gene, its expression can be modified and thus alter several cellular pathways.

As a strong point of the study, it stands out as being the first to be performed with levels of methylation of *LEP* and *POMC* genes and body weight. As limits of this study it is observed the absence in the male casuistry, as well as *LEP* and *POMC* expression analysis that could better elucidate its relation with methylation levels and weight loss.

Conclusion

In conclusion, in the present study we demonstrate the effect of the intervention with moderate amount of dietary folate and hazelnut oil in reducing the methylation levels of *LEP* and *POMC* genes in the three intervention groups, as well as body weight reduction with isocaloric energy consumption in groups 2 and 3. This finding was demonstrated for the first time and is a potential result for treatment and prevention of obesity.

1.1.1. List of abbreviations

II	“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 [Cycle II of Diagnosis and Intervention of the Food, Nutritional and Non-Communicable Diseases Statuses of the Population of the Municipality of João Pessoa/PB]
DISANDNT/JP	
AHA	American Heart Association

BMI	Body Mass Index
DRI	Dietary Reference Intake
EAR	Estimated Average Requirement
LEP	Leptin
MSM	Multiple Source Method
MUFA	Monounsaturated fatty acids
POMC	Proopiomelanocortin
R24H	24 hour food recalls

Declarations

Ethics approval and consent to participate

The study was approved by the Research Ethics Committee of the CCS/UFPB, under the protocol number 0569/15, registered in clinical trials under NCT 02846025, and complied the declaration for human research. All subjects gave their written informed consent.

Consent for publication

Not applicable.

Availability of data and materials

The data set generated and analyzed during the current study are available in the repository [FAIRSHARING], [<https://fairsharing.org/biodbcore-001735/>].

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

Not applicable.

Authors' contributions

TRC contributed to data management, statistical analysis, data interpretation, and writing of the manuscript. RPAL contributed to data management, statistical analysis and data interpretation. MRR and RCPL contributed to data management. NFPdeO coordinated the DNA methylation analyses and were involved in the critical review of the manuscript. AHAS contributes to statistical analysis and data interpretation. FELLF and MdaCRG contributed to the analysis of food consumption. ATCA and RMdeM contributed to the study design and statistical analysis. ASdaS contributed to the biochemical analyses. RTL contributed to data acquisition. MJdeCC contributed to the study design, statistical analysis, data interpretation, and writing of the manuscript; she coordinated data collection and was involved in the development of the manuscript or in the critical review of relevant intellectual content. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

To the project coordinator Prof. Dr. Maria José de Carvalho Costa, and her respective team composed of teachers, Master's, Doctoral and undergraduate students, and the research collaborators (Post-Graduation program in Nutritional Sciences/Federal University of Paraíba).

Authors' information

¹Department of Nutrition, Undergraduate Nutrition Sciences, ICSNH - Interdisciplinary Center for Studies in Nutrition and Health, Federal University of Paraíba, Brazil. ²Department of Nutrition, Faculty of Applied Sciences – FAS, State University of Campinas – UNICAMP, Brazil. ³Department of Nutrition, University of Piauí, Brazil. ⁴Department of Molecular Biology, Center for

Exact and Natural Sciences, Federal University of Paraíba, Brazil. ⁵Department of Statistics, Center of Exact Sciences and Nature, Federal University of Paraíba, Brazil. ⁶Program Graduate in Nutritional Sciences, Department of Nutrition, Health Sciences Center, ICSNH - Interdisciplinary Center for Studies in Nutrition and Health / Federal University of Paraíba, Brazil. ⁷Department of Economics, Federal University of Paraíba, Brazil. ⁸Department of Physical Education, PTRLAPH - Physical Training Research Laboratory Applied to Performance and Health, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, Brazil. Present Address: Pós-graduação em Ciências da Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, NIESN–Núcleo Interdisciplinar de Estudos em Saúde e Nutrição / Universidade Federal da Paraíba, Castelo Branco, João Pessoa, PB 58059-900, Brazil.

References

1. WHO. World Health Organization. Health Topics: Obesity [access in 13 Ago 2018]. Available at: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/2018
2. Keller M, Hopp L, Liu X, Wohland T, Rohde K, Canello R, *et al.* Genome-wide DNA promoter methylation and transcriptome analysis in human adipose tissue unravels novel candidate genes for obesity. *Molecular Metabolism*. 2017;6(1):86–100.
3. Swinburn BA. *et al.* The Global Syndemic of Obesity, Undernutrition, and Climate Change: The Lancet Commission report. *The Lancet*. 2019; 393:791-846.
4. Cifani C, Bonaventura MVM, Pucci M, Giusepponi ME, Romano A, Francesco A, Maccarrone M, D'Addario, C. Regulation of hypothalamic neuropeptides gene expression in diet induced obesity resistant rats: possible targets for obesity prediction? *Front. Neurosci.*, 2015;9(187):1-9.
5. Nicolaidis S, Environment and obesity. *Metabolism*, 2019;100:153942.

6. Laursen TL, Zak RB, Shute RJ, Heesch MWS, Dinan NE, Bubak MP, la Salle DT, Slivka DR. Leptin, adiponectin, and ghrelin responses to endurance exercise in different ambient conditions. *Temperature*, 2017; 4:166–175.
7. Kuehnen P, Mischke M, Wiegand S, Sers C, Horsthemke B, Lau S, *et al.* An Alu Element–Associated Hypermethylation Variant of the *POMC* Gene Is Associated with Childhood Obesity. *Plos Genetics*, 2012;8(3):1-12.
8. Parrillo, L. *et al.* Nutritional Factors, DNA Methylation, and Risk of Type 2 Diabetes and Obesity: Perspectives and Challenges. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20, 2983:1-17.
9. Reed ZE, *et al.* The association of DNA methylation with body mass index: distinguishing between predictors and biomarkers. *Clin. Epi.* 2020;12(5):1-13.
10. Castellano-Castillo D, *et al.* Altered Adipose Tissue DNA Methylation Status in Metabolic Syndrome: Relationships Between Global DNA Methylation and Specific Methylation at Adipogenic, Lipid Metabolism and Inflammatory Candidate Genes and Metabolic Variables. *J Clin Med.* 2019;8(1):1-17.
11. Windholz J, Kovacs P, Schlicke M, Franke C, Mahajan A, Morris AP, *et al.* A Copy number of variations in "classical" obesity candidate genes are not frequently associated with severe early-onset obesity in children. *JPEM.* 2017; 30(5):507-515.
12. Kroll C, Silmara SBS, Mastroeni PJ, Veugelers M, Mastroeni F. Associations of *ADIPOQ* and *LEP* Gene Variants with Energy Intake: A Systematic Review. *Nutrients*, 2019;11(4):1-14.
13. Houde AA, Legare C, Biron S, Lescelleur O, Biertho L, Marceau S, *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 Med Genet.* 2015; 16:29.
14. Yupanqui-Lozno N, *et al.* Congenital Leptin Deficiency and Leptin Gene Missense Mutation Found in Two Colombian Sisters with Severe Obesity. *Genes*, 2019;10(32):1-11.

15. Candler T, Kühnenb P, Prenticea AM, Silvera M. Epigenetic regulation of *POMC*; implications for nutritional programming, obesity and metabolic disease. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2019; 54:1-18.
16. Kwon EJ, *et al.* Association between the DNA methylations of *POMC*, *MC4R*, and *HNF4A* and metabolic profiles in the blood of children aged 7–9 years. *BMC Ped*, 2018;18(121)1-8.
17. Kuhnen P, Handke D, Waterland RA, Wiegand S, Gruters A, Krude H. Interindividual Variation in DNA Methylation at a Putative *POMC* Metastable Epiallele Is Associated with Obesity. *Frontiers in Psychiatry*. 2016; 24:502-509.
18. Mahmoud AM, Mohamed MA. Methyl Donor Micronutrients that Modify DNA Methylation and Cancer Outcome. *Nutrients*, 2019;11(68):1-30.
19. Pereira GA. *Et al.* Dietary Folate Intake Is Negatively Associated with Excess Body Weight in Brazilian Graduates and Postgraduates (CUME Project). *Nutrients*. 2019 Mar; 11(3): 518.
20. Frederick, A. L. Impact of Bodyweight on Tissue-Specific Folate Status, Genome Wide and Gene-Specific DNA Methylation in Normal Breast Tissues from Premenopausal Women. Masters Theses. Massachusetts: University of Massachusetts Amherst, 2018.
21. Schätzer M, Rust P, Elmadfa I. Fruit and vegetable intake in Austrian adults: Intake frequency, serving sizes, reasons for and barriers to consumption, and potential for increasing consumption. *Public Health Nutr*, 2010;13(4):480-487.
22. USDA. United States Department of Agriculture. Vegetables and Pulses Outlook No. 362. 43 pp. Available in: <https://www.ers.usda.gov/publications/pub-details/?pubid=93032>. Accessin: 15 April 2020.
23. Lisboa JVC, *et al.* Food intervention with folate reduces TNF- α and interleukin levels in overweight and obese women with the *MTHFR C677T* polymorphism: a randomized trial. *Nutrients*, 2020;2:361.

24. Lima RPA, *et al.* Obesity Is Associated with Increased Red Blood Cell Folate Despite Lower Dietary Intakes and Serum Concentrations. *Biol Res.* 2019; 52(21):1-11.
25. Luna RCP, *et al.* α -Tocopherol influences glycaemic control and miR-9-3 DNA methylation in overweight and obese women under an energy-restricted diet: a randomized, double-blind, exploratory, controlled clinical trial. *Nutr Metab*, 2018;15:1-11.
26. Aronica L, Levine AJ, Brennan K, Mi J, Gardner C, Haile RW, Hitchins MP. A Systematic Review of Studies of DNA Methylation in the Context of a Weight Loss Intervention. *Epigenomics*, 2017; 9(5):769-787.
27. Keller M, Hopp L, Liu X, Wohland T, Rohde K, Cancelo R, Klos M, *et al.* Genome-wide DNA promoter methylation and transcriptome analysis in human adipose tissue unravels novel candidate genes for obesity. *Mol Metab.* 2017;6(1):86–100.
28. Goodarzi MO. Genetics of obesity: what genetic association studies have taught us about the biology of obesity and its complications. *Lancet.* 2018; 6(3):223-236.
29. Voisin S. *et al.* Dietary fat quality impacts genome-wide DNA methylation patterns in a cross-sectional study of Greek preadolescents. *Eur J Hum Gen.* 2015; 23:654–662.
30. Milagro FI, Gómez-Abellán P, Campión J. CLOCK, PER2 and BMAL1 DNA methylation: association with obesity and metabolic syndrome characteristics and monounsaturated fat intake. *Chronobiology International Journal*, 2012;29:1–15.
31. Li Q, Ding L, Jing N, Liu C, Yang Z, Chen F, *et al.* Folate deficiency and aberrant DNA methylation and expression of FHIT gene were associated with cervical pathogenesis. *Oncology Letters.* 2018; 15:1963-1972.
32. Costa MJC, Franchescinni S, Diniz SA, 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.

33. Switzeny OJ, Müllner E, Wagner KH, Brath H, Aumüller E, Haslberger AG. Vitamin and antioxidant rich diet increases MLH1 promoter DNA methylation in DMT2 subjects. *Clin Epigenetics*. 2012; 4:1. 11. AHA (American Heart Association). Dietary Guidelines for American
34. AHA (American Heart Association). Dietary Guidelines for American. 2010. <http://www.heart.org/HEARTORG/>. Access in: 01 May 2016.
35. Costa MJCC. Nutrição clínica: uso do sistema de equivalentes na prática dietoterápica. 2nd ed. João Pessoa: Editora da UFPB; 2013.
36. Ascitti LSR. Manual de porções média em tamanho real baseado no programa dietsys para estudo de base populacional. João Pessoa: Editora da UFPB; 2005.
37. Lima FE, Latorre Mdo R, Costa MJ, Fisberg RM. Diet and cancer in Northeast Brazil: evaluation of eating habits and food group consumption in relation to breast cancer. *Cad Saude Publica*. 2008;24(4):820–8.
38. MSM. The Multiple Source Method. Department of Epidemiology of the German Institute of Human Nutrition Potsdam. <https://msm.dife.de/tps/msm/>. Accessed 17 Nov 2014.
39. Lima RPA, *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. 2017;9(110):1-9.
40. IOM. Institute of Medicine. DRI - dietary reference intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. National Academy Press. Washington D.C: Institute of medicine, 2001.
41. NCEP. National Cholesterol Educative Program. Heart, Lung, and Blood Institute: Detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel III), Final report, U.S. Department Of Health and Human Services, NIH Publication n. 02-5215, Bethesda, Md, September 2002.

42. Bird JK, *et al.* obesity is associated with increased red blood cell folate despite lower dietary intakes and serum concentrations. *J. Nutr.* 2014; 145:79–86.
43. Piyathilake CJ, *et al.* A lower degree of PBMC L1 methylation is associated with excess body weight and higher HOMA-IR in the presence of lower concentrations of plasma folate. *PLoS ONE.* 2013;8: e54544.
44. González-Becerra K, *et al.* Fatty acids, epigenetic mechanisms and chronic diseases: a systematic review. *Lipids in Health and Disease.* 2019;18(178):1-18.
45. Takeuchi H, *et al.* Diet-induced thermogenesis is lower in rats fed a lard diet than in those fed a high oleic acid safflower oil diet, a safflower oil diet or a linseed oil diet. *J. Nutr.* 1995;125:920–925.
46. Piers LS, *et al.* The influence of the type of dietary fat on postprandial fat oxidation rates: Monounsaturated (olive oil) vs saturated fat (cream). *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 2002; 26:814–821.
47. Bruininx E, *et al.* Oxidation of dietary stearic, oleic, and linoleic acids in growing pigs follows a biphasic pattern. *J. Nutr.* 2001; 141:1657–1663.
48. McCloy, U. *et al.* A comparison of the metabolism of eighteen-carbon ¹³C-unsaturated fatty acids in healthy women. *J. Lipid Res.* 2004; 45:474–485.
49. Hjort L, Jorgensen S, Gillberg L, Hall E, Brons C, Frystik J, *et al.* 36 h fasting of young men influences adipose tissue DNA methylation of *LEP* and *ADIPOQ* in a birth weight-dependent manner. *Clinical Epigenetics.* 2017;9(40):1-12.
50. Neyazi A, Buchholz V, Burkert A, Hillemacher T, Zwaan M, Herzog W, *et al.* Association of *LEP* Gene DNA Methylation with Diagnosis and Treatment Outcome of Anorexia Nervosa. *Frontiers in Psychiatry.* 2019; 10:1-11.
51. Hillemacher T, *et al.* DNA methylation of the *LEP* gene is associated with craving during alcohol withdrawal. *Psychoneuroendocrinology.* 2015; 51:371-7.

52. Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature*. 2000;404:661–671.
53. Marchi M, Lisi S, Curcio M, *et al.* Human leptin tissue distribution, but not weight loss-dependent change in expression, is associated with methylation of its promoter. *Epigenetics* 2011;6:1198–1206.
54. Zwamborn RAJ, Slieker RC, Mulder PC, *et al.* Prolonged high-fat diet induces gradual and fat depot-specific DNA methylation changes in adult mice. *Sci Rep* 2017;7:43261.
55. Shen W, Wang C, Xia L, *et al.* Epigenetic modification of the leptin promoter in diet-induced obese mice and the effects of N-3 polyunsaturated fatty acids. *SciRep* 2014;4:5282.
56. Lesseur C, Armstrong DA, Paquette AG, Koestler DC, Padbury JF, Marsit CJ. Tissue-specific *LEP* promoter DNA methylation is associated with maternal and infant perinatal factors. *Mol Cell Endocrinol.* 2013;381(1–2):160–7.
57. Tobi EW, Lumey LH, Talens RP, Kremer D, Putter H, Stein AD, *et al.* DNA methylation differences after exposure to prenatal famine are common and timing- and sex-specific. *Hum Mol Genet.* 2009;18(21):4046–53.
58. Khalyfa A, Carreras A, Hakim F, Cunningham JM, Wang Y, Gozal D. Effects of late gestational high-fat diet on body weight, metabolic regulation and adipokine expression in offspring. *Int J Obes.* 2013;37(11):1481–9.
59. Fulton S, Woodside B, Shizgal P. Modulation of brain reward circuitry by leptin. *Science.* 2000 Jan 7;287(5450):125-8.
60. Gangisetty O, Sinha R, Sarkar DK. Hypermethylation of Proopiomelanocortin and Period 2 Genes in Blood Are Associated with Greater Subjective and Behavioral Motivation for Alcohol in Humans. *Alcohol Clin Exp Res.* 2019;43(2):212-220.

61. Dorfman MD, Krull JE, Scarlett JM, Guyenet SJ, Sajan MP, Damian V. *et al.* Deletion of Protein Kinase C δ in *POMC* Neurons Predisposes to Diet-Induced Obesity. *Diabetes*. 2017 Apr; 66(4): 920–934.
62. Marco A, Kisliouk T, Tabachnik T, Weller A, Meiri N. DNA CpG methylation (5-methylcytosine) and its derivative (5-hydroxymethylcytosine) alter histone posttranslational modifications at the *POMC* promoter, affecting the impact of perinatal diet on leanness and obesity of the offspring. *Diabetes*, 2016;65(8):2258–2267
63. Silva JP, Lambert G, Booven DV, Wahlestedt C. Epigenomic and metabolic responses of hypothalamic *POMC* neurons to gestational nicotine exposure in adult offspring. *Genome Medicine*, 2016;8(1):93, 2016.
64. Patton MQ. *How to use Qualitative Methods in Program Evaluation*. Newbury Park: Sage Publications; 1987.
65. Lok KYW, Chung WY, Benzie IFF, Woo J. Colour additives in snack foods consumed by primary school children in Hong Kong. *Journal Food Additives & Contaminants*. 2010; 3:148-155.
66. Staudacher HM, Irving PM, Lomer MCE, Whelan K. The challenges of control groups, placebos and blinding in clinical trials of dietary interventions. *Proceedings of the Nutrition Society*, 2017;76:203–212.
67. Monastero R, *et al.* Methylation patterns of *Vegfb* promoter are associated with gene and protein expression levels: the effects of dietary fatty acids. *Eur J Nutr*. 2017;56(2):715-726.
68. Li W, *et al.* Folic acid supplementation alters the DNA methylation profile and improves insulin resistance in high-fat-diet-fed mice. *J Nutr Biochem*. 2018;59:76-83.

ARTIGO 2

Níveis de metilação dos genes *LEP* e *POMC* após intervenção com folato dietético e óleo de avelã no perfil lipídico de mulheres com excesso de peso

TITULO DA REVISTA: Nutrition and Metabolism

ÁREA: Nutrição

QUALIS: A2

ISSN: 1743-7075

FATOR DE IMPACTO: 3.455

Methylation levels of *LEP* and *POMC* genes after intervention with dietary folate and hazelnut oil in the lipid profile of overweight women

ABSTRACT

Background

Obesity contributes to several cardiometabolic diseases, such as dyslipidemia, as a result of an unhealthy lifestyle and genetic factors. The methylation profile of genes involved in appetite control and metabolism, such as *LEP* (leptin) and *POMC* (proopiomelanocortin) and altered lipid levels can contribute to obesity, and these epigenetic changes have been associated with the effects of diet composition. The objective of this study was to evaluate the methylation levels of *LEP* and *POMC* genes and lipid profile values after intervention with dietary folate and hazelnut oil in overweight women.

Methods

Double-blind, placebo, controlled intervention study with 40 overweight adult women. Participants were randomized into four groups for 8 weeks: G1, 300 g of vegetables and 191 μg / day of folate and hazelnut oil; G2, 300 g of vegetables and 191 μg / day of folate and placebo; G3, 300 g of vegetables and 94 μg / day of folate and hazelnut oil; G4, the individuals were only accompanied. In addition to the levels of methylation, food consumption, anthropometric measurements, biochemical variables of lipid profile were evaluated.

Results

After the intervention, the participants presented reduction in the methylation levels of the studied genes in the three intervention groups in the *LEP* gene: G1 ($p=0.00$), G2 ($p=0.00$) and G3 ($p=0.00$); in the *POMC* gene: G1 ($p=0.01$), G2 ($p=0.02$) and G3 ($p=0.01$), and in the lipid profile, G1 reduced the levels of LDL-c ($p=0.04$), HDL-c ($p=0.00$) and Triglycerides ($p=0.04$); in G3 there was a reduction in total cholesterol levels ($p=0.00$), LDL-c ($p=0.00$) and HDL-c ($p=0.00$), and in G4 there was a reduction in total cholesterol values ($p=0.00$), LDL-c ($p=0.00$), HDL-c ($p=0.00$) and triglycerides ($p=0.00$), and also, an association in G2 between the *POMC* methylation levels with triglycerides ($p=0.00$).

Conclusion

The study provided evidence of a normocaloric intervention with dietary folate and hazelnut oil supplementation on the methylation levels of *LEP* and *POMC* genes and the role they can play in lipid metabolism.

Trial registration: ISRCTN, NCT04523532. Registered 21 August 2020, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04523532>

Keywords: Obesity. Lipids. DNA methylation. Diet.

INTRODUCTION

The prevalence of obesity is increasing globally, not only in well developed countries, but also in developing countries, it has an impact on public health worldwide and contributes to several cardio-metabolic diseases such as dyslipidemia [1].

Altered blood lipid levels contribute to the pathophysiology of complex diseases, including diabetes and cardiovascular diseases (CVDs) - two of the leading causes of morbidity and mortality in industrialized and developing countries [2-3].

Dyslipidemias are mainly the result of a harmful lifestyle: poor nutrition, sedentariness, overweight and genetic factors [4-5]. Lipid values may be affected by altered levels of gene expression. These levels, however, are also regulated by the methylation of DNA, which is one of the most studied mechanisms in the field of epigenetics and can therefore affect lipid levels [6].

DNA methylation is dynamic over time and responsive to the environment; therefore, this mechanism can also change the response to blood lipid levels [7]. Available Epigenome Wide Association Studies (EWAS) offer the possibility to identify associations between DNA methylation in new gene loci involved with serum lipid levels [8].

Several dietary fats have been associated with changes in DNA methylation, such as polyunsaturated fats (PUFAs - omega 6) and TNF- α gene [9], components in hazelnut oil and *ADRB3* gene [10], other fatty acids and *CLOCK* [11], triglycerides and genes *ABCG1*, *ABCA1*, *PHGDH*, *TOMM20* [12-15]. The association between the DNA methylation profile and the transcription of several genes involved in lipidic metabolism with blood lipid levels, was reported by RODHE *et al.* [16].

These epigenetic changes have been associated with the effects of diet composition on health and disease or the long-term effects of gene-environment interactions [17, 18]. In this sense, among the diet composition, folate is a nutrient known to participate in the process of DNA methylation and nucleotide reactions of biosynthesis. It is involved in the formation of radical S-adenosylmethionine (SAM), which serves as a methyl donor for the methylation of DNA.

There is growing evidence that the DNA methylation profile can contribute to obesity. In fact, studies on the methylation of candidate genes in animal and human models have demonstrated

methylation changes in promoters of various genes involved in obesity, appetite control and/or metabolism [19], such as *LEP* and *POMC* genes.

The *LEP*-coded leptin hormone has a direct effect on *POMC* by stimulating pro-opiomelanocortin expression in hypothalamic neurons, encoded by the *POMC* gene, and both are involved in a complex network of systemic signals and neural pathways that regulate food intake and energy balance [20, 21].

In severely obese men and women, decreased levels of *LEP* methylation have been associated with increased levels of LDL-c, suggesting that it can regulate their epigenetic profile in adipose tissue. In addition, similar associations between *LEP* and LDL-c gene DNA methylation levels were observed, suggesting a common regulatory route for DNA methylation in fat and blood [22]. Increased levels of *POMC* methylation were associated with altered serum lipids regardless of body weight in children [23].

In view of the above, the present unprecedented study proposed to evaluate the methylation levels of *LEP* and *POMC* genes with lipid profile values after intervention with dietary folate and hazelnut oil in overweight women.

METHODS

This is a double-blind, placebo-controlled intervention study. Participants in the study were recruited from the population-based study entitled "II Cycle of Diagnosis and Intervention of the most Prevalent Food, Nutritional and Transmissible Situation of the Population of the Municipality of João Pessoa / PB (II DISANDNT / JP)" [24], conducted between May 2015 and May 2016. The study was approved by the Research Ethics Committee of CCS / UFPB, under protocol number 0569/15 and also submitted and registered in the Clinical Trials, under number NCT 02846025.

From the II DISANDNT/JP [24], data were originated that subsidized and continue to subsidize the conduct of research involving the information collected. In this study, based on inclusion and exclusion criteria, several articles were prepared both at population level [25, 26] and at the level of dietary intervention and DNA methylation [9-27] or polymorphism [28, 29] in several genes, always based on eligibility to participate in the study objectives.

Inclusion criteria for the study were: adult women, aged between 20 and 59 years, overweight or obese, (body mass index (BMI) 25.0-35.0 kg / m²), with different socioeconomic levels, drug users or not (except those who interfered with folic acid metabolism in the last three months), and with preserved cognitive function. The exclusion criteria were: alcoholism, smoking, neuropsychiatric disorders, use of drugs known to interfere with folic acid metabolism (in the last 3 months), use of

multivitamin or mineral supplements, use of anorexics or anabolic substances, chronic diseases affecting the endocrine and metabolic system, pregnancy, pregnancy plans and weight loss during the study period.

After checking the eligibility criteria, 40 adult women were selected by convenience sample and were duly instructed on the study objectives according to the ethical guidelines. The women who agreed to participate in the study signed the informed consent form.

INTERVENTION PROTOCOL

Participants were instructed to maintain the weight, eating habits, and physical activity levels found during the initial evaluation [30] and were also given an individual diet plan 1 week before beginning the weight maintenance intervention. All drug treatments remained unchanged throughout the study. At the end of the study, all participants received nutritional counseling for weight loss.

To calculate energy expenditure, the DRIs (Dietary Reference Intake) formulas were used to maintain body weight. Macronutrients were distributed according to the recommendations of the American Heart Association (AHA) [31], and the calculation and analysis of nutrients present in the recommended diet were performed using the food equivalent system proposed by Costa [32]. The diet contained the following distribution of macronutrients: carbohydrates: 45-65% (recommended level of 55%), protein: 10-35% (recommended level of 15%) and total fat: 25-35% (recommended level of 30%).

Before the intervention began, the 40 participants were randomized en bloc using Stata® 13.0 software (College Station, Texas, USA) into four groups. Each group with 10 participants: group 1 (G1), in which participants received 300 g of vegetables and pulses containing an average of 191 µg / day of folate and 1 capsule of hazelnut oil (25 g); group 2 (G2), in which participants received 300 g of vegetables and pulses containing an average of 191 µg / day of folate and 1 capsule of placebo; group 3 (G3), where participants received 300 g of vegetables and legumes containing on average 94 µg / day of folate and 1 capsule of hazelnut oil (25 g); and group 4 (G4), where participants were only accompanied and maintained their regular eating habits.

The following foods containing higher concentrations of folate were used for each intervention group: lentils, soybeans, corn, peas, carrots, zucchini, lettuce, chard, beet, broccoli, cauliflower, tomato, and cucumber. The hazelnut oil capsule offered was basically composed of monounsaturated fat (68%), rich in oleic acid. Each group was composed of 10 women (as previously reported), who received vegetables and vegetables rich in folic acid daily for a total period of 8 weeks.

ANTHROPOMETRIC AND DIETETIC MEASURES

The body weight was measured in triplicate and the average of the three values was used. To evaluate the habitual food consumption of the individuals four 24 Hour Food Recalls (R24h) were applied, two before the beginning of the intervention with an interval of 15 days, having as objective the knowledge of the alimentary habits to subsidize the elaboration of the menu that was implemented and comparison of the consumption at the end of the study.

After the first week, the third R24h was applied to verify the adherence to the nutritional counseling proposed. And at the end of eight weeks the fourth R24h was applied to analyze the usual intake of calories and nutrients, in order to verify whether there was adherence to the recommendations and change in food consumption in general and folate after the intervention.

To assist in filling the R24HR, a photo album of foods with home measurements was used, this tool was based on the average food intake validated for the population of the study municipality, minimizing possible biases of this method [33, 34]. Food consumption was analyzed by Dietwin nutrition software and then the multi-source method (MSM) was used to estimate the individual's regular intake of repeated measurements over a given period; the variation in intake was not affected by the method [35].

The other anthropometric and consumption variables were described in a previous study with another gene by Lima *et al.* [10].

COLLECTION OF SAMPLES

The collection of blood at home, occurred respecting the criteria recommended for this purpose, performed at the residence of each participant before and after intervention, submitted to a fast of 12 hours, the blood collected from the brachial vein with the aid of a withers, positioned in the midline of the arm, maintained in sterile tubes of 4 mL under vacuum, with clot activator to analyze the serum and blood leukocytes, stored under conditions recommended in the literature [10], for analysis of the lipid profile and DNA methylation, respectively.

ANALYSIS OF LIPID LEVEL

The lipid profile, comprising total cholesterol, low density lipoprotein (LDL-c), high density lipoprotein (HDL-c) and triglycerides was analyzed using the serum, from the turbidimetry method

in the Labmax 240 premium automated biochemical analyzer Labtest equipment. The calculation of LDL-C values was estimated by Friedewald, Levy and Fredrickson equation [36].

ANALYSIS OF THE METHILATION LEVEL OF THE *LEP* AND *POMC* GENES

The DNA was isolated from the leukocytes using the QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) following the protocol described by the manufacturer. The genomic DNA was modified by the bisulfite conversion kit Cells-to-CpG™ (Applied Biosystems, Life Technologies, California) according to the manufacturer's instructions. PCR amplification and High-Resolution Melting (HRM) analysis was performed in the Applied Biosystems 7500 Fast System [10].

The PCR was performed in a total volume of 20µl containing: AmpliTaq® Gold 360 Buffer, 10x, 25mM Mg Chloride, Melt/Doctor™ HRM Dye (20x), 25nM from each primer with the primer sequences. For the *LEP* gene, Forward: 5' GCTGGTCCTTGCGCCATAGT3" and Reverse: 5' CGGCCCGATCACAACTTGCG3' (275 bp), ring temperature (59 °C). For the *POMC* gene, Forward: 5'ACGGCTCCTGACTTCTGCTC 3' and Reverse: 5'ACGGCTCCTGACTTCTGCTC 3' (143 bp), ring temperature (59.8 °C).

The sequence of the primers was obtained from the promoter region deposited in the Genome Browser database (<https://genome.ucsc.edu/>): *LEP*, chr7:128,241,278-128,257,629, 4 CpG sites, and *POMC*, chr2:25,160,853-25,168,903, 5 CpG sites, using the MethPrimer Software (<https://www.urogene.org/methprimer/>). The qPCR program consisted of an initial enzymatic activation at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 15s at 95°C, 60s at 60°C and a final extension at 95°C 10s, 60°C 60s, 95°C 15s and 60°C 15s.

The fusion curves were normalized by calculating the 'best fit line' between two normalizing regions before and after the main fluorescence decrease representing the fusion of the PCR product using the Applied Biosystems 7500 Fast System software v 2.0.

STATISTICAL ANALYSES

Statistical analyses were performed with R software version 3.6.2. A comparison between the four groups was made using ANOVA (Analysis of Variance) for comparing means, when the assumptions of normality, independence and homoscedasticity of errors were being respected (to test such assumptions the Shapiro-Wilk, Durbin-Watson and Bartle test, respectively). When at least one

of the assumptions was not being respected, the Kruskal-Wallis mean comparison test was used. Then the comparison was performed before and after intervention in each of the groups. Among the significant results, the t and Wilcoxon tests were used for paired samples for normal and non-normal data, respectively, to check for differences (between means) in the study variables before and after intervention in each group. As for data normality, the ShapiroWilk test was used.

To determine if there were significant relationships between the values of the methylation levels of *LEP* and *POMC* genes and the other variables of the study, the linear regression models described below were proposed:

Model 1: μ_{LEP} methylation levels gene = $\beta_0 + \beta_1 * \text{Age} + \beta_2 * \text{Total cholesterol} + \beta_3 * \text{LDL-C} + \beta_4 * \text{HDL-C} + \beta_5 * \text{Triglycerides}$.

Model 2: μ_{POMC} methylation levels gene = $\beta_0 + \beta_1 * \text{Age} + \beta_2 * \text{Total cholesterol} + \beta_3 * \text{LDL-C} + \beta_4 * \text{HDL-C} + \beta_5 * \text{Triglycerides}$.

The significance level adopted for all analyses was 5%.

RESULTS

The sample consisted of 40 overweight women with the following characteristics: age, 44 \pm 10.1 years, weight before intervention was 77.7 \pm 14.1 kg and after intervention, 74.4 \pm 14 kg ($p=0.40$), and BMI before intervention was 30.5 \pm 5.3 kg/m² and after intervention, 29.2 \pm 5.1 kg/m² ($p=0.37$) among all groups. Regarding the *LEP* gene methylation levels there was a decrease in the methylation levels ($p=0.02$), and in the lipid profile, where there was an increase in the HDL-c level ($p= 0.01$) (Table 1). In the comparison in each group, the weight loss was observed in group 2 ($p=0.00$), group 3 ($p=0.00$) and group 4 ($p=0.00$) (results not demonstrated).

Table 1. Anthropometric characterization, methylation levels and lipid profile of the sample before and after the intervention.

Variables	Before intervention		After intervention		p-value
	Mean	SD	Mean	SD	
Weight (kg)	77,7	14,1	74,4	14	0,40
Height (m)	1,59	1,1	1,59	1,1	-
BMI (kg/m ²)	30,5	5,3	29,2	5,1	0,37
<i>LEP</i> methylation (%)	47,27	14,23	40,22	13,58	0,02*
<i>POMC</i> methylation (%)	41,65	12,9	36,9	12,06	0,09

Total cholesterol (mg/dL)	201,6	46,2	194,8	48,1	0,58
HDL-c (mg/dL)	44,3	9,6	50,7	9,2	0,01*
LDL-c (mg/dL)	122,7	43,7	119,9	40,1	0,81
Triglycerides (mg/dL)	146,7	80,6	150,5	67,7	0,84

* t test

Also, in an analysis between the groups, it was found that the level of methylation for the *LEP* gene before intervention ranged from 45.7% to 49.20% and from 36.4% to 43.5% after intervention. The same was observed for the *POMC* gene in which the level of methylation before intervention varied from 38.7% to 43.6% and from 33.8% to 39.5% after intervention ($p > 0.05$), analyzed by the ANOVA test, for both genes there was no statistical difference before and after intervention between the groups ($p > 0.05$).

Regarding consumption before and after intervention, the means of the variables were compared among the four groups in this study and later only among the three intervention groups. There were statistically significant differences between folate consumption ($p > 0.00$) with larger differences in group 1 ($252.10 \pm 36.84 \mu\text{g}$) compared to the other intervention and control groups. Similarly, oleic acid ($p > 0.00$) and monounsaturated fat ($p > 0.00$) consumption in group 1 ($26.46 \pm 4.96\text{g}$, $33.35 \pm 9.28\text{g}$) showed significant differences compared to group 3 also supplemented ($33.37 \pm 8.57\text{g}$, $36.44 \pm 8.36\text{g}$), before and after the intervention, respectively, analyzed by the Kruskal-Wallis test. HDL-c levels ($p = 0.00$) in group 4 showed greater statistical differences ($57.80 \pm 7.88\text{mg/dL}$) compared to the three intervention groups (results not demonstrated), analyzed by the ANOVA test.

In an intra-group analysis, there was a decrease in methylation levels after intervention for the *LEP* and *POMC* genes in all groups, but for the *LEP* gene and the control group (G4) there was no statistical difference. Regarding the lipid profile, significant differences were found in groups G1, G3, and G4, where a decrease in cholesterol levels (G3 and G4), LDL (G1, G3, and G4), and triglycerides (G1 and G4) and an increase in HDL (G1, G3, and G4) were observed (Table 2).

Table 2. Description and comparison of the variables before and after the intervention in each group.

Group 1	Before	After	p-value
<i>LEP</i> methylation (%)	49,20 ± 14,78	43,50 ± 11,91	0,0085* ¹
<i>POMC</i> Methylation (%)	43,50 ± 11,45	39,50 ± 9,97	0,0190* ¹
Total Cholesterol (mg/dL)	189,50 ± 39,19	180,50 ± 34,84	0,0857 ¹
LDL-c (mg/dL)	121,60 ± 31,21	111,80 ± 28,58	0,0430* ¹
HDL-c (mg/dL)	38,90 ± 6,26	41,20 ± 6,30	>0,0000* ¹
Triglycerides (mg/dL)	169,10 ± 52,47	164,30 ± 47,27	0,0456* ¹
Group 2			
<i>LEP</i> methylation (%)	47,60 ± 15,17	42,30 ± 16,41	0,0034* ¹
<i>POMC</i> Methylation (%)	43,60 ± 14,29	39,30 ± 13,61	0,0190* ¹
Total Cholesterol (mg/dL)	197,30 ± 40,26	199,40 ± 52,27	0,8428 ¹
LDL-c (mg/dL)	130,00 ± 34,78	124,30 ± 38,06	0,3333 ¹
HDL-c (mg/dL)	42,90 ± 6,42	47,70 ± 9,52	0,0533 ¹
Triglycerides (mg/dL)	133,60 ± 60,05	151,90 ± 59,46	0,0857 ²
Group 3			
<i>LEP</i> methylation (%)	46,60 ± 12,58	39,60 ± 12,46	0,0056* ¹
<i>POMC</i> Methylation (%)	40,80 ± 13,70	36,40 ± 13,38	0,0109* ¹
Total Cholesterol (mg/dL)	191,90 ± 65,40	181,40 ± 60,95	0,0012* ¹
LDL-c (mg/dL)	122,90 ± 59,16	108,20 ± 56,91	0,0000* ²
HDL-c (mg/dL)	40,60 ± 11,13	48,10 ± 8,38	0,0058* ²
Triglycerides (mg/dL)	160,00 ± 80,52	141,00 ± 58,73	0,0676 ¹
Group 4			
<i>LEP</i> methylation (%)	45,70 ± 14,97	36,40 ± 14,31	0,0762 ¹
<i>POMC</i> Methylation	38,70 ± 13,43	33,80 ± 12,19	0,0176* ¹
(%)Total Cholesterol (mg/dL)	191,90 ± 35,66	181,40 ± 60,95	0,0049* ¹
LDL-c (mg/dL)	146,00 ± 29,03	113,80 ± 25,64	0,0017* ¹

HDL-c (mg/dL)	49,60 ± 9,43	57,80 ± 7,88	0,0004* ¹
Triglycerides (mg/dL)	168,50 ± 99,88	143,20 ± 79,53	0,0091* ²

G1: 191 µg / day of folate and 1 capsule of hazelnut oil (25 g); G2: 191 µg / day of folate and 1 capsule of placebo; G3: 94 µg / day of folate and 1 capsule of hazelnut oil (25 g); G4: no intervention; 1-test t; 2-test Wilcoxon; *statistically significant.

In table 3 it was verified which variables tested previously were associated with the methylation levels of both genes studied in the 3 intervention groups. An association between *POMC* gene methylation levels with lipid profile was observed in group 2 of the intervention, when the participants had higher *POMC* methylation levels they also had higher serum triglyceride values, that is, when triglyceride increased by 1 mg/dL the methylation levels increased 0.04%.

Table 3. Multiple regression analysis of *POMC* gene methylation level and lipid profile for group 2 of the intervention study.

Model 1 (<i>POMC</i> gene) / R-squared 0.6752				
	Coefficient	95% CI	t statistic	p-value*
Age (years)	-0.88	2.4743 ± 0.6949	-1.56	0.19
Total cholesterol (mg/dL)	-0.04	-0.6725 ± 0.5745	-0.22	0.83
LDL-c (mg/dL)	-0.17	-0.7056 ± 0.3578	-0.91	0.41
HDL-c (mg/dL)	0.49	-1.8885 ± 2.8808	0.58	0.59
Triglycerides (mg/dL)	0.04	-0.0041 ± 0.8739	1.95	0.00*

*p < 0.05; Within this model, no significant relationships were observed between the *LEP* gene and lipid profile in the 3 intervention groups and for the *POMC* gene in groups 1 and 3 of the intervention.

DISCUSSION

Previously we showed that a diet with folate and hazelnut oil was able to change the DNA methylation profile and the weight of obese women [10]. From this interesting result we felt encouraged to invest in studies in this population and understand the effect of the diet with folate and hazelnut oil on the methylation profile of genes involved in lipid metabolism as well as the lipid profile in blood tissue. Thus, in the present study we show that this diet is associated with a decrease in the methylation level of *LEP* and *POMC* genes as well as with an improvement in the lipid profile.

The literature has shown that diet can in fact contribute to changes in the methylation profile of a variety of genes [9-15].

In a previous intervention study with hypocaloric diet in obese women, a decrease in the level of methylation in the *LEP* gene promoter in fat tissue was observed, as well as weight loss and improvement in the lipid profile (reduction of total cholesterol) [37]. These data and the data from

this study together show that the *LEP* gene is diet responsive in both fat and blood tissue [38], suggesting that leptin has its methylation levels reduced in metabolic disorders, in addition to being correlated with some important biochemical parameters and can serve as a marker of response to dietary intervention [39].

The hypocaloric diet used in the study of Cordero *et al.* [37], however, was not associated with an improvement in triglyceride, LDL and HDL profiles as observed in the present study, particularly in the groups that received folate and hazelnut oil (G1 and G3), in a normocaloric diet. In the group that received only folate (G2), it is observed that there was no improvement in the lipid profile, suggesting that hazelnut oil may play an important role in this process [40-42].

Still in relation to G2, curiously, the parameters methylation profile and lipid profile were not altered concomitantly, that is, although a decrease in the *LEP* methylation profile was detected, no improvement in the lipid profile was observed, showing once again that the *LEP* gene is diet responsive and perhaps the lack of hazelnut oil in this group did not impact the lipid profile.

Regarding the *POMC* gene, the results were similar to those found for *LEP*, i.e., a decrease in methylation levels was detected in the groups with intervention with folate and hazelnut oil (G1 and G3) and only with folate (G2), also showing that the *POMC* gene is diet responsive. For our knowledge, there are no studies in the literature evaluating the effect of diet on the methylation profile in the *POMC* gene in obese women population. However, a study conducted on a population of men and women with normal weight, who underwent diet intervention with excess saturated and unsaturated fat showed that these people had increased weight as well as increased *POMC* promoter methylation level in fat tissue, but there was no change in triglyceride levels [43].

Interestingly, the non-intervention group (G4) also showed a decrease in the *POMC* methylation profile as well as an improvement in the lipid profile. These data can be justified by the conduct of the study and data collection at home involving nutritionists, as seen in the literature [44-46], although participants have committed themselves to maintaining dietary habits, the data suggest that there were changes in food consumption.

Association between methylation profile and lipid level was shown in a study conducted with severely obese people, in which it was observed that increased levels of methylation at different CpG sites in the region promoting *LEP* in blood tissue and subcutaneous fat tissue was correlated with increased levels of LDL-c [22]. In vitro studies have shown that the incubation of endothelial cells with LDL increases the levels of DNA methylation by oxidized LDL into specific gene loci by inducing expression and activity of methyltransferase 1 DNA [47, 48], suggesting that LDL-c can modulate the DNA methylation profile.

On the other hand, a study showed that leptin (encoded by *LEP*) can regulate the metabolism of cholesterol ester (EC) through the activation of Hormon-Sensitive Lipase (HSL) in macrophages, an enzyme that performs the degradation of EC, thus protecting against atherosclerosis [49]. Thus, the origin of this association is still inconclusive, or even can be interdependent.

In an attempt to detect the association of the methylation profile with the lipid profile in the present study, a logistic regression was performed (Table 3), from which it was detected that the increase in the methylation level in *POMC* is related to the increase in triglycerides in the group that received only folate (G2). Similar results were reported between the higher level of *POMC* methylation (no exon 3) and significantly higher fasting triglycerides in children aged 7-9 years [50].

Our data show that although *POMC* has been diet responsive as observed by the decreased level of methylation (Table 2), the lack of hazelnut oil suggests that this supplement may play an important role in the modulation process of triglyceride level as well as in the DNA methylation profile of the *POMC* gene. It should be noted that G2 was the only group in which there was no improvement in the profile of any lipid studied.

Most scholars have reported associations between *POMC* gene variants and obesity phenotypes related to metabolic syndrome. However, recent studies do not make completely clear the mechanisms by which *POMC* methylation and lipid profile changes occur [23, 50, 51] and the role of dietary fat intake in DNA methylation profile changes [52-54].

It is known that the decrease in the level of methylation in the promoter is associated with increased expression of *LEP* [55] and *POMC* [56]. As verified from the genome sequences deposited in the Genome Browser, it is necessary to mention that the proximal promoter region of both *LEP* and *POMC* present a CpG island suggesting that DNA methylation can be a regulating factor of gene expression. In this sense, the decrease of the methylation levels found in the present study may be related to the increase of the expression levels and its measurement could help in the understanding of the relationship between the methylation levels, transcript level and lipid profile.

Nutrition is in fact a modifying factor of epigenetic marks and little is known about the biochemical mechanisms involved in these processes. It is believed that the main ways in which methylation can be altered by nutrition are: alteration of the substrate and co-factors that are necessary for the methylation reactions and alteration of the activity of enzymes that regulate the processes of methylation and demethylation of DNA [57].

Diet-gene interactions remain important determinants for lifelong health [58]. Our data show that both *LEP* and *POMC* are diet responsive with folate and hazelnut oil or folate alone and in addition it is suggested that intervention with both can enhance the improvement of the lipid profile.

As limitations of the study, we cite the lack of expression analysis as well as dosage of co-factor levels for methylation, which could help to elucidate the relationship between processes.

CONCLUSION

This randomized, double-blind, placebo and controlled trial is the first to provide additional evidence of a normocaloric intervention with dietary folate and hazelnut oil supplementation on the levels of methylation in *LEP* and *POMC* genes and the role they can play in lipid metabolism. It has been observed in the literature that lipids induce changes in DNA methylation and changes in this process may impact genes and metabolism, this study highlighted the genes studied as important for the obesity and with a possible role in comorbidities such as dyslipidemia.

REFERENCES

- [1] Vekic J, *et al.* Obesity and dyslipidemia *Metabolism*. 2019; 92:71-81.
- [2] Wang YC, McPherson K, Marsh T, *et al.* Health and economic burden of the projected obesity trends in the USA and the UK. *Lancet* 2011; 378:815–825.
- [3] Stitzel NO. Human genetic insights into lipoproteins and risk of cardiometabolic disease. *Curr Opin Lipidol* 2017; 28:113–119.
- [4] Willer CJ, Schmidt EM, Sengupta S, *et al.* Discovery and refinement of loci associated with lipid levels. *Nature Genet* 2013; 45:1274–1283.
- [5] Mittelstrab K, Waldenberger M. DNA methylation in human lipid metabolism and related diseases. *Human lipid metabolism*, 2018;29(2):1-9.
- [6] Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet*. 2012;13(7):484–92.
- [7] Rakyan VK, Down TA, Balding DJ, Beck S. Epigenome-wide association studies for common human diseases. *Nat Rev Genet*. 2011;12(8):529–41.
- [8] Braun KVE, *et al.* Epigenome-wide association study (EWAS) on lipids: the Rotterdam Study. *Clinical Epigenetics*, 2017;9(15):1-12.
- [9] Hermsdorff HH, Mansego ML, Campion J, Milagro FI, Zulet MA, Martinez JA. TNFalpha promoter methylation in peripheral white blood cells: relationship with circulating TNFalpha, truncal fat and n-6 PUFA intake in young women. *Cytokine*, 2013;64:265–71.

- [10] Lima RPA, *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. 2017;9(110):1-9.
- [11] Milagro FI, Gomez-Abellan P, Campion J, Martinez JA, Ordovas JM, Garaulet M. CLOCK, PER2 and BMAL1 DNAmethylation: association with obesity and metabolic syndrome characteristics and monounsaturated fat intake. *Chronobiol Int* 2012;29:1180–94.
- [12] Guay S-P, Brisson D, Lamarche B, Gaudet D, Bouchard L. Epipolymorphisms within lipoprotein genes contribute independently to plasma lipid levels in familial hypercholesterolemia. *Epigenetics*. 2014;9(5):718–29.
- [13] Pfeiffer L, Wahl S, Pilling LC, Reischl E, Sandling JK, Kunze S, *et al.* DNA methylation of lipid-related genes affects blood lipid levels. *Circ Cardiovasc Genet* 2015;8:334–42.
- [14] De Toro-Martin J, Guenard F, Tchernof A, Deshaies Y, Perusse L, Hould FS, *et al.* Methylation quantitative trait loci within the TOMM20 gene are associated with metabolic syndrome-related lipid alterations in severely obese subjects. *Diabetol Metab Syndr* 2016;8:1–10.
- [15] Truong V, Huang S, Dennis J, Lemire M, Zwingerman N, Aissi D, *et al.* Blood triglyceride levels are associated with DNA methylation at the serine metabolism gene PHGDH. *Sci Rep* 2017;7:1–16.
- [16] Rohde K, *et al.* Genetics and epigenetics in obesity. *Metabolism Clinical and Experimental*, 2018; 92:37-50.
- [17] Brettfeld C, Englert S, Aumueller E, Haslberger AG. Genetic and epigenetic interactions in adaptive thermogenesis pathways in association with obesity from a Public Health Genomics perspective. *Ital J Public Health*. 2012;9:1–18.
- [18] Van Dijk S, Tellam RL, Morrison JL, Muhlhausler BS, Molloy PL. Recent developments on the role of epigenetics in obesity and metabolic disease. *Clin Epigenetics*. 2015;7:66. doi: 10.1186/s13148-015-0101-5.
- [19] Fradin D, Boelle PY, Belot MP, Lachaux F, Tost J, Besse C, Deleuze JF, Filippo G, Bougneres P. Genome-wide methylation analysis identifies specific epigenetic marks in severely obese children. *Sci Rep*. 2017;7:1–8.
- [20] Zhou Y.; Rui, L. Leptin signaling and leptin resistance. *Front. Med.* 2013, 7, 207–222.
- [21] Toda, C.; *et al.* POMC Neurons: From Birth to Death. *Annual Review of Physiology*, v. 10, n. 79, p. 209–236, 2017.
- [22] Houde AA, *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 Med Genet*. 2015; 16:29.
- [23] Candler T, Kühnenb P, Prenticea AM, Silvera M. Epigenetic regulation of POMC; implications for nutritional programming, obesity and metabolic disease. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2019; 54:1-18.

- [24] Costa MJC, Franchescinni S, Diniz SA, 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.
- [25] Oliveira Y. *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 Jun 5;16(1):152.
- [26] Lima RPA, *et al.* Obesity Is Associated with Increased Red Blood Cell Folate Despite Lower Dietary Intakes and Serum Concentrations. *Biol Res.* 2019; 52(21):1-11.
- [27] Luna RCP, *et al.* α -Tocopherol influences glycemic control and miR-9-3 DNA methylation in overweight and obese women under an energy-restricted diet: a randomized, double-blind, exploratory, controlled clinical trial. *Nutr Metab,* 2018;15:1-11.
- [28] Ribeiro, MR. *et al.* Influence of the C677T Polymorphism of the MTHFR Gene on Oxidative Stress in Women With Overweight or Obesity: Response to a Dietary Folate Intervention. *J Am Coll Nutr.* Nov-Dec 2018;37(8):677-684.
- [29] Lisboa JVC, *et al.* Food intervention with folate reduces TNF- α and interleukin levels in overweight and obese women with the MTHFR C677T polymorphism: a randomized trial. *Nutrients,* 2020;2:361.
- [30] Switzeny OJ, *et al.* Vitamin and antioxidant rich diet increases MLH1 promoter DNA methylation in DMT2 subjects. *Clinical Epigenetics,* v. 4, n. 1, p. 19, 2012
- [31] AHA (American Heart Association). *Dietary Guidelines for American.* 2010.
- [32] Costa MJCC. *Nutrição clínica: uso do sistema de equivalentes na prática dietoterápica.* 2nd ed. João Pessoa: Editora da UFPB; 2013.
- [33] Ascitti LSR. *Manual de porções média em tamanho real baseado no programa dietsys para estudo de base populacional.* João Pessoa: Editora da UFPB; 2005.
- [34] Lima FE, Latorre Mdo R, Costa MJ, Fisberg RM. Diet and cancer in Northeast Brazil: evaluation of eating habits and food group consumption in relation to breast cancer. *Cad Saude Publica.* 2008;24(4):820–8.
- [35] MSM. The Multiple Source Method. Department of Epidemiology of the German Institute of Human Nutrition Potsdam. <https://msm.dife.de/tps/msm/>. Accessed 17 Nov 2018.
- [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] Cordero P, *et al.* Leptin and TNF-alpha promoter methylation levels measured by MSP could predict the response to a low-calorie diet. *J Physiol Biochem.* 2011 Sep;67(3):463-70.
- [38] El Sayed S, Khairy E, Basheer AR, Zaki WS, Ahmad GF, Kassim SK. Evaluation of leptin and MMP2 genes methylation in childhood obesity. *Gene Rep.* 2018, 11, 79–86.

- [39] Wróblewski A, *et al.* Molecular Insight into the Interaction between Epigenetics and Leptin in Metabolic Disorders. *Nutrients* 2019, 11, 1872;1:23.
- [40] Yücesan FB, *et al.* “Hazelnut consumption decreases the susceptibility of LDL to oxidation, plasma oxidized LDL level and increases the ratio of large/small LDL in normolipidemic healthy subjects”. *Anadolu Kardiyoloji Dergisi: AKD*, 2010; 10(1): 28-35.
- [41] Perna S, *et al.* “Effects of Hazelnut Consumption on Blood Lipids and Body Weight: A Systematic Review and Bayesian Meta-Analysis”. *Nutrients*, 2016; 8(12): E747.
- [42] Michels AJ, *et al.* Daily Consumption of Oregon Hazelnuts Affects α -Tocopherol Status in Healthy Older Adults: A Pre-Post Intervention Study. *J Nutr.*, 2018; 1;148(12):1924-1930.
- [43] Perfilyev A, Dahlman I, Gillberg L, *et al.* Impact of polyunsaturated and saturated fat overfeeding on the DNAmethylation pattern in human adipose tissue: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2017;105(4):991e1000.
- [44] Patton MQ. *How to use Qualitative Methods in Program Evaluation.* Newbury Park: Sage Publications; 1987.
- [45] Lok KYW, Chung WY, Benzie IFF, Woo J. Colour additives in snack foods consumed by primary school children in Hong Kong. *Journal Food Additives & Contaminants.* 2010; 3:148-155.
- [46] Staudacher HM, Irving PM, Lomer MCE, Whelan K. The challenges of control groups, placebos and blinding in clinical trials of dietary interventions. *Proceedings of the Nutrition Society*, 2017;76:203–212.
- [47] Kumar A, Kumar S, Vikram A, Hoffman TA, Naqvi A, Lewarchik CM, *et al.* Epigenetic regulation mediated by histone methylation and DNA of the endothelial Kruppel factor 2 by low density lipoprotein cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013; 33 (8): 1936–42.
- [48] Yang TC, Chen YJ, Chang SF, Chen CH, Chang PY, Lu SC. Malondialdehyde mediates coronary toxicity induced by oxidized LDL via the Akt-FGF2 pathway via DNA methylation. *J Biomed Sci.* 2014; 21: 11. doi: 10.1186 / 1423-0127-21-11.
- [49] Rourke LO, Yeaman SJ, Shepherd PR. Insulin and leptin acutely regulate cholesterol ester metabolism in macrophages by novel signaling pathways. *Diabetes.* 2001;50(5):955-61.
- [50] Yoo, J.Y., Lee, S., Lee, H.A., Park, H., Park, Y.J., Ha, E.H., *et al.*, Can proopiomelanocortin methylation be used as an early predictor of metabolic syndrome? *Diabetes Care*, 2014; 37 (3), 734–739.
- [51] Kwon EJ, *et al.* Association between the DNA methylations of POMC, MC4R, and HNF4A and metabolic profiles in the blood of children aged 7–9 years. *BMC Ped*, 2018;18(121)1-8.
- [52] Tremblay BL, Guenard F, Rudkowska I, Lemieux S, Couture P, Vohl MC. Epigenetic changes in blood leukocytes following na omega-3 fatty acid supplementation. *Clin Epigenetics.* 2017;9:43.
- [53] He Z, *et al.* Role of genetic and environmental factors in DNA methylation of lipid metabolism. *Genes & Diseases.* 2018;5:9-15.

[54] Stanković A. Global DNA Methylation as a Potential Underlying Mechanism of Congenital Disease Development, DNA Methylation Mechanism, Metin Budak and Mustafa Yıldız, United Kingdom: IntechOpen; 2020.

[55] Hogg K, Robinson WP, Beristain AG. Activation of endocrine-related gene expression in placental choriocarcinoma cell lines following DNA methylation knock-down. *Mol Hum Reprod.*, 2014;20(7):677-89.

[56] Kuhnen P, Handke D, Waterland RA, Wiegand S, Gruters A, Krude H. Interindividual Variation in DNA Methylation at a Putative POMC Metastable Epiallele Is Associated with Obesity. *Frontiers in Psychiatry.* 2016; 24:502-509.

[57] Kadayifci FZ, Zheng S, Pan, YX. Molecular Mechanisms Underlying the Link between Diet and DNA Methylation. *Int J Mol Sci.* 2018;19(12):4055.

[58] Kelly KB, *et al.* Excess Folic Acid Increases Lipid Storage, Weight Gain, and Adipose Tissue Inflammation in High Fat Diet-Fed Rats. *Nutrients* 2016, 8, 594;1:13.

Ethics approval and consent to participate

The study was approved by the Research Ethics Committee of CCS / UFPB, under protocol number 0569/15 and also submitted and registered in the Clinical Trials, under number NCT 02846025.

Consent for publication

The women who agreed to participate in the study signed the informed consent form.

Funding

This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Availability of data and materials

The data generated in this study are coordinated Dr. Maria José de Carvalho Costa

Interest conflicts

The authors declare that they have no competing interest

Authors' contributions

T.R.C; R.P.A.L; R.C.P.L; F.E.L.L.F; M.C.R.G; A.T.C.A; R.M.M and A.S.S; were

responsible for designing the study protocol, writing the paper; T.R.C; R.P.A.L and M.J.C.C were responsible for conducting the study; N.F.P.O; C.W.P; D.H.N; R.T.L and M.J.C.C were responsible for analyzing data and interpreting results. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We thank everyone who contributed to the article and the project coordinator Professor doctor Maria José de Carvalho Costa.