



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

IVANA ALECE ARANTES MORENO

**ANÁLISE DA MEMÓRIA EPISÓDICA E SUA RELAÇÃO COM A
METILAÇÃO DO GENE *NR3C1* EM ADULTOS BRASILEIROS:
ASSOCIAÇÃO COM VARIÁVEIS SOCIODEMOGRÁFICAS E DE
ESTILO DE VIDA**

VITÓRIA, ES

2020

IVANA ALECE ARANTES MORENO

**ANÁLISE DA MEMÓRIA EPISÓDICA E SUA RELAÇÃO COM A
METILAÇÃO DO GENE *NR3C1* EM ADULTOS BRASILEIROS:
ASSOCIAÇÃO COM VARIÁVEIS SOCIODEMOGRÁFICAS E DE
ESTILO DE VIDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Madeira Alvares da Silva.

Coorientadora: Profa. Dra. Daniela Rodrigues de Oliveira.

VITÓRIA, ES

2020

(FOLHA DE ROSTO VERSO)

Ficha catalográfica

IVANA ALECE ARANTES MORENO

**ANÁLISE DA MEMÓRIA EPISÓDICA E SUA RELAÇÃO COM A
METILAÇÃO DO GENE *NR3C1* EM ADULTOS BRASILEIROS:
ASSOCIAÇÃO COM VARIÁVEIS SOCIODEMOGRÁFICAS E DE
ESTILO DE VIDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 06 de março de 2020.

**Profa. Dra. Adriana Madeira Alvares
da Silva**

Universidade Federal do Espírito
Santo
Orientadora

**Profa. Dra. Daniela Rodrigues de
Oliveira**

Universidade Federal de São Paulo
Coorientadora

Profa. Dra. Flávia Vitorino Freitas

Universidade Federal do Espírito
Santo
Membro Interno da banca

**Dra. Lidia Maria Rebolho Batista
Arantes**

University of Pittsburgh
Membro externo da banca

VITÓRIA, ES

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**REGISTRO DE JULGAMENTO DA DISSERTAÇÃO DO CANDIDATO
AO GRAU DE MESTRE PELO PPG BIOTECNOLOGIA.**

A Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado intitulada “ANÁLISE DA MEMÓRIA EPISÓDICA E SUA RELAÇÃO COM A METILAÇÃO DO GENE NR3C1 EM ADULTOS BRASILEIROS: ASSOCIAÇÃO COM VARIÁVEIS SOCIODEMOGRÁFICAS E DE ESTILO DE VIDA” elaborada por **IVANA ALECE ARANTES MORENO**, candidata ao Grau de Mestre em Biotecnologia, recomendou, após apresentação da Dissertação, realizada no dia 06 de março de 2020, que a mesma seja (assinale um dos itens abaixo):

Aprovada

Reprovada

Os membros da Comissão deverão indicar a natureza de sua decisão através de sua assinatura na coluna apropriada que segue:

Aprovada

Reprovada



AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a toda minha família pela força e motivação, em especial aos meus pais, Delaine e Bruno, que são referências em coragem e dignidade.

Ao meu esposo Arthur que sempre esteve ao meu lado e me deu forças até nos momentos mais difíceis de forma carinhosa e especial. Eu te amo!

À Dra. Adriana Madeira, uma grande orientadora. Agradeço pela oportunidade, pela confiança e pelos ensinamentos.

À minha coorientadora Dra. Daniela Oliveira, muita gratidão, pelos ensinamentos e o seu esforço e dedicação para me ajudar na elaboração deste trabalho.

Aos membros e ex-membros do núcleo de pesquisa em saúde e do laboratório de Biotecnologia que eu tive a oportunidade de conhecer: Anderson, Mayara, Flávia, Wagner, Amanda, Júlia, Bruna, Bárbara, Erika, Juliana, Tamires, Bruno, Arícia, Paola e Ester, pela troca de experiências, convivência e acolhimento. Em especial aos meus grandes amigos, Aline, Joaquim e Suzanny, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e incentivando. Eterna gratidão!

Aos meus amigos Maria Alice, Joana, Dalliane e Sheila pelo companheirismo e por ter me ajudado durante os períodos que fiquei em Vitória.

A todos participantes da pesquisa do PPSUS pela colaboração.

Ao Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular do Hospital do Câncer de Barretos, pela disponibilização do equipamento para o pirosequenciamento, em especial para as colaboradoras Lidia e Bruna, pelo empenho durante as análises.

À banca julgadora pela paciência e empenho.

À CAPES, FAPES e CNPq pela concessão de bolsa de estudos e apoio financeiro para esta pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela formação profissional, e em especial para a secretária Miriam, pela paciência e dedicação.

E todas as pessoas que me apoiaram e que estiveram ao meu lado e especialmente aqueles que contribuíram direta e indiretamente para esta pesquisa. Meus sinceros agradecimentos.

EPÍGRAFE

"Que os nossos cansaços não vençam as nossas metas."

Wanderly Frota

RESUMO

MORENO, I.A.A. **Análise da memória episódica e sua relação com a metilação do gene *NR3C1* em adultos brasileiros: associação com variáveis sociodemográficas e de estilo de vida.** 2020. 58f. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho cognitivo e sua relação com as variáveis socioeconômicas, estilo de vida, sintomas depressivos, insegurança alimentar e nutricional e os níveis de metilação do DNA na região promotora do gene *NR3C1* no sangue periférico de adultos usuários do Sistema Público de Saúde (SUS) no município de Alegre. O desempenho cognitivo foi avaliado pelo Teste de Aprendizagem Verbal Auditiva de Rey (RAVLT) em 70 voluntários saudáveis com idade entre 20 a 59 anos. Além disso, foi investigado a relação entre as variáveis sociodemográficas e de estilo de vida. Os voluntários foram recrutados através da Secretaria Municipal de Saúde da Cidade de Alegre, no sul do Estado de Espírito Santo, Brasil. A região 1F no gene *NR3C1* (CpG 40-47) foi analisada por pirosequenciamento usando DNA derivado de sangue periférico. Nossos principais achados foram as diferenças significativas entre o desempenho cognitivo, mais precisamente na capacidade de evocação imediata, em relação ao estado civil e a escolaridade e na capacidade de aprendizagem em relação a prática de atividade de lazer e insegurança alimentar e nutricional. Os resultados encontrados neste estudo mostram a relação das variáveis sociodemográficas e do estilo de vida na cognição. Os dados coletados nesse estudo contribuirão com a discussão e implementação de políticas públicas para a promoção da atenção à saúde destinada a população brasileira.

Palavras-chave: Cognição, RAVLT, *NR3C1*, memória, memória episódica, aprendizagem, INSAN

ABSTRACT

MORENO, I.A.A. **Episodic memory analysis and relationship with *NR3C1* gene methylation in Brazilian adults: association with sociodemographic variables and lifestyle**. 2020. 58f. Dissertation – Posgraduation Biotechnological Programme, UFES, Espírito Santo. Brazil.

The aim of this study was to assess cognitive impairment and analyze its relationship with socioeconomic variables, lifestyle, depressive symptoms, food and nutritional security and DNA methylation levels in the *NR3C1* promoter region in the peripheral blood of adult users of the Public Health System (SUS) in the municipality of Alegre. Cognitive performance was assessed by the Rey Auditory-Verbal Learning Test (RAVLT) in 70 students aged 20 to 59 years. In addition, a relationship between sociodemographic variables and lifestyle was investigated. The volunteers were recruited by the Municipal Health Secretariat of the City of Alegre, in the state of Espírito Santo, Brazil. The 1F region of the *NR3C1* gene (CpG 40-47) was analyzed by pyrosequencing using DNA derived from peripheral blood. Our main findings were the differences between cognitive performance, more precisely in the ability to evoke immediately, in relation to marital status and education and learning capacity in relation to the practice of leisure activity and food and nutritional security. The results found in this study show a relationship between sociodemographic variables and lifestyle in cognition. The data collected in this study contribute to the discussion and implementation of public policies to promote health care for the Brazilian population.

Keywords: Cognition, RAVLT, *NR3C1*, memory, episodic memory, learning, INSAN

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Níveis medianos de desempenho cognitivo, segundo estado civil, escolaridade e práticas de atividade de lazer..... | 37 |
|--|----|

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. <i>Primers</i> , condições de PCR e sequências analisadas para o pirosequenciamento. | 25 |
| Tabela 2. Caracterização sociodemográfica dos participantes. | 28 |
| Tabela 3. Caracterização do estilo de vida dos participantes. | 29 |
| Tabela 4. Resultados do RAVLT de acordo com a faixa etária da normativa brasileira. | 31 |
| Tabela 5. A comparação dos resultados do RAVLT em homens e mulheres. | 32 |
| Tabela 6. Perfil de metilação da região 1F do gene NR3C1 dos participantes do estudo. | 33 |
| Tabela 7. Correlação de Spearman entre as variáveis do RAVLT e metilação de CpGs da região 1F do gene NR3C1. | 34 |
| Tabela 8. Correlação de Spearman entre o desempenho cognitivo (variáveis do RAVLT) e os escores de BDI-II, escores de EBIA, IMC, circunferência da cintura e os níveis de cortisol sérico. | 35 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SUS – Sistema Único de Saúde

DNA - Ácido Desoxirribonucleico (em inglês, *Deoxyribonucleic Acid*)

RAVLT – Teste de Aprendizagem Verbal Auditiva de Rey (em inglês, *Rey Auditory-Verbal Learning Test*)

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

EBIA – Escala Brasileira de Insegurança Alimentar

IMC – Índice de Massa Corporal

HPA – Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

GC – Glicocorticoides (cortisol)

GR – Receptor de Glicocorticoide

UBS – Unidade Básica de Saúde

PAC - Programa de Agente Comunitários de Saúde

BDI-II – Inventário de Depressão de Beck - II (em inglês, *Beck Depression Inventory - II*)

INSAN – Insegurança Alimentar e Nutricional

SUMÁRIO

| | |
|--|--------------------------------------|
| 1. INTRODUÇÃO | 13 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 14 |
| 2.1 Memória | 14 |
| 2.2 Epigenética e <i>NR3C1</i> | 16 |
| 3. OBJETIVOS..... | 19 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL | 19 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 19 |
| 4. METODOLOGIA | 20 |
| 4.1 Comitê de Ética..... | Erro! Indicador não definido. |
| 4.2 Desenho do estudo | 20 |
| 4.3 Seleção dos participantes | Erro! Indicador não definido. |
| 4.4 Coleta dos dados | 20 |
| 4.5 Avaliação Antropométrica | 23 |
| 4.6 Coleta do material biológico, determinação do cortisol sérico e extração do sangue periférico..... | 23 |
| 4.7 Sequência Analisada do <i>NR3C1</i> | 23 |
| 4.8 Conversão de Bissulfito..... | 24 |
| 4.9 PCR e Pirosequenciamento | 24 |
| 4.10 Análise Estatística | 25 |
| 5. RESULTADOS | 27 |
| 6. DISCUSSÃO | 37 |
| 7. CONCLUSÃO | 44 |
| 8. REFERÊNCIAS | 45 |
| 9. APÊNDICE 1..... | 52 |
| 10. APÊNDICE 2..... | 53 |

1. INTRODUÇÃO

A memória é uma das funções cognitivas mais fascinantes e sua formação ocorre em etapas, a saber: aquisição, consolidação e evocação. Ainda, a memória pode ser classificada de acordo com sua função, tempo ou conteúdo das informações que serão retidas. Neste estudo, foi avaliada a memória episódica, uma vez que, está é sujeita a modulação por diversos agentes ambientais, como por exemplo eventos estressantes.

Os processos epigenéticos têm sido associados ao processo de formação da memória. Entretanto, dados sobre metilação dos genes *NR3C1* relacionados com o desempenho cognitivo da memória episódica na população adulta são escassos. Os mecanismos epigenéticos subjacentes à desregulação do eixo HPA e suas possíveis relações com a cognição, permanecem obscuros.

Diante disto, o estudo dos mecanismos de regulação epigenética auxiliam na compreensão da relação dos processos epigenéticos no cérebro humano e permite a compreensão como as alterações epigenéticas alteram as funções neuronais para permitir a formação e a manutenção da memória.

Os resultados encontrados nesse estudo são de suma relevância já que, até onde temos conhecimento, não existem dados na literatura sobre a associação entre alterações epigenéticas em *NR3C1* e desempenho cognitivo de memória episódica.

Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo investigar a relação entre o desempenho cognitivo as possíveis alterações epigenéticas no gene *NR3C1* e verificar os quais são os fatores que podem estar associados com a cognição.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Memória

A memória é uma das funções cognitivas mais fascinantes e a capacidade de formar memória permite aos indivíduos adaptarem-se a constantes mudanças do ambiente em que habitam e planejar ações futuras. Assim, a formação de memória ocorre em etapas. A primeira etapa é conhecida como **aquisição** de novas informações sobre o ambiente, as quais são codificadas pelo organismo, como resultado de eventos biofísicos, bioquímicos, epigenéticos e comportamentais. Esta etapa também é denominada de aprendizagem (EICHENBAUM, 2017; EKSTROM; RANGANATH, 2018; ZEIDMAN; MAGUIRE, 2016).

Após à aquisição da memória, ocorre a segunda etapa que consiste no **armazenamento** ou **retenção** da informação adquirida. Esta etapa pode durar milissegundos, minutos, horas ou anos. O armazenamento da informação por um longo período caracteriza a **consolidação**. O processo de armazenamento possibilita que, no futuro, a memória formada seja acessada, isto é, evocada. Nesta última etapa da formação de memória, **evocação**, a informação armazenada pode ser requisitada para uso na cognição, na emoção e/ou na expressão de um comportamento (EICHENBAUM, 2017; EKSTROM; RANGANATH, 2018; ZEIDMAN; MAGUIRE, 2016).

A retenção da informação ou consolidação pode ser classificada de acordo com o tempo de retenção ou natureza do seu conteúdo, o que efetivamente conhecemos como memória.

Quando consideramos o tempo de retenção da informação, a memória pode ser classificada como memória de trabalho (no inglês, *work memory*), memória de curta duração (no inglês, *short-term memory* - STM) e memória de longa duração (no inglês, *long-term memory* - LTM) (MOSCOVITCH et al., 2016).

A memória de trabalho, também chamada de memória ultra-rápida, ou operacional, é breve e fugaz, gerencia a realidade mantendo a informação de alguns segundos a, no máximo, alguns minutos até que seja processada. A memória de curta-duração dura minutos ou poucas horas e permite suprir os processos mnemônicos, enquanto a memória definitiva não foi ainda construída. Já a memória de longa duração após ter sido consolidada dura horas, dias, meses ou anos e garante o registro da história do indivíduo e dos conhecimentos adquiridos, tornando

cada um de nós um indivíduo único (CHAI; ABD HAMID; ABDULLAH, 2018; MALLOY-DINIZ, Leandro F et al., 2018; SAURY; EMANUELSON, 2016).

Quanto à natureza do conteúdo, duas formas de memórias são descritas: a memória não declarativa (ou implícita) e memória declarativa (ou explícita). A primeira, denominada de não declarativa (ou implícita) corresponde àquelas memórias que não dependem do acesso consciente da informação quando evocadas, são adquiridas com treinamento e inclui habilidades motoras e sensoriais, que refletem no desempenho de como fazemos algo. Já a memória declarativa (ou explícita) caracteriza-se pela necessidade de acesso à consciência para declaração do conhecimento adquirido, são fáceis de ser formadas, mas, também são facilmente esquecidas. São agrupadas em duas grandes subcategorias: memórias de fatos e memórias de eventos, também conhecidas como semântica e episódica, respectivamente. As memórias de fatos são as memórias de informações gerais, que envolvem conceitos atemporais (conhecimentos, cultura); já as memórias de eventos, ou seja, a memória episódica requer uma referência temporal e espacial (autobiográfica) (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2002; MALLOY-DINIZ et al., 2018).

A memória episódica permite aos indivíduos reviverem conscientemente as experiências passadas, através dos traços de memória formados no tempo e no espaço (TULVING, 2002). É importante ressaltar que a memória episódica é formada pelas etapas previamente descritas no processo de formação de memória. Assim, esse tipo de memória também está sujeito a modulação, isto é, pode ser modificada pelo uso de substâncias psicoativas, sofrer influências de eventos traumáticos e emocionais e, até mesmo, da aquisição de outras informações ambientais (SEKERES; WINOCUR; MOSCOVITCH, 2018). A memória episódica pode ser avaliada pelo teste cognitivo de Aprendizagem Auditiva Verbal de Rey (RAVLT).

Estudos revelam que o estresse ambiental pode ser um dos fatores responsáveis pela vulnerabilidade interindividual observada no desempenho cognitivo da memória episódica (LUETHI; MEIER; SANDI, 2009; SHIELDS et al., 2017). Estas evidências se fundamentam-se pelo fato de o glicocorticóide (cortisol) apresentar alta afinidade aos receptores de glicocorticóides (GR) localizados no hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal, estruturas associadas a aprendizagem e memória e, também, a neurobiologia do estresse.

Corroborando com estas evidências, estudos recentes relatam que mecanismos epigenéticos estão envolvidos em todas as etapas do processo de formação de memória, e a metilação do DNA parece ter um importante papel nesse processo (DAY; SWEATT, 2010; FENG et al., 2010; HALDER et al., 2016; HEYWARD; SWEATT, 2015; MILLER et al., 2010; POON et al., 2020). Diante disto, é importante compreender o papel da metilação do DNA na manutenção da memória episódica.

2.2 Epigenética e *NR3C1*

O termo epigenética foi cunhado pela primeira vez da década de 1942 pelo embriologista e geneticista Conrad Waddington, ao qual a definiu como sendo “o ramo da biologia que estuda as interações casuais entre os genes e seus produtos que dão origem ao fenótipo”. Atualmente a definição mais aceita e utilizada de epigenética é o “estudo de mecanismos que alteram a expressão gênica, sem qualquer alteração na sequência primária do DNA, os mecanismos epigenéticos podem ser herdáveis ou não herdáveis e reversíveis” (TRONICK; HUNTER, 2016).

Os principais mecanismos epigenéticos que alteram a expressão gênica são: metilação do DNA (metilação sobre as bases de citosina do DNA, em dinucleotídeos CG, comumente referido como CpG); modificação pós-transcripcionais de histonas e remodelamento de cromatina; e mecanismos baseados no RNA (miRNA e siRNA) (MAZE et al., 2014; MORRIS, 2001; PILETIČ; KUNEJ, 2016). Embora esses mecanismos sejam apresentados separadamente, atuam em conjunto formando uma complexa rede interativa com atividades de diferentes mecanismos, contribuindo para a mesma regulação transcricional (KLENGEL; BINDER, 2015). De particular interesse para o estudo é a metilação do DNA e o seu efeito na memória.

A metilação do DNA é uma modificação que ocorre em dinucleotídeos citosina seguido por uma guanina (conhecidos como 5'-CpG-3'), mais frequentemente encontradas em “ilhas CpGs” que são regiões ricas em CpGs. Apenas a citosina é passível de metilação, onde é incorporado de forma covalentemente um grupo metil (CH₃) no carbono 5' no anel da pirimidina, catalisadas pela enzima metiltransferase de DNA (DNMT) (FEDOTOVA; ILLARIOSHKIN, 2019; VIALOU et al., 2013).

Embora as citosinas metiladas possam prevenir e promover a ligação de várias proteínas ao DNA, a metilação de CpG nas regiões promotoras geralmente promove repressão da transcrição gênica. Algumas citosinas do genoma humano são metiladas ao longo do desenvolvimento para a diferenciação celular, supressão de elementos repetitivos e inativação cromossômica do cromossomo X (BIRD, 2008). Estudos atuais têm se concentrado em evidências de que os mecanismos epigenéticos desempenham um papel fundamental em modificações fenotípicas, mediando mudanças funcionais estáveis, principalmente no cérebro, em resposta a constantes mudanças ambientais (VIALOU et al., 2013).

As constantes mudanças ambientais, que podem ser causadas por diversos eventos estressores, afetam a homeostase do sistema de estresse, o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), promovendo a sua ativação. Assim, em condições fisiológicas, os neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo secretam o Fator Liberador de Corticotrofina (CRF), levando à síntese e liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela hipófise anterior na corrente sanguínea que, por sua vez, age no córtex da glândula adrenal induzindo a produção e liberação de glicocorticoides no sangue (ARGENTIERI et al., 2017).

Os glicocorticoides, são hormônios esteroides produzidos pelas glândulas adrenais e são liberados no final da cascata de ativação do eixo HPA em resposta ao estresse, e atuam como modulador de feedback negativo do eixo (CAIN; CIDLOWSKI, 2017). Nos seres humanos, os glicocorticoides desempenham importantes papéis em ações imunossupressoras e anti-inflamatórias e são amplamente utilizados de forma sintética no tratamento de várias doenças (VANDEWALLE et al., 2018).

Os receptores dos glicocorticoides (GR) são proteínas, membros da superfamília do receptor nuclear de fatores de transcrição dependentes de ligantes (SIAMATRAS; STRATAKIS, 2016), que atuam como fator de transcrição associados aos glicocorticoides, induzindo ou reprimindo a transcrição de muitos genes (STEIGER et al., 2013; VALKO et al., 2006). Na ausência da ligação dos glicocorticoides, o GR é encontrado no citoplasma (HU et al., 2017).

O receptor do glicocorticoide (GR) humano é codificado pelo gene *NR3C1*, que está localizado no cromossomo 5, *locus* q31-q32 e contém aproximadamente de 140.000 pares de bases (STEIGER et al., 2013). O gene possui dezessete éxons, sendo nove deles (1A a 1F e 1H a 1J) não são codificantes e oito codificantes

(2 a 9) (ARGENTIERI et al., 2017; PALMA-GUDIÉL et al., 2015). Os éxons não codificantes atuam como promotores alternativos, já que não possuem as sequências TATA ou CCAAT, que fazem parte do complexo de iniciação da transcrição, porém, a região promotora do GR contém muitas regiões CpG (TURNER et al., 2006). O éxon 9 codifica as duas isoformas homólogas do receptor de GR, o GR α e o GR β , através do processo de *splicing* alternativo do RNA mensageiro (mRNA) (VANDEVYVER; DEJAGER; LIBERT, 2014).

Desta forma, os genes implicados na regulação de glicocorticoides desempenham um papel importante na regulação do impacto fisiológico do estresse social e ambiental e se tornaram um ponto focal para investigar o papel do estresse na etiologia de processos fisiológicos em diversas doenças (ARGENTIERI et al., 2017). Atualmente, estudos têm se concentrado em alterações epigenéticas na região 1F do gene *NR3C1* em associação a maus-tratos, negligência, traumas durante a infância, aumento do risco de transtorno de estresse pós-traumático e depressivos (BUSTAMANTE et al., 2016; PERROUD et al., 2011, 2014; WEAVER, 2007). Assim, os dados existentes sugerem que os padrões de metilação do DNA medidos periféricamente podem contribuir para a manutenção da memória episódica em humanos relevantes para a saúde e doença.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o desempenho cognitivo da memória episódica e investigar sua relação com os sintomas depressivos, as variáveis socioeconômicas, estilo de vida, insegurança alimentar e nutricional e os níveis de metilação do DNA na região promotora do gene *NR3C1* (região 1F) no sangue periférico de indivíduos adultos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS) brasileiro.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar os aspectos sociodemográficos e de estilo de vida dos usuários do SUS do município de Alegre-ES.
- Avaliar o desempenho cognitivo da memória episódica e aprendizagem de adultos por meio da aplicação do Teste de Aprendizagem Auditiva Verbal de Rey (RAVLT – Rey Auditory Verbal Learning Test).
- Avaliar o perfil da metilação do *NR3C1* (região 1F) no sangue periférico de adultos usuários do SUS, utilizando a metodologia de pirosequenciamento.
- Avaliar a relação entre o perfil de metilação do *NR3C1* (região 1F) e as sete variáveis do RAVLT: memória imediata, capacidade de aprendizagem, interferência proativa e retroativa, evocação imediata, evocação tardia e reconhecimento.
- Avaliar os níveis de cortisol sérico e verificar a relação com as sete variáveis do RAVLT.
- Investigar a relação entre as sete variáveis do RAVLT com variáveis de estilo de vida e a presença de sintomas depressivos.
- Investigar a relação entre as sete variáveis do RAVLT com variáveis socioeconômicas e insegurança alimentar e nutricional.

4. METODOLOGIA

4.1 Aspectos Éticos

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em Pesquisa com Seres Humanos, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Espírito Santo (CEP/CCS/UFES), sob parecer número 1.574.160, de 03/06/2016 (Apêndice 1). Todos os participantes da pesquisa assinaram um Termo de Consentimento Livre Esclarecimento (TCLE), conforme a Resolução nº 466/12, do Conselho Nacional de Saúde (CNS) (BRASIL, 2012).

4.2 Desenho do estudo e seleção dos participantes

Foi realizado um estudo transversal no período de abril a julho de 2017 com adultos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS) do município de Alegre, localizado no sul do Estado do Espírito Santo, região Sudeste do Brasil. O foco desse estudo foi avaliar o desempenho cognitivo de adultos usuários do SUS no município de Alegre e investigar sua relação com os sintomas depressivos, as variáveis socioeconômicas, estilo de vida e os níveis de metilação do DNA na região promotora do gene *NR3C1* no sangue periférico. Para isso, 70 sujeitos foram recrutados pelos Agentes Comunitários de Saúde das Unidades Básicas de Saúde (UBS) e do PACs (Programa de Agente Comunitários de Saúde).

Os 70 sujeitos da pesquisa são usuários do SUS na faixa etária de 20 a 59 anos de ambos os sexos. É importante ressaltar que esses sujeitos fazem parte do projeto de pesquisa sob número PPSUS 74713515/2016 intitulado: “Impacto do programa de capacitação de agentes SUS no estado nutricional de vitamina D e sua relação com obesidade, depressão, câncer, metilação do Receptor do Glicocorticoide e avaliação de hipovitaminose D na população da região do Caparaó Capixaba”. Foi utilizado como critério de inclusão: Homens e mulheres com idade com idade entre 20 a 59 anos; residir na área urbana do município de Alegre/ES; e ser alfabetizado. Já para os critérios de exclusão: indivíduos com esquizofrenia e indivíduos com problemas auditivos.

4.3 Coleta dos dados

4.4.1. Instrumentos de coleta

A coleta de dados foi realizada por entrevista individual, com base com base em arquivos do Cadastro Individual e Domiciliar do SUS (Ministério da Saúde, Brasil) e a aplicação de questionários.

4.4.1.1. Avaliação socioeconômica e do estilo de vida

A avaliação socioeconômica e do estilo de vida foi realizada por meio de um questionário semiestruturado dividido em dois módulos: **perfil socioeconômico** (sexo; idade; situação conjugal; escolaridade; localização da moradia; renda familiar) e **estilo de vida** (prática de atividade de lazer; prática de atividade física; consumo atual de álcool e tabagismo).

4.4.1.2. Inventário de depressão de Beck (BDI-II)

A avaliação dos sintomas depressivos foi obtida a partir da utilização do Inventário de Depressão de Beck (BDI-II), um instrumento de autorrelato de depressão validado (BECK; STEER; BROWN, 1996; GOMES-OLIVEIRA et al., 2012). O questionário contém 21 grupos de afirmação, relacionados com os sentimentos do entrevistado na última semana (referente a anterior da aplicação do teste contando também com o dia da aplicação).

4.4.1.3. Escala Brasileira de Insegurança Alimentar

A insegurança alimentar e nutricional foi avaliada utilizando a Escala Brasileira de Medida Domiciliar da Insegurança Alimentar (EBIA) (PÉREZ-ESCAMILLA; SEGALL-CORRÊA, 2008). O questionário é formado por 14 perguntas fechadas, com pontuação final resultante do somatório das respostas afirmativas. Com base neste somatório, são fornecidos dados sobre o grau relativo à insegurança alimentar, que pode estar considerada entre leve, moderada ou grave, relacionados com a situação alimentar vivida nos últimos três meses.

4.4.2. Avaliação Cognitiva

4.4.2.1. Teste de Aprendizagem Auditiva Verbal de Rey (RAVLT – *Rey Auditory Verbal Learning Test*)

O Teste de Aprendizagem Auditivo-Verbal de Rey (RAVLT) é definido como um teste cognitivo para avaliação da aprendizagem e memória verbal episódica. Foi

desenvolvido primeiramente por André Rey e publicado em 1964. O teste sofreu modificações em diversos países (REY, 1964; SALGADO et al., 2011). No Brasil, são utilizadas diferentes versões para o uso clínico (MALLOY-DINIZ, Leandro F et al., 2018)

O teste consiste em nove etapas. Primeiramente é apresentada a Lista A com 15 substantivos, que é lida pelo entrevistador em um intervalo de poucos segundos. O entrevistado irá repetir aquelas que lembrar, sem que necessariamente esteja na ordem que foi apresentada. Esta etapa acontece 5 vezes (etapa A1 a A5) consecutivas. Cada uma das etapas é seguida pelo um teste de evocação pelo entrevistado. Após é apresentada a Lista B (Lista de Interferência), com palavras diferentes da Lista A e contendo também o total de 15 substantivos. Nesse passo o entrevistado irá dizer as palavras evocadas da Lista B após ouvi-las. Na etapa A6, o entrevistado irá recordar as palavras da Lista A. Não serão reapresentadas as palavras da Lista A. Após um período de 20-30 minutos, será apresentada a etapa A7, e o entrevistado irá dizer novamente quais são as palavras da Lista A evocadas. Nesta etapa, como na anterior, as palavras da Lista A não serão reapresentadas. Na última etapa do teste, chamada de Teste de Memória para Reconhecimento, em que serão apresentadas 50 palavras para o entrevistado, sendo 15 da Lista A, 15 da Lista B e outras 20 palavras que não fazem parte de nenhuma das listas anteriores. A cada palavra lida, o entrevistado irá responder se determinada palavra pertence ou não a Lista A.

De acordo com a normativa brasileira mais recente (DE PAULA; MALLOY-DINIZ, 2019), os dados do RAVLT são expostos por percentis e as faixas de desempenho de cada variável do RAVLT foram categorizadas dicotomicamente de acordo com a interpretação clínica em: desempenho típico e possível déficit/déficit cognitivo.

De acordo com Saury (2016), o teste gera sete variáveis que estão relacionadas com quatro domínios da aprendizagem e memória, sendo estes, atividade de curto prazo, aprendizagem, interferência e recuperação. As sete variáveis são: Memória Imediata, Capacidade de Aprendizagem, Interferência Proativa, Interferência Retroativa, Evocação Imediata, Evocação Tardia e Memória de Reconhecimento. A maioria das variáveis estão relacionadas com a integridade do hipocampo e conforme esse mesmo estudo, cada variável avalia a integridade de diferentes estruturas do hipocampo.

4.4 Avaliação Antropométrica

A avaliação antropométrica foi realizada de acordo com as normas técnicas do Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional (SISVAN) no período da manhã, entre 7h e 8h, e os voluntários estavam em jejum mínimo de 8 horas. A estatura foi analisada com o uso de estadiômetro Altorexata®. O peso foi aferido em uma balança eletrônica Tanita® (modelo BC601®). O Índice de Massa Corporal (IMC) foi calculado e classificado seguindo a referência para adultos (20-59 anos), agrupando-se todos os indivíduos com baixo peso que apresentaram valores de $IMC < 18,5 \text{ kg/m}^2$ (WHO, 2000).

4.5 Coleta do material biológico, determinação do cortisol sérico e extração do sangue periférico

Foi coletado sangue periférico de cada indivíduo por profissional habilitado e o material foi separado em tubos de Vacutainer contendo EDTA ou sem anticoagulante com gel separador de soro. Os tubos foram submetidos à centrifugação à 2500 rpm por 10 min e refrigeradas entre 2°C e 8°C até o momento da extração do DNA genômico ou separação do soro para análise de cortisol sérico. A concentração de cortisol foi quantificada pelo método de quimioluminescência e os valores de referência para a dose matinal foram de 6,7 a 22,6 µg/dL (IPCHP, 2016)

A extração do DNA foi realizada a partir do método salting-out (SALAZAR et al., 1998). Para verificação da pureza e concentração do DNA, foi utilizado NANODROP® (Thermo Scientific Ltda, USA) em comprimento de onda $\lambda = 260$ e 280nm. A razão entre o comprimento de onda no valor de aproximadamente 1.8 à 2.0 confirmou a pureza do DNA.

4.6 Sequência Analisada do *NR3C1*

A sequência do *NR3C1* que foi amplificada consta de 47 sítios CpGs. Utilizou-se primers *forward* e *reverse*, que abrangeram a região gênica entre 988 e 1344 (dados de sequência submetidos ao banco de dados GenBank com o número de acesso AY436590.1 do NCBI) (PALMA-GUDIÉL et al., 2015). O fragmento continha

410 pares de bases. A região analisada abrange as CpG 40 a 47 conforme a classificação de McGowan et al (2009).

4.7 Conversão do DNA por Bissulfito de Sódio

A metilação do DNA foi analisada em sítios CpGs específicos utilizando a conversão de 1µg de DNA por bissulfito de sódio, através do kit EZ DNA Methylation™ (Zymo Research) de acordo com as instruções do fabricante. A amplificação do fragmento de interesse por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e o pirosequenciamento foram previamente descritos por Oberlander e colaboradores (2008) e Bustamante e colaboradores (2016). A incubação breve do DNA alvo com bissulfito de sódio permite a formação de duas sequências diferentes de DNA, uma metilada e a outra não metilada. Essas sequências são provenientes da conversão de resíduos de citosina não metilados em uracila, deixando as citosinas metiladas inalteradas. O método de desaminação consiste em três etapas que ocorrem sequencialmente: sulfonação, desaminação e dessulfonação.

4.8 PCR e Pirosequenciamento

A PCR foi realizada utilizando Polimerase de DNA HotStart Taq (Qiagen®) com 20ng de molde de DNA tratado com bissulfito de sódio por reação. A qualidade do produto de PCR e a falta de contaminação foram confirmadas em géis de agarose a 2% utilizando GelRed™ (Uniscience). Os produtos da PCR foram purificados e sequenciados usando o equipamento PSQ96ID Pyrosequencer (Qiagen®, Valencia, CA) com o kit de reagentes PyroMark Gold Q96 (Qiagen®, Valencia, CA) de acordo com o protocolo do fabricante. Todas as condições de pirosequenciamento estão disponíveis na Tabela 1.

Os valores médios de metilação foram calculados a partir da média das porcentagens de metilação para cada CpG avaliados no Pyromark Software. Os resultados foram analisados usando as configurações padrão do software.

Tabela 1. *Primers*, condições de PCR e sequências analisadas para o pirosequenciamento.

| Primer da PCR | | Condições da PCR | | |
|---|---|-------------------------|-----------|-------------------------|
| Forward | 5'-TTTTTTTTTTGAAGTTTTTTTA-3' | 95 °C | (14'30'') | |
| Reverse | 5'-BIOTIN-CCCCCAACTCCCCAAAAA-3' | 94 °C | (30'') | 45 ciclos (410pb) |
| | | 50 °C | (30'') | |
| | | 72 °C | (30'') | |
| | | 72 °C | (10') | |
| | | 4 °C | ∞ | |
| Sequencing primers | | | | |
| CpG 40 a 42 | 5'-AGAAAAGAAATTGGAGAAATT-3' | | | |
| CpG 43 a 47 | 5'-GTTTTAGAGAGATTAGGT-3' | | | |
| Sequências de dispensação dos nucleotídeos | | | | |
| Seq 1 | YGGTGGTTTTTTTAAAYGTYGTTTTAATCGTGTTGATCAGTCGC TTA | | | |
| Seq 2 | YGGTTTTYGYGTTGTGYGTYGTTAGTCAGTTCAGTCGTAGTCA GTCGTA | | | |

Legenda: pb: pares de bases Seq: sequência.

4.9 Análise Estatística

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para avaliar a normalidade dos dados contínuos. A caracterização da amostra foi apresentada com as frequências absolutas e relativas. As variáveis quantitativas foram apresentadas com a média e o desvio-padrão.

As faixas de desempenho do RAVLT foram categorizadas de acordo com a normativa brasileira. A normativa categoriza o comprometimento cognitivo de acordo com os percentis, que são calculados de acordo com a faixa etária correspondente na normativa. Para a apresentação dos dados e para as análises de regressão logística, as variáveis foram categorizadas dicotomicamente (desempenho típico e possível déficit cognitivo/déficit clínico) de acordo com os percentis.

A análise bivariada foi efetuada a partir de modelos de regressão Logística, tendo como variável dependente as cinco variáveis do RAVLT (Memória Imediata, Capacidade de Aprendizado, Evocação Imediata, Evocação Tardia e Memória do Reconhecimento) e como variáveis explicativas os aspectos socioeconômicos, estilo

de vida e porcentagem de metilação para o gene *NR3C1*. Para todas as análises, foi adotado o valor de significância de $p < 0,05$.

A análise de correlação de Spearman foi utilizada para verificar a correlação entre os scores do RAVLT e os níveis de metilação e o score do BDI-II.

As variáveis avaliadas nesse estudo e as categorizações estão disponíveis do Apêndice 2. Os dados foram tabulados em uma planilha do Excel 2016 e foram submetidos a análise de consistência. As análises dos dados foram realizadas com o auxílio dos softwares de análise estatística *Statistical Package for the Social Sciences-SPSS®*, versão 20.0 para Windows 10 (IBM, Munich, Germany) e *STATA®*, versão 11.0 para Windows (StataCorp® LP, College Station).

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização socioeconômica e demográfica dos indivíduos usuários do SUS

O referente estudo foi realizado com 70 indivíduos usuários do SUS, aos quais, 10 (14,3%) eram do gênero masculino com idade entre 25 e 57 anos, com média de 38,4 anos (DP=10,52). Já o gênero feminino representou 60 (85,7%), com idade entre 20 e 59 anos, com média de 44,3 anos (DP= 11,17), totalizando 70 indivíduos (Tabela 2). É importante ressaltar que todos os participantes residiam no meio urbano.

A maior parte dos indivíduos, 57,1% estavam casados ou viviam em união estável. Quanto ao número de filhos sob a responsabilidade dos voluntários da pesquisa, 18,6% não tinham filhos, a maioria tinha filhos 81,3%, e destes, 17,1% tinham um filho, 35,7% com dois filhos e 28,57% tinham mais do que dois filhos. Em relação à raça autorreferida, 57,1% se consideravam brancos, 28,6% mestiços, 12,9% pretos e 1,4% amarelo.

O valor do salário mínimo considerado no período da coleta foi de R\$937,00 (correspondendo a cada um dólar americano o valor de R\$3,23). Deste modo, a renda pessoal apresentada pelos indivíduos correspondeu de até um salário mínimo para 47,1% dos participantes, um a três salários mínimos para 27,1%, 4,5% tinham renda entre três e cinco salários mínimos, 1,4% com mais de cinco salários mínimos e 20,0% sem rendimentos.

De acordo com a classificação de Neri (2008), a renda *per capita* foi categorizada de acordo com dólares americanos. Os indivíduos classificados como baixa renda (recebiam menos do que \$5 dólares por dia) foram 31,4% e aqueles que foram classificados com renda acima que \$5 dólares por dia eram 68,6%.

Em relação ao vínculo empregatício, 50,0% tinham vínculo empregatício, 7,1% eram aposentados ou pensionistas e 34,3% não trabalhavam ou estavam desempregados (Tabela 2).

Considerando o ponto de corte para a formação acadêmica de até nove anos de estudo ou ensino fundamental, 38,6% estudaram até o ensino fundamental e

61,4% com escolaridade maior que nove anos de estudo, destes, 42,8% com ensino médio completo e 18,6% com ensino superior (Tabela 2).

Em relação a insegurança alimentar e nutricional, 40,0% se enquadravam com algum nível de insegurança alimentar e nutricional e 60,0% estavam em condições de segurança alimentar e nutricional (Tabela 2).

Tabela 2. Caracterização sociodemográfica dos participantes.

| Características | Todos os participantes |
|---|-------------------------------|
| Idade - Média (\pmDP) | 43,46 (\pm 11,20) |
| Quantidade de filhos – Média (\pmDP) | 2,00 (1,61) |
| Gênero – n (%) | |
| Masculino | 10 (14,3) |
| Feminino | 60 (85,7) |
| Status Civil- n (%) | |
| Casado ou união estável | 40 (57,1) |
| Vive sozinho | 30 (42,9) |
| Status Educacional – n (%) | |
| \geq 9 anos de estudo | 42 (60,0) |
| < 9 anos de estudo | 28 (40,0) |
| Filhos | |
| Sim | 57 (81,4) |
| Não | 13 (18,6) |
| Classificação da Renda (dólares americanos)* – n (%) | |
| <\$5,00 por dia | 22 (31,4) |
| \geq \$5,00 por dia | 48 (68,6) |
| INSAN – n (%) | |
| Sim | 28 (40,0) |
| Não | 42 (60,0) |

DP: Desvio-Padrão; INSAN: Insegurança Alimentar e Nutricional. *O valor do salário mínimo considerado foi de R\$937,00 (correspondendo a cada um dólar americano o valor de R\$3,23).

4.2. Caracterização do estilo de vida dos indivíduos usuários do SUS

Em nossa amostra, 38,6% consumiam bebidas alcoólicas e 4,3% eram tabagistas. Entre os avaliados, 68,6% não realizavam atividade de lazer, e a prática de atividade física esteve presente em 40,0% dos indivíduos.

Quanto aos dados antropométricos, foi observada uma média de IMC de 28,68 (DP= 6,15) Kg/m². Entre as mulheres, a média de IMC foi de 28,55 (DP= 6,27) Kg/m² e dos homens foi de 29,46 (DP= 5,35) Kg/m². Entre as mulheres predominou o sobrepeso e entre os homens a obesidade. A adiposidade central foi categorizada de acordo com o risco de complicações metabólicas e 20% apresentaram risco aumentado e 50% risco substancialmente aumentado. A prevalência de depressão foi de 17,9% (Tabela 3).

Tabela 3. Caracterização do estilo de vida dos participantes.

| Características | Todos os participantes |
|--|-------------------------------|
| Score BDI-II - Média (±DP) | 9,73 (±8,34) |
| IMC - Média (±DP) | 28,68 (±6,15) |
| Circunferência da cintura - Média (±DP) | 92,47 (±15,27) |
| BDI-II ≥ 18 – n (%) | |
| Sim | 12 (17,9) |
| Não | 55 (82,1) |
| Risco de complicações metabólicas – CC | |
| Baixa | 20 (29,0) |
| Aumentada | 14 (20,3) |
| Substancialmente aumentada | 35 (50,7) |
| IMC | |
| Baixo peso | 1 (1,4) |
| Eutrofia | 22 (31,4) |
| Sobrepeso | 20 (28,6) |
| Obesidade | 27 (38,6) |
| Consumo de álcool atual – n (%) | |
| Sim | 27 (38,6) |
| Não | 43 (61,4) |
| Fuma atualmente- n (%) | |
| Sim | 3 (4,3) |
| Não | 67 (95,7) |
| Pratica atividade física - n(%) | |
| Sim | 28 (40,0) |
| Não | 42 (60,0) |
| Pratica atividade de lazer (vez por semana) – n (%) | |
| Sim | 22 (31,4) |
| Não | 48 (68,6) |

DP: Desvio-Padrão; BDI-II: Beck Depression Inventory - II (Inventário de Depressão de Beck - II); CC: Circunferência da Cintura.

4.3. Avaliação do desempenho cognitivo de adultos usuários do SUS

Entre os avaliados, 34 indivíduos se enquadravam no desempenho esperado para a faixa etária ficando dentro da média, 11 indivíduos obtiveram o desempenho superior ao esperado para a faixa etária e 25 indivíduos obtiveram desempenho inferior ao esperado para a faixa etária. Na Memória do Reconhecimento, apenas 2 indivíduos obtiveram o desempenho inferior ao esperado para a faixa etária, 32 indivíduos obtiveram desempenho superior e 36 indivíduos obtiveram desempenho médio.

A média das faixas etárias observadas no estudo foram predominantemente menor em comparação com a média apresentada pela normativa do teste e para a Memória do Reconhecimento a média observada foi maior para todos os grupos de idade, em comparação com os dados normativos. Na Tabela 4 encontram-se os resultados do teste cognitivo RAVLT, separados por faixa etária, de acordo com a normativa brasileira (DE PAULA; MALLOY-DINIZ, 2019).

Os nossos resultados mostram que a maior parte dos indivíduos de ambos os sexos obtiveram um desempenho médio e médio inferior para todas as variáveis avaliadas no teste cognitivo RAVLT, de acordo com a interpretação geral do teste cognitivo RAVLT (Tabela 5). Apenas para a Interferência Proativa a maioria dos indivíduos se enquadravam em desempenho médio superior e o desempenho médio.

Tabela 4. Resultados do RAVLT de acordo com a faixa etária da normativa brasileira.

| RAVLT | Todos os participantes n=70 | | 20 anos n=2 | | 21-30 anos n=10 | | 31-40 anos n=15 | | 41-50 anos n=20 | | 51-60 anos n=23 | |
|---------------------------|--------------------------------|-----------|-----------------|-----------|--------------------|-----------|--------------------|-----------|--------------------|-----------|--------------------|-----------|
| | Média (DP) | Min-Máx | Média (DP) | Min-Máx | Média (DP) | Min-Máx | Média (DP) | Min-Máx | Média (DP) | Min-Máx | Média (DP) | Min-Máx |
| Memória de trabalho | 5,51 (2,0) | 2-13 | 7,50 (4,95) | 4-11 | 7,00 (2,11) | 4-11 | 5,27 (1,28) | 3-8 | 5,00 (2,29) | 2-13 | 5,30 (1,52) | 2-8 |
| Capacidade de Aprendizado | 44,24 (9,87) | 17-66 | 55 (9,90) | 48-62 | 51,40 (10,92) | 36-66 | 43,93 (9,10) | 23-59 | 41,10 (8,45) | 22-62 | 43,13 (9,71) | 17-59 |
| Evocação Imediata | 8,75 (3,11) | 0-15 | 11,50 (0,71) | 11-12 | 10,40 (2,95) | 5-15 | 8,53 (3,74) | 0-15 | 8,15 (3,08) | 0-12 | 8,48 (2,69) | 2-14 |
| Interferência Proativa | 1,01 (0,43) | 0,28-2,50 | 1,30 (0,75) | 0,77-1,83 | 0,77 (0,29) | 0,28-1,17 | 1,10 (0,45) | 0,50-2,00 | 1,14 (0,46) | 0,37-2,50 | 0,93 (0,39) | 0,40-2,00 |
| Interferência Retroativa | 0,80 (0,23) | 0,00-1,17 | 0,79 (0,18) | 0,67-0,92 | 0,88 (0,15) | 0,67-1,10 | 0,73 (0,31) | 0,00-1,07 | 0,79 (0,26) | 0,00-1,17 | 0,82 (0,18) | 0,37-1,14 |
| Evocação Tardia | 9,02 (3,35) | 0-15 | 12,50 (0,71) | 12-13 | 11,20 (2,90) | 6-15 | 9,27 (3,15) | 4-15 | 8,05 (3,69) | 0-13 | 8,48 (3,03) | 1-15 |
| Memória de Reconhecimento | 13,01 (1,87) | 5-15 | 14,50 (0,71) | 14-15 | 13,60 (1,26) | 13-15 | 12,27 (2,69) | 5-15 | 13,10 (1,37) | 10-15 | 13,04 (1,82) | 10-15 |

Legenda: RAVLT: Teste Auditivo-Verbal de Rey; DP: Desvio-Padrão; Min-Máx: Mínimo Máximo.

Tabela 5. A comparação dos resultados do RAVLT em homens e mulheres.

| RAVLT | Interpretação geral do teste | | | | | | | | | |
|---------------------------|------------------------------|-----------|-------------------|-----------|----------|-----------|-------------------|-----------|-------------|----------|
| | D. Superior | | D. Médio Superior | | D. Médio | | D. Médio Inferior | | D. Inferior | |
| | M | F | M | F | M | F | M | F | M | F |
| | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) |
| Memória Imediata | 1 (10,0) | 3 (5,0) | 0 (0) | 10 (16,7) | 8 (80,0) | 23 (38,3) | 1 (10,0) | 19 (31,7) | 0 (0) | 5 (8,3) |
| Capacidade de Aprendizado | 0 (0) | 4 (6,7) | 1 (10,0) | 8 (13,3) | 4 (40,0) | 34 (56,7) | 4 (40,0) | 9 (15,0) | 1 (10,0) | 6 (10,0) |
| Evocação Imediata | 0 (0) | 3 (5,0) | 1 (10,0) | 5 (8,3) | 4 (40,0) | 39 (65,0) | 2 (20,0) | 8 (13,3) | 3 (30,0) | 5 (8,3) |
| Evocação Tardia | 0 (0) | 5 (8,3) | 0 (0) | 8 (13,3) | 6 (60,0) | 31 (51,7) | 3 (30,0) | 8 (13,3) | 1 (10,0) | 5 (8,3) |
| Interferência Proativa | 0 (0) | 10 (16,7) | 4 (40,0) | 21 (35,0) | 4 (40,0) | 20 (33,3) | 1 (10,0) | 7 (11,7) | 1 (10,0) | 2 (3,3) |
| Interferência Retroativa | 1 (10) | 2 (3,3) | 1 (10) | 17 (28,3) | 3 (30,0) | 26 (43,3) | 3 (30,0) | 9 (15,0) | 2 (20,0) | 6 (10,0) |
| Memória do Reconhecimento | 0 (0) | 18 (30,0) | 2 (20,0) | 12 (20,0) | 7 (70,0) | 29 (48,3) | 1 (10,0) | 1 (1,67) | 0 (0) | 0 (0) |

Legenda: D: Desempenho; M: Masculino; F: Feminino.

4.4. Avaliação do perfil de metilação da região 1F do gene *NR3C1*

A análise do perfil de metilação do gene *NR3C1* foi realizada apenas para 55 indivíduos da pesquisa, os demais indivíduos não tinham quantidade suficiente de DNA para fazer a análise de pirosequenciamento. Assim, na análise da região exônica e promotora do gene *NR3C1* foi observado uma média de 0,49% (DP= 1,51) na média dos sítios 40, 41, 42, 44 e 45. No sítio 46 foram encontrados os maiores níveis de metilação para essa amostra. Já nos sítios 43 e 47, a porcentagem de metilação foi 0%. Na Tabela 6 encontra-se os resultados do perfil de metilação do gene *NR3C1*.

Tabela 6. Perfil de metilação da região 1F do gene *NR3C1* dos participantes do estudo.

| Região* | CpGs Avaliadas (n=55) | Média – DP | Mínimo – Máximo |
|---------|-----------------------|---------------------|-----------------|
| 1F | Sítio 40 | 0,57 ($\pm 0,23$) | 0,0-7,94 |
| | Sítio 41 | 1,16 ($\pm 0,35$) | 0,0-10,52 |
| | Sítio 42 | 0,28 ($\pm 0,20$) | 0,0-9,0 |
| | Sítio 44 | 0,49 ($\pm 0,38$) | 0,0-19,72 |
| | Sítio 45 | 0,59 ($\pm 0,43$) | 0,0-21,11 |
| | Sítio 46 | 0,94 ($\pm 0,52$) | 0,0-24,30 |

*Conforme já descrito por Parma-Gudiel (2015). DP: Desvio-padrão.

4.5. Análise entre o perfil de metilação do gene *NR3C1* com as variáveis do teste cognitivo RAVLT

Para avaliar a hipótese de relação entre o perfil de metilação do *NR3C1* e o desempenho cognitivo no teste do RAVLT, foi realizado o teste de correlação de Spearman e os resultados são expressos na Tabela 7. Para essa amostra avaliada não foi observado correlação entre os sítios 40, 41, 42, 44, 45, 46 e a média entre todos os sítios avaliados.

Tabela 7. Correlação de Spearman entre as variáveis do RAVLT e metilação de CpGs da região 1F do gene *NR3C1*.

| RAVLT/CpG's | | CpG40 | CpG41 | CpG42 | CpG44 | CpG45 | CpG46 | Média 40 a 47 |
|---------------------------|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------------------|
| Memória Imediata | r | -0,022 | 0,073 | 0,156 | -0,037 | -0,037 | -0,012 | -0,032 |
| | p | 0,872 | 0,595 | 0,255 | 0,786 | 0,786 | 0,931 | 0,814 |
| Capacidade de Aprendizado | r | 0,013 | 0,133 | 0,18 | 0,139 | 0,139 | 0,061 | 0,053 |
| | p | 0,922 | 0,334 | 0,188 | 0,313 | 0,313 | 0,661 | 0,699 |
| Evocação Imediata | r | 0,048 | 0,193 | 0,12 | 0,081 | 0,081 | 0,097 | 0,15 |
| | p | 0,729 | 0,159 | 0,382 | 0,555 | 0,555 | 0,483 | 0,271 |
| Evocação Tardia | r | 0,102 | 0,13 | 0,117 | 0,093 | 0,093 | 0,016 | 0,137 |
| | p | 0,458 | 0,345 | 0,397 | 0,499 | 0,499 | 0,906 | 0,315 |
| Interferência Proativa | r | -0,214 | 0,065 | -0,069 | -0,129 | -0,129 | -0,078 | -0,097 |
| | p | 0,117 | 0,638 | 0,614 | 0,349 | 0,349 | 0,571 | 0,476 |
| Interferência Retroativa | r | -0,03 | 0,047 | 0,09 | 0,049 | 0,049 | 0,051 | 0,043 |
| | p | 0,825 | 0,732 | 0,512 | 0,722 | 0,722 | 0,712 | 0,755 |
| Memória do Reconhecimento | r | -0,018 | -0,141 | -0,037 | 0,177 | 0,177 | 0,088 | -0,075 |
| | p | 0,894 | 0,306 | 0,79 | 0,197 | 0,197 | 0,523 | 0,583 |

*Correlação de Spearman a 5% de significância.

A associação entre cada variável do RAVLT e a metilação de *NR3C1* de cada sítio CpG na análise de regressão logística não evidenciou associação entre o desempenho cognitivo e os níveis de metilação em *NR3C1* da média das CpGs 40-47.

4.5. Análise dos níveis de cortisol sérico e sua relação com desempenho cognitivo.

Foram avaliados os níveis de cortisol sérico de 68 indivíduos e o valor médio observado foi de 12,4 µg/dL (min-máx: 4,6-25,7, desvio padrão: 4,2). A maioria dos voluntários apresentaram valores normais de cortisol sérico (93%), enquanto 6% apresentaram níveis de cortisol baixo e apenas 1 indivíduo apresentou alto nível de cortisol.

Não foram encontradas correlações significativas em relação aos níveis de cortisol séricos e cada variável do RAVLT, tampouco associações em análise de regressão logística bivariada com alterações nos níveis de cortisol. Os resultados da correlação de Spearman estão apresentados na tabela a seguir (Tabela 8).

Tabela 8. Correlação de Spearman entre o desempenho cognitivo (variáveis do RAVLT) e os escores de BDI-II, escores de EBIA, IMC, circunferência da cintura e os níveis de cortisol sérico.

| RAVLT/CpG's | | BDI-II | EBIA | IMC | CC | Cortisol Sérico |
|---------------------------|----------|--------|---------------|--------|--------|-----------------|
| Memória Imediata | r | 0,226 | -0,208 | -0,166 | -0,136 | 0,084 |
| | p | 0,066 | 0,085 | 0,17 | 0,266 | 0,497 |
| Capacidade de Aprendizado | r | 0,119 | -0,296 | -0,16 | -0,197 | -0,072 |
| | p | 0,336 | 0,013 | 0,186 | 0,105 | 0,562 |
| Evocação Imediata | r | 0,196 | 0,111 | -0,205 | -0,221 | 0,04 |
| | p | 0,112 | 0,361 | 0,088 | 0,068 | 0,745 |
| Evocação Tardia | r | 0,165 | -0,158 | -0,098 | -0,155 | 0,129 |
| | p | 0,182 | 0,191 | 0,417 | 0,203 | 0,295 |
| Interferência Proativa | r | -0,234 | -0,087 | 0,109 | 0,064 | -0,308 |
| | p | 0,057 | 0,474 | 0,371 | 0,603 | 0,572 |
| Interferência Retroativa | r | 0,128 | 0,057 | -0,196 | -0,221 | 0,12 |
| | p | 0,301 | 0,64 | 0,104 | 0,069 | 0,328 |
| Memória do Reconhecimento | r | 0,058 | -0,073 | -0,113 | -0,125 | -0,071 |
| | p | 0,639 | 0,547 | 0,351 | 0,305 | 0,567 |

Legenda: RAVLT: Teste de Aprendizagem Auditivo-Verbal de Rey; BDI-II: Inventário de Depressão de Beck - II; EBIA: Escala Brasileira de Insegurança Alimentar; CC: Circunferência da Cintura.

4.6. Relação entre desempenho cognitivo, INSAN e sintomas depressivos.

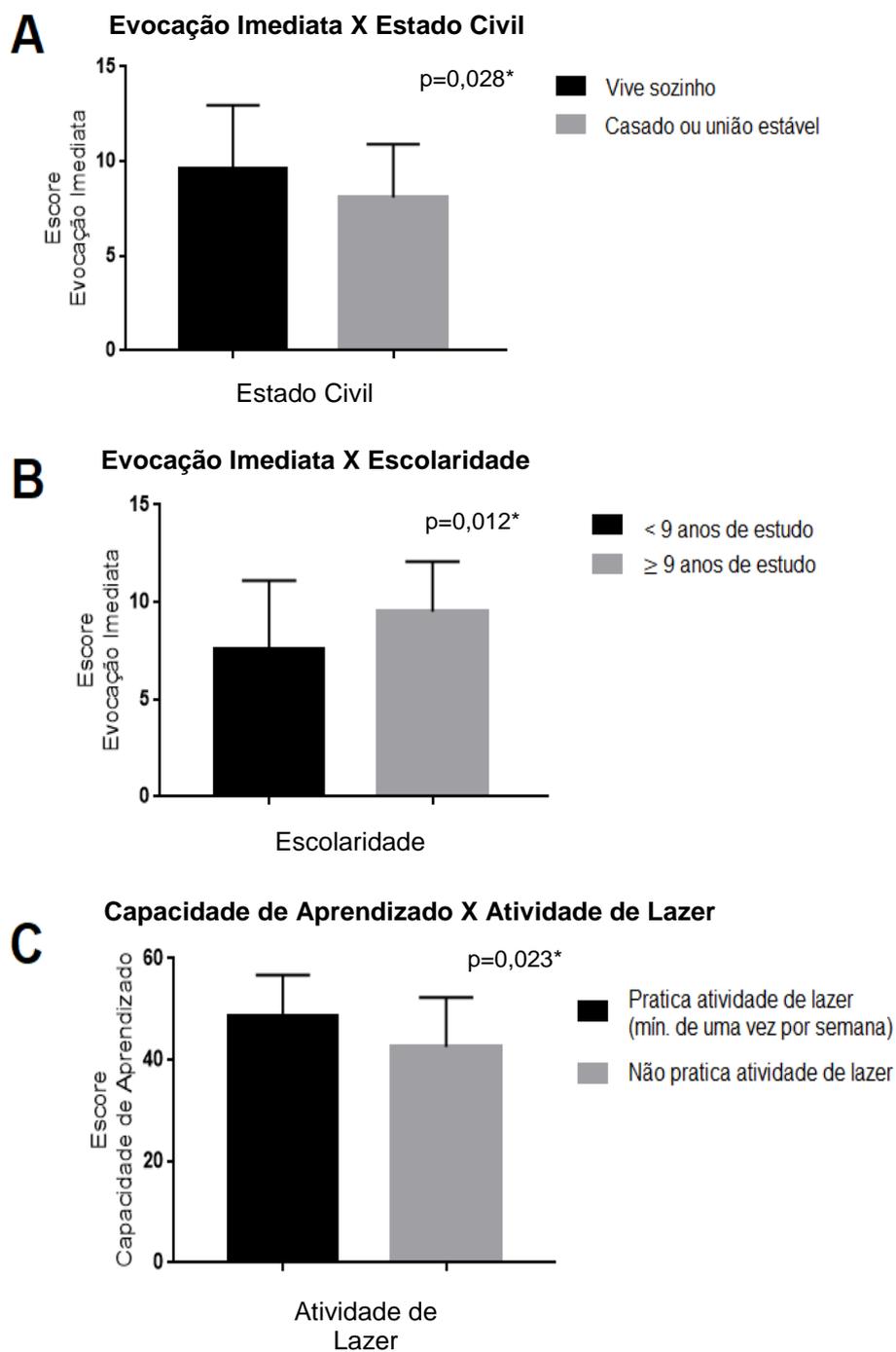
Não foram encontradas correlações significativas em relação ao escore total de BDI-II e cada variável do RAVLT. Os resultados estão apresentados na Tabela 8. Além disso, não foram encontradas associações entre a presença de sintomas depressivos e cada variável do RAVLT em análise de regressão logística bivariada.

Em relação a insegurança alimentar e nutricional, foi realizado o teste de correlação de Spearman que revelou correlação inversa com a Capacidade de Aprendizado ($p=0,013$ e $r=-0,296$), como apresentado na Tabela 8.

4.7. Análise entre as variáveis socioeconômicas e estilo de vida com as variáveis do teste cognitivo RAVLT

Foi realizado o teste de Mann-Whitney para determinar diferença entre os escores de desempenho cognitivo em relação às diferentes variáveis socioeconômicas, físicas e de estilo de vida. Diferenças significativas entre as medianas do escore de Evocação Imediata do teste RAVLT e a escolaridade ($p=0,012$) e o estado civil ($p=0,028$) foram observadas, ou seja, indivíduos casados ou em união estável e indivíduos com baixa escolaridade apresentaram menores escores de Evocação Imediata. O mesmo teste também revelou que os indivíduos que praticavam atividades de lazer possuíam escores maiores na Capacidade de Aprendizado ($p=0,023$). As demais variáveis socioeconômicas e de estilo de vida não apresentaram diferenças significantes nos níveis de desempenho cognitivo. Na Figura 1 foram apresentados os resultados apenas das variáveis que exibiram diferenças significativas para os escores dos parâmetros de desempenho cognitivo.

Figura 1. Níveis medianos de desempenho cognitivo, segundo estado civil, escolaridade e práticas de atividade de lazer.



Legenda: (A) Evocação Imediata x Estado Civil; (B) Evocação Imediata x Escolaridade; (C) Capacidade de Aprendizado x Atividade de Lazer. *Diferença significativa para os grupos, segundo o teste U de Mann-Whitney.

6. DISCUSSÃO

Os dados apresentados neste estudo trazem contribuições importantes para a comunidade científica, pois pela primeira vez foi avaliada a performance cognitiva e o perfil de metilação na região promotora do gene *NR3C1* de adultos usuários do SUS. Os resultados encontrados nesse estudo mostram que a maioria dos indivíduos apresentaram desempenho médio e médio inferior em todas as variáveis do RAVLT. Já a metilação do *NR3C1* para a população estudada foi baixa, e não foram encontradas correlações significativas em relação ao desempenho cognitivo das variáveis estudadas no teste de RAVLT. Entretanto, foram encontradas correlações significativas entre a memória de curta-duração (memória imediata) com o estado civil e nível de escolaridade. Ainda, o teste de correlação de Spearman revelou uma correlação inversa entre a capacidade de aprendizagem e insegurança alimentar e nutricional.

A população do estudo pertence ao município de Alegre, que se localiza ao sul do Espírito Santo, estado que pertence à região sudeste do Brasil. A população alegreense apresenta aproximadamente 32.165 habitantes (IBGE, 2019) e a região possui uma vocação agrária, cujas principais atividades econômicas são cafeicultura, pecuária de leite e corte (DE SIQUEIRA et al., 2013; PTDRSS 2009).

O perfil da amostra descrita no presente estudo demonstra que em sua maioria, é composta por mulheres que, em comparação com os homens, procuram mais o sistema único de saúde (BOING et al., 2010). Em relação à idade, a maioria das pessoas tinham entre 40 e 50 anos. A amostra também se caracteriza pela maioria dos indivíduos serem casados, de baixa escolaridade e com grande parcela em situação de baixa renda e em condição de insegurança alimentar e nutricional, o que pode comprometer o bem-estar individual e coletivo de forma crônica, expressando-se como estresse psicossocial prolongado (FREITAS et al., 2018).

Não foram encontradas diferenças estatísticas no desempenho cognitivo entre homens e mulheres da amostra, entretanto, é preciso enfatizar que a população estudada é, na maior parte, composta por mulheres (85,7%). Estudos mostram que o desempenho cognitivo no teste RAVLT foi maior no gênero feminino em relação ao gênero masculino (MALLOY-DINIZ, Leandro Fernandes et al., 2007;

VAN DER ELST et al., 2005; PAULS, 2013). Já Gale e colaboradores (2007) não encontraram diferenças significativas no teste de RAVLT em relação ao gênero.

É importante ressaltar que a maioria dos indivíduos de todos os grupos de idade obtiveram o desempenho no teste dentro da média ou na média inferior de acordo com a normativa mais recente (DE PAULA; MALLOY-DINIZ, 2019). Esse resultado sugere um desempenho típico para os grupos de idade avaliados. Sabe-se que as alterações hormonais relacionadas à menopausa e à andropausa podem afetar significativamente a memória episódica no gênero feminino e masculino, ou seja, o desempenho cognitivo observado no teste RAVLT (GREENDALE, 2009; PAULS, 2012).

Em relação aos níveis de metilação dos indivíduos avaliados nesse estudo, mais de 90% da amostra apresentou-se não metilada em todas as CpGs analisadas. Estudos mostram que os níveis de metilação para o *NR3C1* no sangue periférico é baixo (KLENGEL; BINDER, 2015; PALMA-GUDIÉL et al., 2015). Dessa forma, são necessários novos estudos para avaliar a relação entre o perfil de metilação e o seu impacto na cognição.

Sabe-se que as adversidades no ciclo de vida, como os impactos do estresse crônico no bem-estar psicológico relaciona-se com o aumento da prevalência de doenças psiquiátricas como a depressão. Além disso, o estresse crônico está associado com o déficit cognitivo observado na memória episódica (GAO et al., 2009; NA et al., 2019).

Estudos recentes apontam que as adversidades no ciclo de vida comprometem significativamente o funcionamento do eixo HPA, levando à perda do mecanismo de feedback negativo, que resulta em hipertativação do eixo HPA e conseqüentemente, aumento da secreção de cortisol (ARGENTIERI et al., 2017; TURECKI; MEANEY, 2016). Como consequência desse processo, ocorre alterações no padrão de metilação de alguns genes envolvidos nesse mecanismo. Por exemplo, a metilação da região 1F promotora e exônica de *NR3C1* levaria à repressão da transcrição, menores níveis de expressão de RNAm, com conseqüente redução nos níveis de GR no sistema nervoso central e alterações nos níveis de cortisol (KANG et al., 2018).

Assim, a desregulação no eixo HPA promove déficit cognitivo por afetar os mecanismos moleculares e epigenéticos envolvidos na formação e manutenção da

memória em estruturas importantes para a neurobiologia do estresse e memória, como o hipocampo, a amígdala e o córtex pré-frontal em roedores e em humanos (FINSTERWALD; ALBERINI, 2014). Entretanto, nossos resultados não encontraram resultados significativos entre a memória episódica e os níveis de cortisol sérico e o a porcentagem de metilação do gene *NR3C1* nas CpGs avaliadas.

A existência de uma variabilidade individual considerável no grau de ativação no eixo HPA pode ser considerada. A metodologia utilizada para determinação do cortisol neste estudo se apresenta como uma limitação, já que representa avaliação pontual, podendo sofrer variações de acordo com fatores como sono, ritmo circadiano, alimentação, tabagismo, distúrbios temporários e estresses ocorridos no dia da avaliação (BORÇOI et al., 2020).

A insegurança alimentar (INSAN) é um fenômeno complexo e multidimensional que não se configura apenas pela insuficiência na ingestão de alimentos, mas também pela ingestão de dieta de má qualidade, pela interrupção dos padrões alimentares e, principalmente, pela ansiedade e incerteza sobre o acesso limitado de alimentos para todos os membros da família, devido à falta de dinheiro e outros recursos (Martin 2016). Indivíduos de origens socioeconômicas desfavorecidas (por exemplo, mulheres, jovens adultos, baixa educação e beneficiários de subsídios sociais) são mais propensos a sofrer insegurança alimentar doméstica (TOMITA et al., 2019).

Estudos mostram que a INSAN é considerada uma adversidade ao longo do ciclo de vida e, portanto, um fator de estresse psicossocial (FREITAS et al., 2018). Por esse motivo, ela apresenta elevado potencial em promover comprometimento cognitivo ao longo do ciclo de vida através de alterações no eixo HPA e vias inflamatórias (GAO et al., 2009; NA et al., 2019).

A prevalência de INSAN na amostra do estudo foi de 40%, considerada alta em relação ao índice estimado nos EUA em 2018 de 11% (NA et al., 2019). Em relação ao estimado para o Brasil, a prevalência é de 22,6%, correspondente a 52 milhões de pessoas em 14,7 milhões de domicílios (PNAD, 2015). As consequências da insegurança alimentar vão além dos resultados de saúde física e podem afetar o bem-estar mental. No presente estudo, foi encontrada uma correlação inversa fraca e significativa negativa entre a capacidade de aprendizado e os escores de insegurança alimentar e nutricional, evidenciando que quanto

maiores os níveis de INSAN, menor a capacidade de aprendizagem. Esse achado é de extrema relevância para o estudo, pois mostra que a capacidade de aprendizagem pode ser afetada pela INSAN. Sabe-se que a aquisição de uma nova informação é de extrema importância para as etapas subsequentes relacionadas a formação de memória.

Infelizmente são poucos os estudos que correlacionam os efeitos da INSAN na memória episódica através do RAVLT. Wong e colaboradores (2016) não encontraram relação entre INSAN e desempenho cognitivo. Entretanto, não existem dados específicos sobre redução da capacidade de aprendizado em associação com INSAN. A associação entre redução do desempenho cognitivo e INSAN pode ser explicada por pelo menos duas vias mecanicistas: padrões alimentares não saudáveis, por exemplo: ausência de nutrientes importantes para a manutenção das atividades cognitivas no Sistema Nervoso Central e sofrimento mental devido ao estresse (NA et al., 2019; WONG et al., 2016).

Diante da metodologia transversal do estudo, o trabalho possui a limitação de não ser possível inferir a direção e causalidade das associações. Dessa forma, pode-se inferir também a outra possibilidade direcional, de os participantes com menor função cognitiva possuírem resultados menos favoráveis no mercado de trabalho e renda per capita e, assim, apresentarem maior probabilidade de se encontrar em situação de INSAN (GAO et al., 2009).

Neste estudo, algumas variáveis sociodemográficas e de estilo de vida correlacionaram-se com o desempenho cognitivo avaliado pelo teste de RAVLT. Indivíduos casados e de baixa escolaridade apresentaram pior capacidade de evocação imediata no estudo. Além disso, voluntários que possuíam maiores escores de insegurança alimentar e nutricional, apresentaram piores escores de capacidade de aprendizado.

Os achados demonstram que as pessoas que são casadas tiveram menores escores de comprometimento cognitivo na memória de curto prazo. Entretanto, os resultados vão de encontro aos achados de Mousavi-Nasab e colaboradores (2012) que, ao contrário, relataram que indivíduos casados exibiram melhor performance em testes cognitivos, apresentando melhor capacidade em memória episódica, evocação e de reconhecimento em relação a indivíduos solteiros, em população de estudo de 35-85 anos. Além disso, encontraram um maior declínio na capacidade

de memória episódica para solteiros e viúvos do que para casados ao longo do tempo. Já o estudo de Håkansson e colaboradores. (2009) mostrou que há um risco aumentado de declínio cognitivo das pessoas viúvas e divorciadas em idade avançada.

Os resultados do presente estudo mostram uma relação significativa entre a escolaridade e o desempenho cognitivo na memória de curto prazo, ou seja, quanto maior o nível de escolaridade em adultos, melhor o desempenho cognitivo em comparação com os indivíduos com baixa escolaridade.

Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores. Souza-Talarico (2007) encontraram um melhor desempenho cognitivo em idosos com níveis de escolaridade mais altos. Bento-Torres (2017) sugerem que os menores níveis de educação no início da vida constituem um fator de risco para o declínio cognitivo relacionado à idade, com uma influência muito mais forte que a própria idade. Os indivíduos com alta escolaridade apresentaram redução no risco de demência e declínio cognitivo, em comparação com indivíduos com baixa escolaridade em estudos epidemiológicos (CHEN et al., 2019; SHARIFIAN; ZAHODNE, 2019).

Dessa forma, as explicações teóricas para os achados deste estudo são que maior escolaridade tem sido relacionada com aumento reserva cognitiva (CHEN et al., 2019; SOLÉ-PADULLÉS et al., 2009).

Outro achado interessante do presente estudo mostrou que indivíduos que praticam atividade de lazer apresentaram maior capacidade de aprendizado em relação aos indivíduos que não praticam atividade de lazer.

Considerando que o estresse está associado à piora do desempenho cognitivo, pode-se inferir que a atividade de lazer estaria reduzindo o estresse, e funcionando como um fator protetor para piora da capacidade de aprendizagem na amostra, corroborando com todos os dados já discutidos no estudo.

De fato, Ouyang e colaboradores (2015) afirmam que atividades de lazer como atividades ao ar livre, artesanato, atividades relacionadas a hobby, incluindo atividades relacionadas a espiritualidade, estão associadas a redução do estresse já que permitem o aumento da interação e suporte social, sensação de autonomia, autodeterminação.

Em estudo recente de Borçoi e colaboradores (2020), a atividade de lazer esteve associada à redução do risco de depressão, justificado pelo fato de o lazer

ser considerado como uma estratégia de enfrentamento ao estresse, de suma importância para manutenção da saúde mental. Além disso, Simone & Haas (2013) relataram que participação em atividades de lazer pode melhorar a saúde física, funcionamento cognitivo e deficiência funcional.

Os dados do presente estudo corroboram com dados de Litwin e colaboradores (2017), que verificaram melhora da função cognitiva em atividades culturais de lazer. Verghese e colaboradores (2003), que relataram que leitura, prática de jogos de tabuleiro, prática de instrumentos musicais e de dança estavam associados a um risco reduzido de demência e de declínio nos testes cognitivos. Além destas associações, atividade de lazer na idade adulta também se apresenta como fator protetor da perda de função cognitiva em idades mais avançadas e que a participação reduzida em atividades de lazer está associada a declínio nos testes cognitivos na idade avançada (CHEN et al., 2019).

7. CONCLUSÃO

Com base neste estudo, pode-se concluir que determinados fatores sociodemográficos, de estilo de vida e a condição de insegurança alimentar e nutricional pode afetar a memória episódica e o aprendizado. Por outro lado, não foram encontradas alterações envolvendo o eixo HPA, como a metilação do gene *NR3C1* e os níveis séricos de cortisol, os quais não foram relacionados com a memória episódica e a aprendizagem. Estudos futuros devem considerar outras vias mediadoras potenciais que também contribuam para o entendimento da relação entre os processos epigenéticos e a cognição.

Neste estudo também foi observado uma prevalência de 40,0% de INSAN e 17% de depressão. Desta forma, este trabalho também sugere a necessidade de implementação de estratégias para melhorar as condições de segurança alimentar e o bem-estar social.

8. REFERÊNCIAS

- ARGENTIERI, M. A. et al. Epigenetic pathways in human disease: the impact of DNA methylation on stress-related pathogenesis and current challenges in biomarker development. **EBioMedicine**, v. 18, p. 327–350, 2017.
- BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neurociências: desvendando o sistema nervoso**. [S.l.]: Artmed Editora, 2002.
- BECK, A.; STEER, R.; BROWN, G. Manual for the Beck depression inventory-II (BDI-II). 1996.
- BENTO-TORRES, N. V. O. et al. Influence of schooling and age on cognitive performance in healthy older adults. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 50, n. 4, 2017.
- BIRD, A. The methyl-CpG-binding protein MeCP2 and neurological disease. **Biochemical Society Transactions**, v. 36, n. 4, p. 575–583, 2008.
- BOING, A. F. et al. Prevalência de consultas médicas e fatores associados: um estudo de base populacional no sul do Brasil. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 1, p. 41–46, 2010.
- BORÇOI, A. R. et al. Risk factors for depression in adults: NR3C1 DNA methylation and lifestyle association. **Journal of Psychiatric Research**, v. 121, p. 24–30, 2020. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022395619301608>>.
- BRASIL. **RESOLUÇÃO Nº 466 - Conselho Nacional de Saúde aprovar as seguintes diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos**. . Brasil: [s.n.], 2012
- BUSTAMANTE, A. C. et al. Glucocorticoid receptor DNA methylation, childhood maltreatment and major depression. **Journal of affective disorders**, v. 206, p. 181–188, 2016.
- CAIN, D. W.; CIDLOWSKI, J. A. Immune regulation by glucocorticoids. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 4, p. 233–247, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nri.2017.1>>.
- CHAI, W. J.; ABD HAMID, A. I.; ABDULLAH, J. M. **Working Memory From the Psychological and Neurosciences Perspectives: A Review** . **Frontiers in Psychology** . [S.l.: s.n.]. Disponível em:

- <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpsyg.2018.00401>>. , 2018
- CHEN, Y. et al. The positive impacts of early-life education on cognition, leisure activity, and brain structure in healthy aging. **Aging (Albany NY)**, v. 11, n. 14, p. 4923, 2019.
- DAY, J. J.; SWEATT, J. D. DNA methylation and memory formation. **Nature Neuroscience**, v. 13, n. 11, p. 1319–1323, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nn.2666>>.
- DE PAULA, J. J.; MALLOY-DINIZ, L. F. **RAVLT - Teste de Aprendizagem Auditivo-Verval de Rey**. [S.l: s.n.], 2019.
- DE SIQUEIRA, H. M. et al. Comercialização solidária da produção familiar de alimentos em Alegre-ES. **Extensão Rural**, v. 20, n. 3, p. 98–118, 2013.
- EICHENBAUM, H. Prefrontal–hippocampal interactions in episodic memory. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 18, n. 9, p. 547–558, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrn.2017.74>>.
- EKSTROM, A. D.; RANGANATH, C. Space, time, and episodic memory: The hippocampus is all over the cognitive map. **Hippocampus**, v. 28, n. 9, p. 680–687, 2018.
- FEDOTOVA, E. Y.; ILLARIOSHKIN, S. N. DNA Methylation in Neurodegenerative Diseases. **Russian Journal of Genetics**, v. 55, n. 3, p. 271–277, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1134/S1022795419030062>>.
- FENG, J. et al. Dnmt1 and Dnmt3a maintain DNA methylation and regulate synaptic function in adult forebrain neurons. **Nature neuroscience**, v. 13, n. 4, p. 423, 2010.
- FINSTERWALD, C.; ALBERINI, C. M. Stress and glucocorticoid receptor-dependent mechanisms in long-term memory: from adaptive responses to psychopathologies. **Neurobiology of learning and memory**, v. 112, p. 17–29, 2014.
- FREITAS, F. V. et al. Psychosocial stress and central adiposity: A Brazilian study with a representative sample of the public health system users. **PloS one**, v. 13, n. 7, 2018.
- GALLAGHER, D. et al. Healthy percentage body fat ranges: an approach for developing guidelines based on body mass index. **The American journal of clinical nutrition**, v. 72, n. 3, p. 694–701, 2000.
- GAO, X. et al. Food insecurity and cognitive function in Puerto Rican adults. **The American journal of clinical nutrition**, v. 89, n. 4, p. 1197–1203, 2009.

GOMES-OLIVEIRA, M. H. et al. Validation of the Brazilian Portuguese version of the Beck Depression Inventory-II in a community sample. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 34, n. 4, p. 389–394, 2012.

HÅKANSSON, K. et al. Association between mid-life marital status and cognitive function in later life: population based cohort study. **Bmj**, v. 339, p. b2462, 2009.

HALDER, R. et al. DNA methylation changes in plasticity genes accompany the formation and maintenance of memory. **Nature Neuroscience**, v. 19, n. 1, p. 102–110, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nn.4194>>.

HEYWARD, F. D.; SWEATT, J. D. DNA methylation in memory formation: emerging insights. **The Neuroscientist**, v. 21, n. 5, p. 475–489, 2015.

HU, C. et al. Comparative analysis of ginsenosides in human glucocorticoid receptor binding, transactivation, and transrepression. **European Journal of Pharmacology**, v. 815, p. 501–511, 2017. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299917306684>>.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Cidades e Estados do Brasil**. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/es/alegre/panorama>>.

IJSN - INSTITUTO JONES DOS SANTOS NEVES. Segurança Alimentar no Espírito Santo, a partir da Pnad 2013. 2015. Disponível em: <<http://www.ijsn.es.gov.br/artigos/4303-seguranca-alimentar-no-espírito-santo>>.

KANG, H.-J. et al. Longitudinal associations between glucocorticoid receptor methylation and late-life depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 84, p. 56–62, 2018.

KLENGEL, T.; BINDER, E. B. Epigenetics of stress-related psychiatric disorders and genex environment interactions. **Neuron**, v. 86, n. 6, p. 1343–1357, 2015.

LITWIN, H.; SCHWARTZ, E.; DAMRI, N. Cognitively stimulating leisure activity and subsequent cognitive function: A SHARE-based analysis. **The Gerontologist**, v. 57, n. 5, p. 940–948, 2017.

LUETHI, M.; MEIER, B.; SANDI, C. Stress effects on working memory, explicit memory, and implicit memory for neutral and emotional stimuli in healthy men. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 2, p. 5, 2009.

MALLOY-DINIZ, Leandro F et al. **Avaliação Neuropsicológica**. 2. ed. [S.l.]: Artmed Editora, 2018.

- MALLOY-DINIZ, Leandro Fernandes et al. The Rey auditory-verbal learning test: applicability for the Brazilian elderly population. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 29, n. 4, p. 324–329, 2007.
- MAZE, I. et al. Every amino acid matters: essential contributions of histone variants to mammalian development and disease. **Nature Reviews Genetics**, v. 15, n. 4, p. 259–271, 2014.
- MCCARTHY, H. D. et al. Body fat reference curves for children. **International journal of obesity**, v. 30, n. 4, p. 598, 2006.
- MCGOWAN, P. O. et al. Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. **Nature neuroscience**, v. 12, n. 3, p. 342, 2009.
- MILLER, C. A. et al. Cortical DNA methylation maintains remote memory. **Nature neuroscience**, v. 13, n. 6, p. 664–666, 2010.
- MORRIS, J. R. Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. **Science**, v. 293, n. 5532, p. 1103–1105, 2001.
- MOSCOVITCH, M. et al. Episodic Memory and Beyond: The Hippocampus and Neocortex in Transformation. **Annual Review of Psychology**, v. 67, n. 1, p. 105–134, 4 jan. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev-psych-113011-143733>>.
- MOUSAVI-NASAB, S.-M.-H. et al. The effects of marital status on episodic and semantic memory in healthy middle-aged and old individuals. **Scandinavian Journal of Psychology**, v. 53, n. 1, p. 1–8, 1 fev. 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1467-9450.2011.00926.x>>.
- NA, M. et al. Food Insecurity and Cognitive Function in Middle to Older Adulthood: A Systematic Review. **Advances in Nutrition**, 2019.
- OBERLANDER, T. F. et al. Prenatal exposure to maternal depression, neonatal methylation of human glucocorticoid receptor gene (NR3C1) and infant cortisol stress responses. **Epigenetics**, v. 3, n. 2, p. 97–106, 2008.
- ORGANIZATION, W. H. **Obesity: preventing and managing the global epidemic**. [S.I.]: World Health Organization, 2000.
- OUYANG, Z. et al. Leisure, functional disability and depression among older Chinese living in residential care homes. **Aging & mental health**, v. 19, n. 8, p. 723–730, 2015.

- PALMA-GUDIÉL, H. et al. Glucocorticoid receptor gene (NR3C1) methylation processes as mediators of early adversity in stress-related disorders causality: A critical review. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 55, p. 520–535, 1 ago. 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0149763415001517?via%3Dihub>>. Acesso em: 20 out. 2019.
- PÉREZ-ESCAMILLA, R.; SEGALL-CORRÊA, A. M. Food insecurity measurement and indicators. **Revista de Nutrição**, v. 21, p. 15s-26s, 2008.
- PERROUD, N. et al. Increased methylation of glucocorticoid receptor gene (NR3C1) in adults with a history of childhood maltreatment: a link with the severity and type of trauma. **Translational psychiatry**, v. 1, n. 12, p. e59–e59, 2011.
- PILETIČ, K.; KUNEJ, T. MicroRNA epigenetic signatures in human disease. **Archives of toxicology**, v. 90, n. 10, p. 2405–2419, 2016.
- POON, C. H. et al. Memory and neuromodulation: A perspective of DNA methylation. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 111, p. 57–68, 2020. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014976341930819X>>.
- REY, A. L'Examen Clinique en Psychologie. **Paris: Presses Universitaires de France**, 1964.
- SALAZAR, L. A. et al. Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. **Clinical chemistry**, v. 44, n. 8, p. 1748–1750, 1998.
- SALGADO, J. V. et al. **Applicability of the Rey Auditory-Verbal Learning Test to an adult sample in Brazil**. **Brazilian Journal of Psychiatry**. [S.l.]: scielo . , 2011
- SAURY, J.-M.; EMANUELSON, I. Neuropsychological Assessment of Hippocampal Integrity. **Applied Neuropsychology: Adult**, v. 24, n. 2, p. 140–151, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/23279095.2015.1113536>>.
- SEKERES, M. J.; WINOCUR, G.; MOSCOVITCH, M. The hippocampus and related neocortical structures in memory transformation. **Neuroscience Letters**, v. 680, p. 39–53, 2018. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304394018303331>>.
- SHARIFIAN, N.; ZAHODNE, L. B. The Enduring Effects of Mother–Child Interactions on Episodic Memory in Adulthood. **Journal of Marriage and Family**, v. 81, n. 4, p. 936–952, 2019.

- SHIELDS, G. S. et al. The effects of acute stress on episodic memory: a meta-analysis and integrative review. **Psychological bulletin**, v. 143, n. 6, p. 636, 2017.
- SIAMATRAS, T. D.; STRATAKIS, C. A. NR3C1 (nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1/glucocorticoid receptor). **Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology**, 2016.
- SIMONE, P. M.; HAAS, A. L. Frailty, leisure activity and functional status in older adults: Relationship with subjective well being. **Clinical Gerontologist**, v. 36, n. 4, p. 275–293, 2013.
- SOLÉ-PADULLÉS, C. et al. Brain structure and function related to cognitive reserve variables in normal aging, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. **Neurobiology of aging**, v. 30, n. 7, p. 1114–1124, 2009.
- SOUZA-TALARICO, J. N. de et al. The influence of schooling on working memory performance in elderly individuals without cognitive decline. **Dementia & neuropsychologia**, v. 1, n. 3, p. 276–281, 2007.
- STEIGER, H. et al. Methylation of the glucocorticoid receptor gene promoter in bulimic women: associations with borderline personality disorder, suicidality, and exposure to childhood abuse. **International Journal of Eating Disorders**, v. 46, n. 3, p. 246–255, 2013.
- TOMITA, A. et al. Major depression and household food insecurity among individuals with multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) in South Africa. **Social psychiatry and psychiatric epidemiology**, v. 54, n. 3, p. 387–393, 2019.
- TRONICK, E.; HUNTER, R. G. Waddington, dynamic systems, and epigenetics. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 10, p. 107, 2016.
- TULVING, E. Episodic Memory: From Mind to Brain. **Annual Review of Psychology**, v. 53, n. 1, p. 1–25, 1 fev. 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev.psych.53.100901.135114>>.
- TURECKI, G.; MEANEY, M. J. Effects of the Social Environment and Stress on Glucocorticoid Receptor Gene Methylation: A Systematic Review. **Biological Psychiatry**, v. 79, n. 2, p. 87–96, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006322314009676>>.
- TURNER, J. D. et al. Tissue specific glucocorticoid receptor expression, a role for alternative first exon usage? **Biochemical pharmacology**, v. 72, n. 11, p. 1529–1537, 2006.

- VALKO, M. et al. **Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions***. [S.I.]: Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009279705004333>>. Acesso em: 18 abr. 2019. , 10 mar. 2006
- VAN DER ELST, W. I. M. et al. Rey's verbal learning test: normative data for 1855 healthy participants aged 24–81 years and the influence of age, sex, education, and mode of presentation. ***Journal of the International Neuropsychological Society***, v. 11, n. 3, p. 290–302, 2005.
- VANDEVYVER, S.; DEJAGER, L.; LIBERT, C. Comprehensive overview of the structure and regulation of the glucocorticoid receptor. ***Endocrine reviews***, v. 35, n. 4, p. 671–693, 2014.
- VANDEWALLE, J. et al. Therapeutic Mechanisms of Glucocorticoids. ***Trends in Endocrinology & Metabolism***, v. 29, n. 1, p. 42–54, 2018. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043276017301480>>.
- VERGHESE, J. et al. Leisure activities and the risk of dementia in the elderly. ***New England Journal of Medicine***, v. 348, n. 25, p. 2508–2516, 2003.
- VIALOU, V. et al. Epigenetic mechanisms of depression and antidepressant action. ***Annual review of pharmacology and toxicology***, v. 53, p. 59–87, 2013.
- WEAVER, I. C. G. Epigenetic programming by maternal behavior and pharmacological intervention Nature versus nurture: let's call the whole thing off. ***Epigenetics***, v. 2, n. 1, p. 22–28, 2007.
- WONG, J. C. et al. Food insecurity is associated with subsequent cognitive decline in the Boston Puerto Rican Health Study. ***The Journal of nutrition***, v. 146, n. 9, p. 1740–1745, 2016.
- ZEIDMAN, P.; MAGUIRE, E. A. Anterior hippocampus: the anatomy of perception, imagination and episodic memory. ***Nature Reviews Neuroscience***, v. 17, n. 3, p. 173–182, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrn.2015.24>>.

9. APÊNDICE 1

CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE/UFES



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Impacto do programa de capacitação de agentes SUS no estado nutricional de vitamina D e sua relação com obesidade, depressão, câncer, metilação do Receptor do Glucocorticoide e avaliação de hipovitaminose D na população da região do Caparaó Capixaba

Pesquisador: ADRIANA MADEIRA ALVARES DA SILVA

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 3

CAAE: 52830216.5.0000.5060

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS AGRARIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.574.160

Apresentação do Projeto:

Pesquisador responsável: ADRIANA MADEIRA ALVARES DA SILVA

Instituição: CENTRO DE CIÊNCIAS AGRARIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPIRITO SANTO-CCA-UFES

Finalidade: PPSUS

Curso: Biologia/Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia/RENORBIO da UFES

JUSTIFICATIVA: A vitamina D é um hormônio esteroide que atua como fator de transcrição nuclear que exerce papel importante no metabolismo ósseo, com propriedades anti-inflamatórias e moduladoras do sistema imune. Estudos recentes mostram uma correlação entre níveis baixos de vitamina D e o aparecimento de doenças, incidência de câncer e mortalidade, e doenças autoimunes. A fonte mais importante para sua obtenção é o sol, que contribui com 80 a 90% na produção da vitamina, apenas cerca de 10 a 20% provém dos alimentos. Ocorre que a com descoberta de que a radiação ultravioleta do sol poderia provocar câncer de pele, associada ao estilo de vida e trabalho, em locais sem insolação, levou grande parte da população mundial a

Endereço: Av. Marechal Campos 1488

Bairro: S/N

CEP: 29.040-091

UF: ES

Município: VITÓRIA

Telefone: (27)3335-7211

E-mail: cep@cca.ufes.br

10. APÊNDICE 2

As variáveis estudadas na presente pesquisa foram codificadas/categorizadas de acordo com o Quadro 1.

Quadro 1. Codificação das variáveis do estudo.

| Variáveis | Categorização |
|--|---|
| Variável Dependente | |
| Variáveis do RAVLT (Memória Imediata, Capacidade de Aprendizado, Evocação Imediata, Evocação Tardia, Interferência Proativa, Interferência Retroativa e Memória do Reconhecimento) | Escores (variável contínua) ou categorização geral: Desempenho Superior, Desempenho Médio Superior, Desempenho Médio, Desempenho Médio Inferior e Desempenho Inferior |
| Variáveis Independentes | |
| Metilação do DNA de <i>NR3C1</i> | variável contínua |
| Sexo | masculino/feminino |
| Idade | variável contínua |
| Estado Civil | Não casado/Casado |
| Educação | ≤ 11 anos de estudo/ ≥ 12 anos de estudo |
| Classificação da Renda | Baixa Renda (< \$5.00/ dia)/Renda não baixa (≥\$5.00/ dia) |
| Consumo atual de álcool | não/sim |
| Consumo atual de cigarro | não/sim |
| Pratica de atividade física | não/sim |
| Pratica atividade de lazer (≤1 vez/na semana) | não/sim |
| INSAN | SAN/INSAN (leve, moderada, ou severa) |
| BMI | variável contínua |
| Circunferência da Cintura | variável contínua |
| Cortisol sérico | variável contínua |

11. APÊNDICE 3

Questionário para a avaliação socioeconômica, estilo de vida e de saúde.

Cadastro SUS

Código: |_|_|_|_|_|_|_|_|

| Cadastro Individual | |
|---|---|
| Identificação do usuário/Cidadão | |
| Nome completo: _____ | |
| Número do cartão SUS: _____ | Data de nascimento: ____/____/____ |
| Sexo: <input type="checkbox"/> Masculino <input type="checkbox"/> Feminino | Raça: <input type="checkbox"/> Branca <input type="checkbox"/> Preta <input type="checkbox"/> Parda <input type="checkbox"/> Amarela <input type="checkbox"/> Indígena |
| Informações sociodemográficas | |
| Situação Conjugal: <input type="checkbox"/> Solteiro <input type="checkbox"/> Casado(a) <input type="checkbox"/> Divorciado/ Separado <input type="checkbox"/> Viúvo (a) <input type="checkbox"/> Outra | |
| Ocupação: _____ | |
| Escolaridade: | |
| <input type="checkbox"/> Creche | <input type="checkbox"/> Ensino Fundamental EJA (5ª-8ª) |
| <input type="checkbox"/> Pré escola | <input type="checkbox"/> Ensino Médio |
| <input type="checkbox"/> Classe Alfabetizada | <input type="checkbox"/> Ensino Médio especial |
| <input type="checkbox"/> Ensino Fundamental 1ª-4ª séries | <input type="checkbox"/> Ensino Médio EJA |
| <input type="checkbox"/> Ensino Fundamental 5ª-8ª séries | <input type="checkbox"/> Superior, Aperfeiçoamento, Especialização, Mestrado |
| <input type="checkbox"/> Ensino Fundamental Completo | Doutorado |
| <input type="checkbox"/> Ensino Fundamental especial | <input type="checkbox"/> Alfabetização Para Adultos |
| <input type="checkbox"/> Ensino Fundamental EJA (1ª-4ª) | <input type="checkbox"/> Nenhum |
| Situação no mercado de trabalho: | |
| <input type="checkbox"/> Empregador | <input type="checkbox"/> Aposentado/Pensionista |
| <input type="checkbox"/> Assalariado com carteira de trabalho | <input type="checkbox"/> Desempregado |
| <input type="checkbox"/> Assalariado sem carteira de trabalho | <input type="checkbox"/> Não trabalha |
| <input type="checkbox"/> Autônomo com previdência social | <input type="checkbox"/> Outro |
| <input type="checkbox"/> Autônomo sem previdência social | |
| Possui deficiência? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não | |
| Se sim, qual? | |
| <input type="checkbox"/> Auditiva | <input type="checkbox"/> Física |
| <input type="checkbox"/> Visual | <input type="checkbox"/> Outra |
| <input type="checkbox"/> Intelectual/ Cognitiva | |
| Cadastro Domiciliar | |
| Endereço/ Telefone para contato | |
| Tipo de Logradouro: _____ | |
| Nome do logradouro: _____ | Nº e complemento: _____ |
| Bairro: _____ | Telefone: _____ |
| Condições de Moradia | |
| Situação de moradia/Posse de terra: | |
| <input type="checkbox"/> Próprio | <input type="checkbox"/> Cedido |

| | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> Financiado | <input type="checkbox"/> Ocupação |
| <input type="checkbox"/> Alugado | <input type="checkbox"/> Situação de Rua |
| <input type="checkbox"/> Arrendado | <input type="checkbox"/> Outra |
| Localização: <input type="checkbox"/> Rural <input type="checkbox"/> Urbana | |
| Em caso de Produção Rural: Condição de Posse e Uso de Terra | |
| <input type="checkbox"/> Proprietário | <input type="checkbox"/> Arrendatário (a) |
| <input type="checkbox"/> Parceiro/ Meeiro | <input type="checkbox"/> Comodatário (a) |
| <input type="checkbox"/> Assentado(a) | <input type="checkbox"/> Beneficiário (a) do banco da terra |
| <input type="checkbox"/> Posseiro | <input type="checkbox"/> Não se aplica |
| Abastecimento da água: | |
| <input type="checkbox"/> Rede encanada até o domicílio | <input type="checkbox"/> Carro Pipa |
| <input type="checkbox"/> Poço/Nascente do domicílio | <input type="checkbox"/> Outro |
| <input type="checkbox"/> Cisterna | |
| Forma de escoamento do banheiro ou sanitário: | |
| <input type="checkbox"/> Rede coletora de esgoto ou Pluvial | <input type="checkbox"/> Direto para o Rio, Lago ou mar |
| <input type="checkbox"/> Fossa séptica | <input type="checkbox"/> Céu aberto |
| <input type="checkbox"/> Fossa rudimentar | <input type="checkbox"/> Outra forma |

| QUESTIONÁRIO | | Código: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> | |
|------------------------------|---|--|---|
| Data: | | | |
| Entrevistador: | | | |
| MÓDULO 1: INFORMAÇÕES GERAIS | | | |
| 1 | Nome: | Idade: _____ | |
| 2 | Telefone: | CEL: _____ | _____ |
| 3 | Possui filhos? | (<input type="checkbox"/>) sim | (<input type="checkbox"/>) não |
| 4 | | Quantos filhos? _____ | |
| 5 | Renda pessoal (mês anterior): ou em salários mínimos | R\$ _____ <input type="checkbox"/> Sem rendimento | <input type="checkbox"/> Entre 1 e 3 SM <input type="checkbox"/> Mais de 5 SM <input type="checkbox"/> Entre 3 e 5 SM |
| 6 | Renda familiar (mês anterior) (toda família): ou em salários mínimos | R\$ _____ <input type="checkbox"/> Sem rendimento | <input type="checkbox"/> Entre 1 e 3 SM <input type="checkbox"/> Mais de 5 SM <input type="checkbox"/> Entre 3 e 5 SM <input type="checkbox"/> Até 1 salário mínimo (SM) |
| MÓDULO 2: CONDIÇÕES DE SAÚDE | | | |
| 1 | Fuma (cigarro, charuto, etc.)? | <input type="checkbox"/> Nunca fumou (pule para Q3) <input type="checkbox"/> Já fumou e não fuma atualmente <input type="checkbox"/> Fuma atualmente Quantos cigarros por dia? _____ | |
| 2 | Qual o tipo de cigarro? | _____ | |
| 3 | Você consome bebidas alcoólicas? | <input type="checkbox"/> Nunca bebeu (pule para Q7) <input type="checkbox"/> Já bebeu no passado e atualmente não bebe | |

| | | | |
|---|--|---|--|
| | | <input type="checkbox"/> Bebe atualmente | |
| 4 | Quantas doses (1 copo americano cheio) por semana? | <input type="checkbox"/> Até 2 doses <input type="checkbox"/> Entre 2 e 7 doses <input type="checkbox"/> Acima de 7 doses | |
| 5 | No ato de beber, acontece de beber grande quantidade de uma vez só? | () não () sim | |
| 6 | Qual o tipo de bebida alcoólica que você consome com maior frequência? | <input type="checkbox"/> Cerveja <input type="checkbox"/> Cachaça <input type="checkbox"/> Vinho | <input type="checkbox"/> Destilados em geral <input type="checkbox"/> Outras: _____ |
| 7 | Quais sintomas você tem apresentado? | <input type="checkbox"/> Irritação ocular <input type="checkbox"/> Queimaduras na pele <input type="checkbox"/> Náuseas/ânsia de vômito <input type="checkbox"/> Catarro <input type="checkbox"/> Dor abdominal <input type="checkbox"/> Diarreia <input type="checkbox"/> Digestão difícil <input type="checkbox"/> Chiado/sibilos () estresse () ansiedade | <input type="checkbox"/> L acrim eja mento <input type="checkbox"/> Dor de cabeça <input type="checkbox"/> Tonturas /Vertigens <input type="checkbox"/> Suor excessivo <input type="checkbox"/> T osse ivação <input type="checkbox"/> Agitaçã o/irritabili da de <input type="checkbox"/> Falta de ar/dispneia <input type="checkbox"/> Formig amento <input type="checkbox"/> Visão turva <input type="checkbox"/> Palpitaç ão cardíaca <input type="checkbox"/> T remo res <input type="checkbox"/> Câi mbras <input type="checkbox"/> Dor no corpo (musculatura) () fraque za <input type="checkbox"/> V ômito s <input type="checkbox"/> Dor articulações () falta de memória () dor no peito |
| 8 | Você tem alguma dessas doenças? | <input type="checkbox"/> Leões na pele/Alergia <input type="checkbox"/> Asma <input type="checkbox"/> Inflamações gástricas <input type="checkbox"/> Doenças hepáticas <input type="checkbox"/> Hipertensão arterial <input type="checkbox"/> Infertilidade () hipotireoidismo | <input type="checkbox"/> H epatit e <input type="checkbox"/> Doenças ósseas <input type="checkbox"/> Doenças renais <input type="checkbox"/> Doença respiratória <input type="checkbox"/> Déficit de atenção <input type="checkbox"/> Abortam entos () obesidade <input type="checkbox"/> De pressã o <input type="checkbox"/> Doenç as cardiovasc ulares <input type="checkbox"/> Câ ncer <input type="checkbox"/> Hiperat ividade () Déficit de atençã o () hipoglicem ia () diabete s |

| | | | | | | | | | |
|----|--|---|---|---|---|-------------------------|--|--|--|
| | | () hipertireoidismo | () síndrome metabólica | | | | | | |
| | | | () doenças auto-ímmunes | | | | | | |
| 9 | Você faz uso de algum medicamento contínuo? | | | <input type="checkbox"/> NÃO | <input type="checkbox"/> SIM | | | | |
| 10 | Qual(is) medicamento(s) de uso contínuo você faz uso? _____ _____ _____ Tipo de medicamento: | <input type="checkbox"/> Medicamento para dormir | <input type="checkbox"/> Rémedio para coração | <input type="checkbox"/> Rémedio para diabetes | <input type="checkbox"/> Rémedio para pressão arterial | Outros: Quais? _____ | | | |
| 11 | Você faz uso de suplemento de vitamina D? | <input type="checkbox"/> Não | | <input type="checkbox"/> Sim | | | | | |
| 12 | Você faz uso de protetor solar? | <input type="checkbox"/> Diariamente | <input type="checkbox"/> Somente quando exposto ao sol | <input type="checkbox"/> Raramente | <input type="checkbox"/> Não faz uso | | | | |
| 13 | Possui atividade de lazer/ recreação? | () semanal | () quinzenal | () mensal | () não | | | | |
| 14 | Pratica atividade física? | () sim | | () não | | | | | |
| 15 | Pratica atividade física sob exposição solar? | () Mais que 2 horas na semana | () Em média, 2 horas na semana | () Em média, 1 hora na semana | () Em média, 30 minutos na semana | () Não pratica | | | |
| 16 | No trabalho, quantas horas, por dia, você é exposto à luz solar? | () 0 horas | () até 1 hora | () de 1h a 4 horas | () a partir de 5 horas | | | | |
| 17 | No geral, como você avalia a sua saúde? | () muito boa | () boa | () regular | () ruim | () muito ruim | | | |
| 18 | Fez ou faz tratamento com psiquiatra ou teve Internação por problema de saúde mental? | <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não | | | | | | |
| 19 | Usa Plantas medicinais? | <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não | Se sim, Quais? _____ _____ _____ | | | | | |
| 20 | Usa outras práticas integrativas e complementares? | <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não | | | | | | |