



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

**AMANDA SGRANCIO OLINDA**

**ASSOCIAÇÃO ENTRE A METILAÇÃO DO GENE *NR3C1* E A  
SÍNDROME METABÓLICA EM ADULTOS ATENDIDOS PELO SUS**

VITÓRIA, ES

2022

**AMANDA SGRANCIO OLINDA**

**ASSOCIAÇÃO ENTRE A METILAÇÃO DO GENE *NR3C1* E A  
SÍNDROME METABÓLICA EM ADULTOS ATENDIDOS PELO SUS**

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

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

VITÓRIA, ES

2022

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

---

O46a Olinda, Amanda Sgrancio, 1996-  
Associação entre a metilação do gene NR3C1 e a síndrome metabólica em adultos atendidos pelo SUS / Amanda Sgrancio Olinda. - 2022.  
83 f. : il.

Orientadora: Adriana Madeira Alvares da Silva .  
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Epigenética. 2. Biotecnologia. I. , Adriana Madeira Alvares da Silva. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

---

**AMANDA SGRANCIO OLINDA**

**ASSOCIAÇÃO ENTRE A METILAÇÃO DO GENE *NR3C1* E A  
SÍNDROME METABÓLICA EM ADULTOS ATENDIDOS PELO SUS**

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

Apresentada em 01 de agosto de 2022.

**Prof. Dr<sup>a</sup>. Adriana Madeira Alvares da  
Silva**

**Universidade Federal do Espírito Santo  
- UFES**

**Orientadora**

**Prof. Dr<sup>a</sup>. Flávia Vitorino Freitas**

**Universidade Federal do Espírito Santo**

**Prof. Dr<sup>a</sup>. Lídia Maria Rebolho Batista**

**Hospital do Câncer de Barretos**

VITÓRIA, ES

2022

Dedico esse trabalho a minha família e aos meus amigos,  
que sempre me apoiam e acreditam no meu potencial!

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por me guiar e me sustentar em todos os momentos. E por sempre me lembrar que nada nessa vida é por acaso, a vida é feita de propósitos.

À minha família, em especial, aos meus pais, Ana Lúcia e Sebastião, minha tia Cynthia, tio Beto e Maria, por sempre acreditarem em mim e me apoiarem. Aos meus pais, obrigada por abdicar de algumas coisas, para eu alcançar os meus sonhos. E por toda a segurança de sempre ter um lugar pra chamar de lar e para onde voltar.

A minha orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Adriana Madeira pela oportunidade de continuar aprendendo um pouco mais sobre pesquisa científica, em áreas que eu sou fascinada como, biologia molecular e epigenética. Obrigada por compartilhar comigo um pouco do que a Senhora sabe, contribuindo para minha formação profissional e humana.

A banca de avaliação, composta pela Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Flávia Vitorino de Freitas e pela Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Lídia Maria Rebolho Arantes, que aceitou nosso convite para compor a minha banca de defesa do mestrado. Obrigada pelo tempo e dedicação cedidos a este momento e a esta pesquisa. Obrigada por todas as contribuições.

Aos colegas do laboratório e do grupo de pesquisa “*Epigene*”, Aline, Bárbara, Bruna, Carlos, Ester, Ivana, Tamires, Suzanny e Marcelle. Obrigada pelas tardes de estudo sobre epigenética, metilação do DNA, estatística e outros; pelas comemorações e risadas. Com toda certeza ter passado pelo mestrado na presença de vocês, tornou essa caminhada mais leve.

Aos meus amigos da graduação, que atualmente são amigos da vida, Maria, Patrícia, Karla, Guilherme, Ronan, Patrick, Bruno, Sara e Suelane, vocês são incríveis.

Em especial gostaria de agradecer às minhas amigas, Jéssica, Tainara e Isabelle por passarem por essa jornada comigo, compartilhando as alegrias, os surtos e por todo o apoio.

A todos os envolvidos nessa pesquisa, os alunos voluntários e os alunos do Núcleo de Pesquisa em Saúde (NPS), aos agentes comunitários de saúde, à equipe de atenção básica primária do município de Alegre e aos pacientes envolvidos, sem vocês esse trabalho não seria possível.

Ao Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular do Hospital do Câncer de Barretos – SP e aos profissionais que auxiliaram nas análises laboratoriais.

A Universidade Federal do Espírito Santo e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela oportunidade de realizar o meu mestrado e contribuir para minha formação profissional.

A Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa e pelo fomento financeiro deste trabalho.

Por fim, agradeço a todos que tornaram essa caminhada mais leve, alegre e calma.

É com alegria que finalizo essa etapa e com curiosidade aguardo os próximos passos.

Obrigada por tudo!

*“Quando tiver que escolher entre estar certo e ser gentil,  
escolha ser gentil.” (Raquel Jaramillo Palacio)*



## RESUMO

OLINDA, A. S. **Associação entre a metilação do gene *NR3C1* e a síndrome metabólica em adultos atendidos pelo SUS**. 2022. 83f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil.

A síndrome metabólica (SM) se caracteriza por um conjunto de fatores de risco, como excesso de gordura abdominal, baixos níveis de colesterol HDL, triglicerídeos elevados, pressão arterial alta e glicose elevada. Devido a sua complexidade e suas características multifatoriais, além dos fatores ambientais, a genética e a epigenética também podem estar envolvidas no desenvolvimento da síndrome metabólica. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi avaliar os fatores determinantes para SM e os níveis de metilação na região promotora (1F) do gene *NR3C1* e investigar sua relação com a síndrome metabólica, em usuários do sistema único de saúde (SUS) de Alegre – Espírito Santo (ES). Assim, foi realizado um estudo transversal com 353 voluntários atendidos pelo SUS. A coleta de dados foi realizada por meio de um questionário de avaliação socioeconômica, estilo de vida e condições de saúde. Também foram coletados dados antropométricos, medidas de pressão arterial e amostras de sangue para análises bioquímicas e moleculares. O DNA extraído foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR) e em seguida submetido ao pirosequenciamento para determinação do perfil de metilação do gene *NR3C1*. De acordo com a análise multivariada de Poisson com variância robusta os fatores determinantes para síndrome metabólica ( $p < 0,05$ ) foram a gordura corporal, colesterol VLDL e a metilação nas CpGs 6, 8, 10 e 12 do gene *NR3C1*. Além disso, a prevalência de síndrome metabólica na amostra foi de 23,22%. Os dados encontrados nessa pesquisa reforçam o possível envolvimento epigenético do gene *NR3C1* com a síndrome metabólica.

**Palavras-chave:** Epigenética. Síndrome metabólica. Metilação. *NR3C1*. Pirosequenciamento.

## ASSOCIATION BETWEEN *NR3C1* GENE METHYLATION AND METABOLIC SYNDROME IN ADULTS ASSISTED BY SUS

### ABSTRACT

OLINDA, A. S. **Association between *NR3C1* gene methylation and metabolic syndrome in adults assisted by SUS**. 2022. 83f. Dissertation (Master in Biotechnology) - Postgraduation Biotechnological Programme, UFES, Espírito Santo. Brazil.

Metabolic syndrome (MS) is characterized by a set of risk factors, such as excess abdominal fat, low HDL cholesterol levels, high triglycerides, high blood pressure and high glucose. Due to its complexity and multifactorial characteristics, in addition to environmental factors and genetics, epigenetics may also be involved in the development of metabolic syndrome. Therefore, the objective of this study was to evaluate the determining factors of MS and *NR3C1* gene methylation in the promoter region (1F) and to investigate its relationship with SM. Thus, a cross-sectional study was carried out with 353 adult volunteers assisted by SUS. Data collection was carried out using a socioeconomic, lifestyle and, health status questionnaire. Anthropometric data, blood pressure measurements and blood samples were also collected for biochemical and molecular analyses. The extracted DNA was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and then subjected to pyrosequencing to determine the methylation profile of the *NR3C1* gene. According to Poisson's multivariate analysis with robust variance, the determining factors for metabolic syndrome ( $p < 0.05$ ) were body fat, VLDL cholesterol, and methylation in CpGs 6, 8, 10, and 12 of the *NR3C1* gene. In addition, the prevalence of metabolic syndrome in the sample was 23.22%. The data found in this research reinforce the possible epigenetic involvement of the *NR3C1* gene with metabolic syndrome.

**Keywords:** Epigenetics. Metabolic syndrome. Methylation. *NR3C1*. Pyrosequencing.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Conrad Hal Waddington. ....	17
Figura 2: Formação da 5-metilcitosina (5-Mec) pela DNA metiltransferase. ....	19
Figura 3: Localização genômica do gene <i>NR3C1</i> . ....	20
Figura 4: Estrutura do gene <i>NR3C1</i> . ....	20
Figura 5: Sequência CpGs presentes no éxon 1 do gene <i>NR3C1</i> . ....	21
Figura 6: Fórmula do cálculo do tamanho amostral. ....	29

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Pontos de corte para os fatores de risco para síndrome metabólica de acordo com o NCEP-ATP III. ....	32
Tabela 2: Primers e condições para Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação da região de interesse. ....	35
Tabela 3: <i>Sequencing primers</i> utilizados para leitura da sequência da região promotora 1F gene <i>NR3C1</i> , correspondente aos sítios CpGs 40 - 47. ....	37
Tabela 4: Caracterização socioeconômica da amostra de acordo com a síndrome metabólica. ....	39
Tabela 5. Caracterização do estilo de vida da amostra de acordo com a síndrome metabólica. ....	40
Tabela 6: Caracterização do estado nutricional da amostra. ....	41
Tabela 7: Caracterização dos parâmetros bioquímicos da amostra. ....	41
Tabela 8: Caracterização dos fatores de risco relacionados à síndrome metabólica. ....	42
Tabela 9: Perfil de metilação da região 1F do gene <i>NR3C1</i> da amostra. ....	43
Tabela 10: Análise univariada de regressão de Poisson com variância robusta. ....	43
Tabela 11: Análise multivariada de regressão de Poisson com variância robusta, método backward, após ajuste pelo teste de Hosmer & Lemeshow. ....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
CC	Circunferência da cintura
CCENS	Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde
CCS	Centro de Ciências e Saúde
CEP/CCS-UFES	Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Espírito Santo
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CpG	Citosina-fosfato-guanina (do inglês cytosin- phosphate-guanine)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês deoxyribonucleic acid)
EDTA	Etilenodiamino tetra-acético
FAPES	Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo
GC	Gordura corporal
GR	Receptor do glicocorticóide
HAT	Acetiltransferases
HDAC	Histonas desacetilases
HDL-c	Lipoproteína de alta densidade
IDF	Federação Internacional de Diabetes
IMC	Índice de massa corporal

LDL-c	Lipoproteína de baixa densidade
NaCl	Cloreto de sódio
NCEP-ATP III	III Painel de Tratamento de Adultos do Programa Nacional de Educação sobre Colesterol
<i>NR3C1</i>	Receptor nuclear da subfamília 3, grupo C, membro 1
OMS	Organização Mundial da Saúde
PACs	Programa de Agentes Comunitários de Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PPi	Pirofosfato
PPSUS	Programa de Pesquisa para o Sistema Único de Saúde
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês ribonucleic acid)
SISVAN	Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional
SM	Síndrome metabólica
SNPs	Polimorfismos de nucleotídeo único
SSD	Dodecil sulfato de sódio
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre Esclarecido
UBS	Unidade Básica de Saúde
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo
VLDL-c	Lipoproteína de densidade muito baixa

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1	Epigenética .....	17
2.2	Mecanismos epigenéticos .....	18
2.3	Gene do receptor do glicocorticoide: <i>NR3C1</i> .....	20
2.4	Síndrome metabólica .....	22
2.5	Síndrome metabólica e metilação do <i>NR3C1</i> .....	25
3	OBJETIVOS.....	27
3.1	Objetivo geral .....	27
3.2	Objetivos específicos .....	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS .....	28
4.1	Aspectos éticos .....	28
4.2	Casuística .....	28
4.3	Cálculo amostral .....	29
4.4	Avaliação socioeconômica, condições de saúde e estilo de vida .....	30
4.5	Estado nutricional.....	30
4.6	Pressão arterial .....	31
4.7	Síndrome metabólica .....	31
4.8	Coleta de sangue .....	32
4.9	Análises bioquímicas.....	33
4.10	Análises moleculares .....	33
4.11	Análises estatísticas.....	37
5	RESULTADOS .....	39

5.1	Caracterização socioeconômica da amostra estudada.....	39
5.2	Caracterização do estilo de vida da amostra estudada.....	40
5.3	Caracterização do estado nutricional e dos parâmetros bioquímicos da amostra.....	40
5.4	Caracterização dos fatores de risco relacionados à síndrome metabólica...	41
5.5	Avaliação do perfil de metilação da região 1F do gene <i>NR3C1</i> .....	42
5.6	Fatores determinantes para síndrome metabólica.....	43
6	DISCUSSÃO.....	46
7	CONCLUSÃO.....	52



## 1 INTRODUÇÃO

Os primeiros ancestrais humanos, que viveram no período Paleolítico, apresentavam um modo de vida bem diferente do observado atualmente. Para sobreviver eles caçavam e coletavam os alimentos em diferentes regiões, ou seja, tinham uma dieta rica em proteínas e um alto gasto energético, pois eram nômades. Atualmente, o estilo e o modo de vida do homem moderno são outros, a alimentação é baseada em alimentos hipercalóricos e, em seu dia a dia, vivem sob constante estresse e praticam pouca atividade física (GOTTLIEB et al., 2008).

Tudo isso devido ao processo acelerado de globalização. Na tentativa de se adaptar a essa nova realidade, a população mudou drasticamente seus hábitos alimentares e seu estilo de vida. Diante disso, a combinação de uma alimentação desbalanceada, uma rotina estressante e a falta de atividade física são os primeiros passos para o surgimento de doenças crônicas na população (GOTTLIEB et al., 2008; GUALANO; TINUCCI, 2011).

Segundo a Biblioteca Virtual em Saúde (BRASIL, 2017), a síndrome metabólica (SM) é considerada a doença da civilização moderna. Ela se caracteriza como excesso de gordura abdominal, baixa concentração de colesterol HDL (lipoproteína de alta densidade), triglicerídeos elevados, pressão arterial alta e glicose elevada (MONTE et al., 2019; WANG et al., 2020).

Nos últimos anos a síndrome metabólica tem despertado o interesse da comunidade científica (FÉLIX; DA NÓBREGA, 2019), dado que, a combinação dos seus fatores de risco aumentam as chances do indivíduo desenvolver complicações cardiovasculares, acidente vascular cerebral e diabetes mellitus tipo 2 (DMII) (BRASIL, 2017; OLIVEIRA; BOERY, 2018). No Brasil, as doenças cardiovasculares são a principal causa de morte entre os adultos com idade superior a trinta anos (MANSUR; FAVARATO, 2012).

Mesmo sendo alvo de interesse de diversas pesquisas, atualmente ainda é possível notar a dificuldade de se estabelecer uma definição universal para a síndrome metabólica (MONTE et al., 2019). Segundo a I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da síndrome metabólica (2005), existem diferentes definições, como, por exemplo, a definição proposta pela Organização Mundial da Saúde e pelo III Painel

de Tratamento de Adultos do Programa Nacional de Educação sobre Colesterol (NCEP-ATPIII).

Nas pesquisas publicadas nos últimos cinco anos, a definição mais utilizada é a que foi proposta pelo NCEP-ATP III, que propôs que a síndrome metabólica se caracteriza pela combinação de pelo menos três fatores de risco alterados (MONTE et al., 2019). Além da definição dos fatores de risco, outros pontos que tem despertado o interesse da comunidade científica, são a genética e a epigenética, que hoje estão sendo utilizadas para complementar a explicação do aparecimento de certas doenças na população (SAMBLAS; MILAGRO; MARTÍNEZ, 2019).

Existem na literatura, evidências sugestivas de que as condições de saúde, os hábitos e o estilo de vida modulam o genoma humano (SAMBLAS; MILAGRO; MARTÍNEZ, 2019). A forma como o ser humano vive, sua alimentação, suas emoções, qualidade de vida e os cuidados recebidos no início da vida podem deixar marcas em seu DNA (BIRD, 2007).

Essas marcas são explicadas pela epigenética e seus mecanismos, que se caracterizam por modificações químicas na molécula de DNA, sem que ocorram alterações na sequência de nucleotídeos, mas interferem na expressão gênica (BIRD, 2007; DOR; CEDAR, 2018). Um dos mecanismos epigenéticos é a metilação no DNA, que atua desregulando a expressão gênica, contribuindo para o surgimento de doenças mentais, metabólicas e câncer (ARGENTIERI et al., 2017; TANG; HO, 2007).

Diante disso é possível afirmar que, além da hereditariedade, a modulação epigenética desempenha um papel fundamental no desenvolvimento das doenças (TANG; HO, 2007). Neste contexto, alguns estudos iniciaram as investigações sobre a epigenética e à metilação de alguns genes, como o *NR3C1*, como uma possível explicação para alterações metabólicas (ARGENTIERI et al., 2017; OLIVEIRA; BOERY, 2018). Entretanto, a literatura continua escassa sobre o assunto.

Portanto, com o intuito de contribuir com as pesquisas presentes na literatura relacionadas a metilação do DNA com a síndrome metabólica, este trabalho busca verificar se os níveis de metilação na região promotora (1F) do gene *NR3C1* estão associados com a síndrome metabólica.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Epigenética

Conrad Hall Waddington, biólogo desenvolvimentista, em 1956 publicou um artigo na revista *Evolution*, intitulado “*Genetic assimilation of the bithorax phenotype*”. Neste artigo compartilhou pela primeira vez seus pensamentos sobre a herança de uma característica “adquirida” em uma população em resposta a um estímulo ambiental, mencionando pela primeira vez o conceito que hoje conhecemos como epigenética. Por meio deste artigo ficou conhecido como o pai da epigenética (NOBLE, 2015).

**Figura 1:** Conrad Hal Waddington.



Fonte: Nature Reviews, Genetics (2002).

Muitos pesquisadores apresentam diferentes definições para o termo epigenética, no entanto, se tratando da palavra, o prefixo “epi” do grego, significa por cima ou acima de algo, em palavras mais simples podemos dizer que o termo epigenética se refere às marcas que se localizam sobre a molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA) (HENRIQUE; BRAUN PRADO, 2008).

Além da definição proposta por Conrad Hall Waddington, outros pesquisadores formularam algumas definições, como, por exemplo, Arthur Riggs e colaboradores (1996) no livro “*Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation*” que definiram epigenética como o estudo de mudanças que podem ser herdadas pela mitose e

meiose e que não podem ser explicadas por alterações que ocorrem na sequência do DNA (BIRD, 2007).

Outros pesquisadores, como Andrew P. Feinberg, Wan-yee Tang e Shuk-mei Ho, também propuseram definições como a de Arthur Riggs (FEINBERG, 2001; TANG; HO, 2007). Atualmente, a epigenética traz consigo partes da definição elaboradas pelos pesquisadores citados anteriormente, contudo, algumas novidades surgiram.

Diante disso podemos definir a epigenética como um ramo da genética que estuda as alterações que ocorrem na molécula de DNA, que podem ou não ser herdadas, e que não estão associadas a alterações na sequência de nucleotídeos que compõem a molécula de DNA (BIRD, 2007; DOR; CEDAR, 2018).

No entanto, podem ser explicadas por modificações químicas, como a metilação e modificações de histonas, que interferem diretamente na expressão gênica. Além disso, podemos afirmar que essas modificações químicas podem estar associadas ao nosso estilo de vida, hábitos alimentares, exposição a situações estressantes, e até mesmo à prática de atividades físicas (CAVALLI; HEARD, 2019).

## **2.2 Mecanismos epigenéticos**

Atualmente, na literatura, existem alguns mecanismos epigenéticos conhecidos, como a metilação do DNA, modificação de histonas, regulação por RNAs (ácido ribonucleico) não codificantes e remodelação cromossômica. Esses mecanismos atuam de forma síncrona e podem interferir na expressão gênica (KUEHNER et al., 2019).

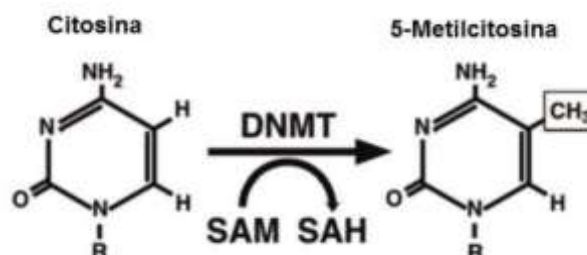
A modificação de histonas e a metilação do DNA são considerados os principais mecanismos epigenéticos. As histonas são as principais proteínas que compõem o nucleossomo, atuam na manutenção da estrutura da cromatina e desempenham um papel fundamental na regulação da expressão gênica. Na literatura encontra-se descrito cinco tipos de histonas: H1, H2A, H2B, H3 e H4 (HULSHOFF et al., 2018; STOLL; WANG; QIU, 2018).

A modificação de histonas pode ocorrer por acetilação, metilação, fosforilação, glicosilação, sumoilação e ribosilação do ADP, cada uma delas desencadeia um efeito diferente na expressão gênica. Dentre essas modificações, as mais frequentes são a acetilação e a metilação de resíduos de lisina no terminal amino da histona H3 (H3) e histona 4 (H4) (BOLLATI; BACCARELLI, 2010). A acetilação das histonas pode ocorrer pelas acetiltransferases (HAT) e podem ser desacetiladas pelas histonas desacetilases (HDAC) (STOLL; WANG; QIU, 2018).

Outro mecanismo epigenético conhecido é a metilação do DNA, que se caracteriza pela adição de um grupo metil na base nitrogenada citosina (STOLL; WANG; QIU, 2018). Geralmente as citosinas que recebem um grupo metil são precedidas de uma base guanina, ou seja, chamado de dinucleotídeo CpG (citosina – fosfato – guanina) (DOR; CEDAR, 2018).

As enzimas responsáveis pela transferência do grupo metil para as bases citosina são conhecidas como DNA metiltransferases (DNMTs) (GREENBERG; BOURC'HIS, 2019). A partir de um metil (CH<sub>3</sub>), doado pela S-adenosilmetionina (SAM), a DNMTs catalisa a reação de transferência de um grupo metil para o carbono da posição 5 da citosina em um contexto onde está presente o dinucleotídeo CpG ou em sequência de polinucleotídeo CGGCGG, também conhecido como ilha CpG, formando um 5-metilcitosina (5-Mec) (DHAR et al., 2021; YOO; JONES, 2006).

**Figura 2:** Formação da 5-metilcitosina (5-Mec) pela DNA metiltransferase.



**Fonte:** WEIDMAN et al., 2007.

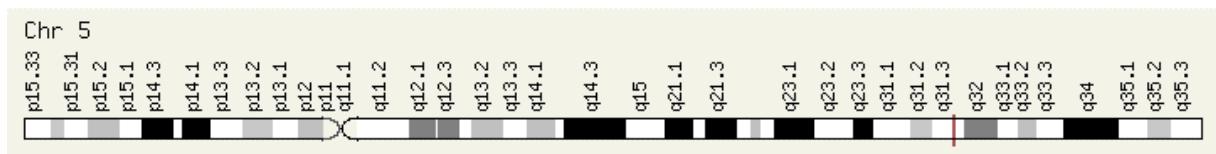
As DNMT3A e DNMT3B, pertencem a família das DNMTs e auxiliam no estabelecimento dos padrões de metilação encontrados em algumas células. Já as TET1, TET2 e TET3 atuam retirando o grupo metil e a DNMT1 e o UHRF1 copiam os padrões de metilação durante o processo de replicação (DOR; CEDAR, 2018).

Além disso, alguns fatores proteicos, como MeCP2, são responsáveis por ler e traduzir os padrões de metilação em informações funcionais. Esse complexo sistema funciona de maneira precisa, adicionando e/ou removendo os grupos metil, e identificando os mesmos. É importante ressaltar que os padrões de metilação variam conforme os genes, as células e organismo, em alguns casos, quando esses padrões se encontram em promotores gênicos podem atuar reprimindo a expressão gênica (DOR; CEDAR, 2018).

### 2.3 Gene do receptor do glicocorticóide: *NR3C1*

Conhecido como receptor do glicocorticóide (GR) humano, o gene pertencente à subfamília de receptores nucleares 3, grupo C, membro 1, o *NR3C1*, localiza-se no cromossomo cinco, no *locus* q31 – q32, e, possui aproximadamente 140.000 pares de bases (DASKALAKIS; YEHUDA, 2014).

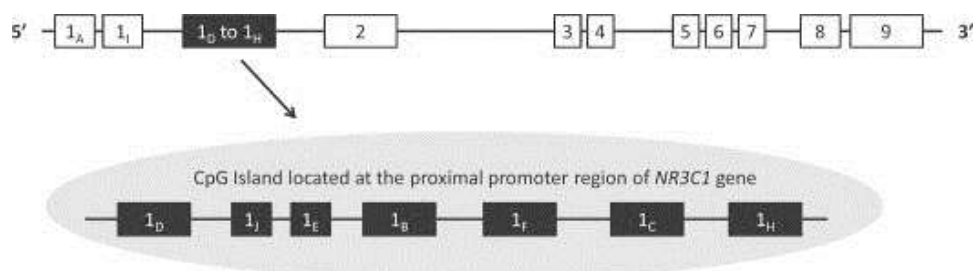
**Figura 3:** Localização genômica do gene *NR3C1*.



Fonte: Ensembl.

Estruturalmente, o gene *NR3C1*, apresenta dezessete éxons, sendo que nove deles são considerados regiões não codificantes, localizados na região promotora do gene (1A – 1H). Dentro dessa região não codificante encontram-se sete éxons (1D – 1H) localizados na mesma ilha CpG. Além disso, o gene possui oito regiões codificantes (2 a 9) (Figura 4) (PALMA-GUDIÉL et al., 2015).

**Figura 4:** Estrutura do gene *NR3C1*.

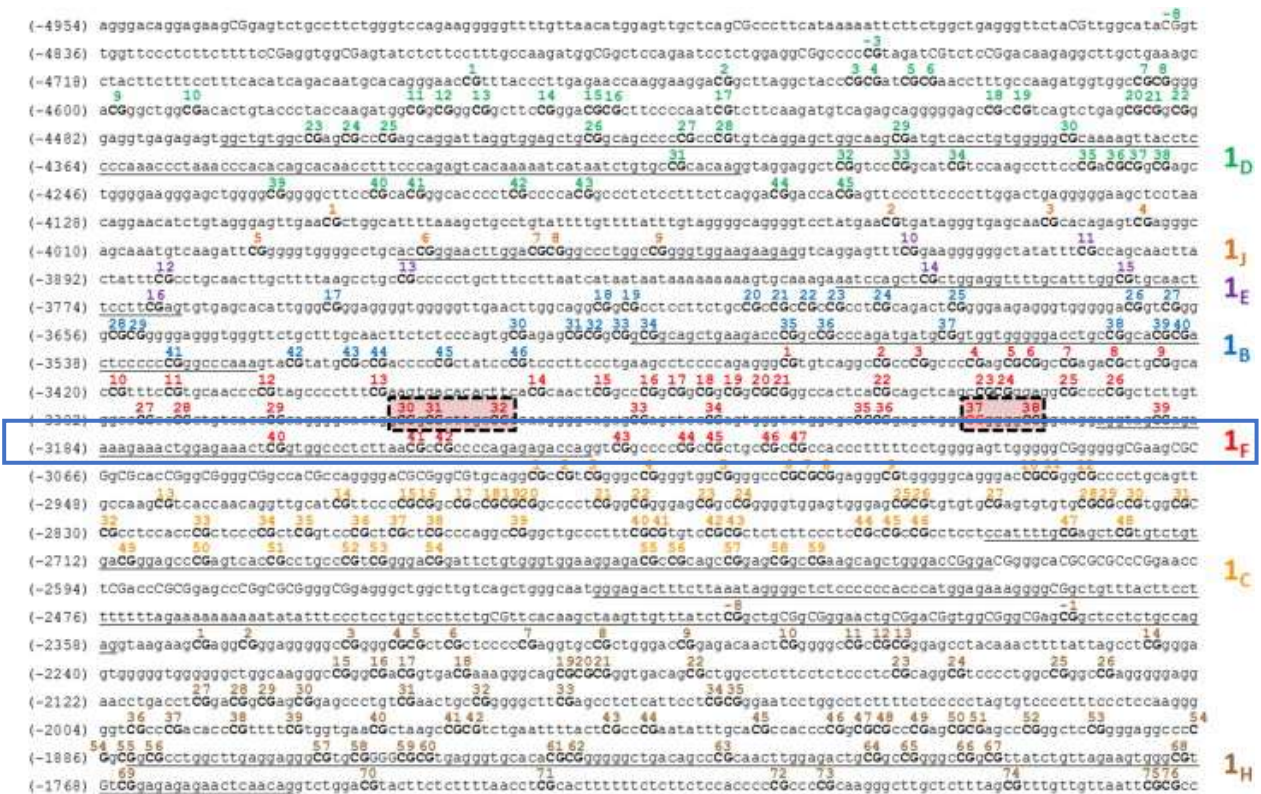


**Fig.4.** O gene *NR3C1* apresenta dezessete éxons, nove deles são considerados regiões não codificantes (1A – 1H). Dentro dessa região não codificantes encontram-se sete éxons (1D – 1H) localizados na mesma ilha CpG.

Além disso, o gene possui oito regiões codificantes (2 a 9) (PALMA-GUDIEL et al., 2015).

É importante ressaltar que a variabilidade (1D – 1H) presente no primeiro éxon não afeta o processo de síntese de proteínas, visto que o códon iniciador está localizado no éxon 2. No entanto, essa região é rica em dinucleotídeos CpG, formando uma ilha CpG, sendo este um local de atuação de um mecanismo epigenético, a metilação. Nesta mesma ilha CpG do gene *NR3C1* é possível observar a sequência de nucleotídeos onde o fator de transcrição NGFI-A se liga (Figura 5) (DASKALAKIS; YEHUDA, 2014; PALMA-GUDIEL et al., 2015).

**Figura 5:** Sequência CpGs presentes no éxon 1 do gene *NR3C1*.



**Fig. 5.** As CpGs estão numeradas de acordo com o estudo realizado por Palma-Gudiel e colaboradores (2015) está de acordo com os artigos revisados. A região 1F destaca com uma caixa de cor azul e fundo transparente delimita as CpG abordadas nesta pesquisa, e são amplamente relatadas na literatura em estudos com animais e humanos. As caixas tracejadas delineiam as regiões de ligação de NGFI-A (PALMA-GUDIEL et al., 2015).

O gene *NR3C1* codifica o receptor do glicocorticóide que se liga ao cortisol, conhecido como o hormônio do estresse. Este receptor pode atuar de duas maneiras: (i) como um fator de transcrição ou (ii) como um regulador de outros fatores de transcrição.

Diante disso, a relação existente entre o receptor do glicocorticóide e o cortisol, e os padrões de metilação nas ilhas CpGs desse gene, tornaram-se foco de pesquisa de inúmeros cientistas, dado que a metilação nessa região está diretamente relacionada a alterações que ocorrem no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (WADJI et al., 2021).

O eixo HPA é considerado o principal sistema neuroendócrino que consegue controlar os níveis de glicocorticóide no organismo como, por exemplo, o cortisol, e também media a reatividade ao estresse. Esse eixo se caracteriza por uma série de vias de *feedback* bioquímico entre o hipotálamo, a hipófise e a glândula adrenal (ARGENTIERI et al., 2017).

Além disso, o eixo HPA é responsável por controlar muitos processos fisiológicos relacionados ao sistema imunológico, cognitivo e sistema metabólico. Diante disso, a desregulação do mesmo, principalmente pelos efeitos do estresse crônico, pode aumentar o risco de diversas doenças, como doenças mentais e metabólicas (ARGENTIERI et al., 2017).

#### **2.4 Síndrome metabólica**

A síndrome metabólica (SM) se caracteriza por um conjunto de fatores de risco, como excesso de gordura abdominal, baixo HDL (lipoproteína de alta densidade), triglicerídeos elevados, pressão arterial alta e glicose elevada. A combinação desses fatores pode aumentar as chances de o indivíduo desenvolver doenças cardiovasculares, derrames e diabetes (BRASIL, 2017).

Segundo a Biblioteca Virtual em Saúde (BRASIL, 2017) os pontos de cortes para os fatores de risco, como triglicerídeos, pressão arterial e glicose, são os mesmos para os homens e para as mulheres. Para a taxa de triglicerídeos ser considerada elevada deve ser igual ou superior a 150 mg/dL; a glicose igual ou superior a 110 mg/dL e a pressão arterial alterada igual ou superior a 135/85 mmHg.

Em relação aos fatores de risco, como a circunferência da cintura e o colesterol HDL, os valores diferem entre homens e mulheres. Para os homens, o acúmulo de gordura abdominal deve ser superior a 102 cm e, para as mulheres, maiores que 88 cm. Já



para a taxa de colesterol HDL, os valores para os homens são inferiores a 40 mg/dL e para as mulheres menores que 50 mg/dL (BRASIL, 2017).

Atualmente a síndrome metabólica é considerada a doença da civilização moderna, visto que o estilo de vida e os hábitos alimentares da população mudam de maneira acelerada na tentativa de acompanhar o desenvolvimento econômico. Diante desse cenário, a população adotou um estilo de vida mais sedentário e uma alimentação baseada em dietas hipercalóricas, sendo que essa combinação favorece o adocimento precoce da população (RAMIRES et al., 2018; WANG et al., 2020).

Diante disso, a síndrome metabólica é alvo de estudo de muitas pesquisas. Segundo a I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica (BRASIL, 2005), ainda não há um consenso quanto à sua definição e os pontos de corte para cada fator de risco que classifica os indivíduos como portador ou não de síndrome metabólica.

Entre as definições para síndrome metabólica, as mais utilizadas pela comunidade científica são as da Organização Mundial da Saúde (OMS), da Federação Internacional de Diabetes (IDF) e do III Painel de Tratamento de Adultos do Programa Nacional de Educação sobre Colesterol (NCEP-ATPIII) (PENALVA, 2008).

Em 1999, a OMS propôs pela primeira vez o critério diagnóstico para síndrome metabólica, que consistia na avaliação da resistência à insulina ou presença de diabetes mellitus tipo II (DMII) e na determinação do índice de massa corporal (IMC), com o intuito de avaliar a obesidade e as dislipidemias. Já a IDF (2005) propôs que a obesidade central, medida pela circunferência da cintura, seria um critério obrigatório. E o diagnóstico seria dado usando como critério a obesidade e mais dois fatores de risco (DO MONTE et al., 2019).

No ano de 2001, nos Estados Unidos, o NCEP-ATP III propôs uma nova definição para síndrome metabólica, onde excluía a obrigatoriedade do paciente apresentar DMII, no entanto, o critério seria ter a ocorrência de pelo menos três, dos cinco fatores de risco (triglicerídeos, glicose, colesterol HDL, pressão arterial e gordura abdominal) indicados para síndrome metabólica (DO MONTE et al., 2019).

O NCEP-ATP III é o critério mais utilizado na prática clínica e em estudos epidemiológicos, diante disso, diversos estudos sobre a prevalência de síndrome metabólica em diferentes populações foram publicados na literatura. Entre os anos de 2003 a 2012, a prevalência de síndrome metabólica na população geral dos Estados Unidos foi de 33% (AGUILAR et al., 2015).

Outra pesquisa realizada na China (n= 7488) utilizou como base, os dados publicados pela “Pesquisas de Saúde e Nutrição da China (CHNS)” no ano de 2009 para relatar a prevalência de síndrome metabólica na comunidade chinesa. Utilizando os critérios estabelecidos pelo NCEP-ATP III, eles concluíram que a prevalência de síndrome metabólica padronizada por idade corresponde a 21,3% na população chinesa (XI et al., 2013).

No Brasil, um estudo realizado com base nos dados publicados pela Pesquisa Nacional de Saúde (PNS) conclui que a prevalência de síndrome metabólica na população adulta brasileira foi de 38,4% (OLIVEIRA et al., 2020). Outra pesquisa utilizando como base uma adaptação do NCEP-III foi realizada na região nordeste do Brasil. Nesta pesquisa 714 indivíduos foram selecionados aleatoriamente para participar de um estudo transversal e, nessa amostra, a prevalência de síndrome metabólica foi de 29,5% (DO VALE MOREIRA et al., 2020).

Já na região Sudeste, no estado do Espírito Santo, na cidade de Vitória, outro estudo transversal foi realizado com 1.663 indivíduos e a prevalência de síndrome metabólica foi de 29,8%, de acordo com os critérios do NCEP-ATP III (SALAROLI et al., 2007). Diante desses números é possível concluir que a síndrome metabólica apresenta proporções globais sendo considerada um grande problema de saúde pública (WANG et al., 2020).

Alguns estudos chegaram a afirmar que a síndrome metabólica está associada a um risco aumentado do indivíduo em desenvolver complicações cardiovasculares, além de aumentar em cinco vezes o risco de desenvolver um quadro de DMII (WANG et al., 2020). Vale ressaltar que as doenças cardiovasculares são responsáveis por 20% de todas as mortes em indivíduos acima de trinta anos no Brasil, considerada a principal causa de morte entre homens e mulheres brasileiras (MANSUR; FAVARATO, 2012).

Em sua grande maioria o diagnóstico de síndrome metabólica ocorre tardiamente, visto que os pacientes apresentam primeiro outras complicações como o diabetes, pressão arterial alterada, obesidade, entre outros. Por isso, ainda não há um diagnóstico preciso estabelecido, no entanto, é indiscutível que ter uma rotina onde a prática de atividades físicas e alimentação saudável estejam presentes, contribui para o não aparecimento do quadro de síndrome metabólica e, conseqüentemente, previne o surgimento de doenças cardiovasculares e outras complicações (PENALVA, 2008).

## **2.5 Síndrome metabólica e metilação do *NR3C1***

Mesmo havendo um consenso entre quais são os fatores de risco para o desenvolvimento de síndrome metabólica, ainda é possível notar a complexidade de cada um desses fatores. Diante disso, os fatores ambientais e genéticos, são importantes para o entendimento sobre as interações que ocorrem entre os fatores de risco (OLIVEIRA; BOERY, 2018).

Existem pesquisas na literatura que abordam sobre algumas evidências interessantes como, por exemplo, dois grupos de indivíduos foram expostos aos mesmos fatores ambientais, no entanto, alguns indivíduos desenvolvem um quadro de obesidade na vida adulta e outros não. Diante disso, utilizar fatores isolados, como a alimentação dos mesmos, não é suficiente para explicar o ocorrido, por isso é possível inserir a participação da genética e da epigenética neste contexto (SAMBLAS; MILAGRO; MARTÍNEZ, 2019).

É de conhecimento de todos que os fatores ambientais podem interferir nas marcas deixadas no DNA das pessoas. Por exemplo, uma pesquisa concluiu que os padrões alimentares durante a gestação podem ocasionar metilações no DNA, e essas marcas estão associadas a predisposição à obesidade na vida adulta (PALMA-GUDIÉL et al., 2015; STOLL; WANG; QIU, 2018).

O gene *NR3C1*, assim como outros genes, podem ser modulados por fatores externos, como o estilo e hábito de vida, a alimentação e a exposição a condições estressantes, desta forma a sua regulação epigenética promove efeitos no metabolismo humano (LESSEUR; CHEN, 2018). Diante disso, a metilação no DNA poderá ser utilizada como uma ferramenta para predição e diagnóstico da síndrome

metabólica em um futuro próximo mas, para que isso ocorra, alguns estudos precisam ser realizados (SAMBLAS; MILAGRO; MARTÍNEZ, 2019).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 3.1 Objetivo geral**

Avaliar os níveis de metilação na região promotora (1F) do gene *NR3C1* e investigar a sua relação com a síndrome metabólica, em usuários do sistema único de saúde (SUS) de Alegre, ES.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Caracterizar o perfil socioeconômico da amostra estudada segundo a síndrome metabólica;
- Avaliar o estilo de vida, estado nutricional e parâmetros bioquímicos em relação à síndrome metabólica;
- Verificar os fatores determinantes para síndrome metabólica na amostra estudada;
- Verificar se há associação entre os níveis de metilação na região promotora (1F) do gene *NR3C1* em todas as CpGs estudadas com a síndrome metabólica.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Aspectos éticos**

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP), do Centro de Ciências da Saúde (CCS), da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), sob parecer 1.574.160/2016 e 3.420.734/2019 (Anexo 1 e 2). Vale ressaltar que essa dissertação integra o projeto de pesquisa 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 glicocorticóide (GR) e avaliação de hipovitaminose D na população da região do Caparaó Capixaba”. Projeto este submetido e aprovado no edital FAPES/CNPq Nº 05/2015 – PPSUS.

### **4.2 Casuística**

Por meio de reuniões expositivas o projeto “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 glicocorticóide (GR) e avaliação de hipovitaminose D na população da região do Caparaó Capixaba” foi apresentado à Secretária Municipal de Saúde de Alegre, ES. Após a apresentação do projeto foi firmada parceria, por carta de apoio, com a coordenação de todas as Unidades Básicas de Saúde (UBS) e com o Programa de Agentes Comunitários de Saúde (PACS) do município de Alegre, ES, para a realização do estudo.

Inicialmente, o cadastro de todas as famílias assistidas pela Rede de Atenção Básica do SUS de Alegre, foi utilizado para a seleção dos entrevistados, estes foram recrutados pelos Agentes Comunitários de Saúde (ACS) de cada UBS. Os entrevistados que se voluntariaram assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 2), conforme a Resolução nº 466/12, do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

Diante disso, realizou-se um estudo de caráter transversal com os entrevistados selecionados. Foram adotados como critérios de inclusão: possuir faixa etária entre 20 e 59 anos, possuir condições cognitivas para responder os questionários, apresentar medidas de gordura abdominal, colesterol HDL, triglicerídeos, pressão

arterial e glicose. Após análise de consistência do banco de dados, foram excluídos da amostra os indivíduos que tiveram os seguintes dados faltantes: gordura abdominal, colesterol HDL, triglicérides, pressão arterial e glicose.

Por último, a coleta de dados ocorreu nas UBSs por meio de uma entrevista individual, onde foi aplicado um questionário de avaliação socioeconômica, condições de saúde e estilo de vida (Apêndice 1). Além disso, foram realizadas as medidas antropométricas, medidas de pressão arterial e coleta de sangue para as análises bioquímicas e para a extração de DNA.

### 4.3 Cálculo amostral

O cálculo do tamanho da amostra foi realizado no programa OpenEpi, versão 3.1, atualizado em 06/04/2013, sendo as estatísticas elaboradas por Kevin M. Sullivan, da Universidade Emory, baseado no código de John C. Pezzullo e a interface criada por Andrew G. Dean, da EpiInformatcs.com e Roger A. Mir (DEAN, 2013).

O programa utiliza a fórmula apresentada na figura abaixo (Figura 2), onde  $n$  é considerado o tamanho da amostra;  $deff$  o efeito de desenho;  $N$  o tamanho da população;  $p$  a proporção estimada do evento;  $q = 1 - p$  e  $d$  a precisão absoluta desejada.

**Figura 6:** Fórmula do cálculo do tamanho amostral.

$$n = deff \times \frac{N\hat{p}\hat{q}}{\frac{d^2}{1.96^2}(N-1) + \hat{p}\hat{q}}$$

Fonte: Dean (2013).

Assumiu-se precisão absoluta de 5%, intervalo de confiança de 95% e efeito de desenho 1 para amostras aleatórias. Para o tamanho da população foi utilizado como base o cadastro e-SUS do município de Alegre, ES. O e-SUS forneceu um total de 10.222 indivíduos com idade entre 20 e 59 anos, sendo esse número correspondente à população adulta do município que era atendida pela Rede de Atenção Básica em Saúde.

Tanto as UBSs quanto às PACs foram incluídas com probabilidade igual a 1. Para a proporção estimada assumiu-se como referência a prevalência de síndrome metabólica no Espírito Santo foi de 29,8%, de acordo com os critérios do NCEP-ATP III (SALAROLI et al., 2007)). Por fim, a amostra estimada foi de 312 indivíduos. Considerando 10% de perdas, a amostra estimada foi de 344 indivíduos.

#### **4.4 Avaliação socioeconômica, condições de saúde e estilo de vida**

A coleta de dados socioeconômicos, condições de saúde e de estilo de vida foi realizada através de um questionário individual. Além das informações gerais a respeito de cada participante, o questionário foi dividido em dois módulos: informações gerais (módulo 1) e condições de saúde (módulo 2) (Apêndice 1).

O módulo 1 apresentava perguntas relacionadas ao gênero, faixa etária, escolaridade, localização, situação conjugal, situação de trabalho, se tinha ou não filhos e renda familiar. A variável renda familiar foi categorizada utilizando o estudo de Neri (2008) como referência, onde uma família é classificada como baixa renda, quando uma renda per capita/dia inferior a \$5 (cinco dólares americanos).

A partir das informações coletadas no módulo 1 foi possível traçar o perfil socioeconômico da amostra. Em relação ao módulo 2, o questionário incluiu perguntas relacionadas à prática de atividade física, atividade de lazer, consumo de álcool e hábitos tabagistas.

#### **4.5 Estado nutricional**

Os dados referentes às medidas antropométricas como altura, peso, circunferência da cintura (CC), gordura corporal (GC) foram coletadas no período da manhã, entre 7 e 8 horas, por profissionais qualificados, após jejum mínimo de oito horas, de acordo com as normas técnicas do Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional (SISVAN, 2011).

Para a medição da altura foi utilizado o estadiômetro Altorexata® (com capacidade máxima de 2,10 metros). Os indivíduos foram orientados a ficar descalços, em posição ereta e com os braços esticados ao longo do tronco, com a cabeça alinhada a postura, mantendo o olhar em um ponto fixo (BRASIL, 2011).



O peso foi aferido em uma balança de bioimpedância bipolar Tanita®, com monitor de gordura corporal acoplado da marca BC601®, com capacidade mínima de 100 g e máxima de 150 kg. Além disso, os pacientes foram orientados a utilizarem o mínimo de roupa possível, retirar os sapatos, se posicionar de forma ereta, de modo que os pés estivessem em contato com a parte metálica da balança e os braços estendidos ao redor do corpo (SISVAN, 2011).

O percentual de gordura corporal foi classificado de acordo com faixa etária e o gênero, com base no manual da balança. A circunferência da cintura foi mensurada com o auxílio de uma fita antropométrica inextensível, tendo como ponto de referência o ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca (LOHMAN et al, 1988). Os pontos de corte para normal e alterado foram  $< 88$  cm e  $\geq 88$  cm, respectivamente.

O índice de massa corporal (IMC) foi calculado e classificado conforme os valores referências da Organização Mundial da Saúde (2000) em que indivíduos com  $IMC < 18,5$  é considerado baixo peso, entre  $\geq 18,5$  e  $< 25$  são classificados como peso adequado,  $\geq 25$  e  $< 30$  sobre peso, e  $> 30$  como obeso.

#### **4.6 Pressão arterial**

As medidas de pressão arterial foram obtidas através de um esfigmomanômetro aneróide, modelo G-TECH® Premium. Tanto a técnica utilizada para a medida da pressão arterial como a classificação da mesma, foram realizadas de acordo com a VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão da Sociedade Brasileira de Cardiologia, onde considerou o valor de  $\geq 130/85$  mmHg para indivíduos com idade superior a 18 anos como pressão arterial alterada (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010).

#### **4.7 Síndrome metabólica**

De acordo com o III Painel de Tratamento de Adultos do Programa Nacional de Educação sobre Colesterol, para um indivíduo ser classificado com síndrome metabólica é necessário a combinação de três ou mais fatores de risco alterados para essa condição. Os fatores de risco e os valores de referências estão representados na tabela abaixo.

**Tabela 1:** Pontos de corte para os fatores de risco para síndrome metabólica de acordo com o NCEP-ATP III.

Fatores de risco para síndrome metabólica (NCEP-ATP III)	
Fatores de risco	Níveis
Circunferência da cintura	
Homens	> 102 cm
Mulheres	> 88 cm
Colesterol HDL	
Homens	< 40 mg/dL
Mulheres	< 50 mg/dL
Triglicérides	≥ 150 mg/dL
Pressão arterial	≥ 130 mmHg ou ≥ 85 mmHg
Glicemia	≥ 110 mg/dL

Fonte: I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento de Síndrome Metabólica (2005).

Para a circunferência da cintura o ponto de corte para os homens foi > 102 cm, e para as mulheres > 88 cm. Para o colesterol HDL para os homens foi de < 40 mg/dL, para as mulheres < 50 mg/dL. Em relação a pressão arterial o ponto de corte foi ≥ 130 mmHg ou ≥ 85 mmHg para ambos. Para os fatores de risco triglicérides e glicemia os pontos de corte foram ≥ 150 mg/dL e ≥ 110 mg/dL, respectivamente. O paciente foi considerado com síndrome metabólica quando apresentação a combinação de três ou mais fatores de risco.

#### 4.8 Coleta de sangue

A coleta de sangue foi realizada por profissionais habilitados e em local apropriado nas UBSs. O período de coleta ocorreu entre às 7 e 8 horas da manhã. Todos os pacientes foram orientados a fazer jejum mínimo de 8 horas. Utilizando seringas descartáveis foram coletados 10 mL de sangue por punção venosa.

Desse total, 3 mL de sangue foram transferidos para tubos com gel separador de soro com anticoagulante EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) para a realização das análises bioquímicas e moleculares. Todos os tubos com anticoagulante EDTA foram homogeneizados de 5 a 8 vezes e mantidos refrigerados.

Todas as análises foram realizadas nos Laboratórios de Análises Clínicas e Biotecnologia do Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (CCENS/UFES).

#### **4.9 Análises bioquímicas**

Os parâmetros bioquímicos como colesterol total, LDL-c, HDL-c, VLDL-c e triglicerídeos foram analisados por colorimetria enzimática, utilizando um analisador bioquímico automatizado (Bioclin®) e kits colorimétricos específicos. Todas as análises dos parâmetros bioquímicos foram realizadas no Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

#### **4.10 Análises moleculares**

##### **4.10.1 Extração e quantificação do DNA genômico**

O DNA genômico foi extraído a partir de uma alíquota de 500 µL de sangue total, retirada do tubo com anticoagulante EDTA. O método utilizado para extração foi o Salting-Out com precipitação salina (SALAZAR *et al.*, 1998). A alíquota de 500 µL foi depositada em um tubo do tipo *ependorf*, nesse tubo foi adicionado 1,5 mL de tampão de lise de células sanguíneas. O tampão de lise apresentava em sua composição: cloreto de amônio, carbonato ácido de potássio e EDTA.

Logo em seguida o conteúdo do tubo foi homogeneizado por inversão, e transferido para o gelo, onde permaneceu por 30 minutos, etapa importante para a obtenção da lise dos glóbulos vermelhos. Em seguida, centrifugou-se por 15 min a 3100 rpm a 4 °C, o sobrenadante foi descartado. Essa etapa foi repetida até que um *pellet* de cor esbranquiçada fosse observado.

O *pellet* foi ressuspendido com 300 µL de tampão de lise nuclear (composição: Tris-HCl, NaCl, EDTA; concentração: 1x) e levado ao vórtex por 30 segundos. A esse conteúdo adicionou-se 1 µL de proteinase K (20mg/mL) e misturou-se cuidadosamente. A seguir foi adicionado ao tubo 30 µL de dodecil sulfato de sódio (SSD) a 10% e misturou-se cuidadosamente até que fosse possível observar a formação de uma solução viscosa. Incubou-se por 12 horas a 37 °C.

Após a incubação foi adicionado ao tubo 160  $\mu\text{L}$  de cloreto de sódio (NaCl) (concentração: 5 mol) e 140  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-EDTA (TE) e misturou-se vigorosamente por 30 segundos com o auxílio do vórtex. Logo em seguida, o tubo permaneceu no gelo por 10 minutos. Em seguida, centrifugou-se por 15 min a 16000 xg a 4 °C. O sobrenadante, proveniente da centrifugação, foi transferido para um novo tubo, e a ele foram adicionados 2 volumes (mesmo volume do sobrenadante) de etanol absoluto, em temperatura ambiente.

O conteúdo do novo tubo foi centrifugado por 10 min a 10000 rpm. O sobrenadante foi descartado e 1 mL de etanol 70% em temperatura ambiente foi adicionado no tubo, para retirada do sal. Novamente o tubo foi submetido a uma nova centrifugação por 10 min a 16000 xg a 4°C. O sobrenadante foi descartado e acrescentou-se ao tubo 1 mL de etanol absoluto 70% (temperatura ambiente), que por sua vez foi centrifugado por 5 min a 16000 xg a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e a amostra descansou em temperatura ambiente até a evaporação total do etanol.

Por último, o DNA presente na parede do tubo foi ressuspensionado com 80  $\mu\text{L}$  de tampão TE e incubado em banho maria por 30 min a 65 °C. Logo em seguida o material foi armazenado a -80 °C para uso futuro. A quantificação do DNA para verificar a qualidade e a concentração foi realizada NANODROP® em comprimento de onda  $\lambda = 260$  nm e 280 nm (BARBOSA, 1998). Leituras com razão entre 260 nm e 280nm podem ser consideradas como indicadores de pureza da amostra, e razões com valores próximos a 1,8 a 2,0 podem ser consideradas livres de contaminações (Manual Nanodrop® 2000c).

#### **4.10.2 Conversão por bissulfito**

Para o tratamento por bissulfito foi utilizado 1  $\mu\text{g}$  de DNA genômico extraído de cada paciente. O kit utilizado nesta etapa foi o kit EZ DNA Methylation™ (Zymo Research), seguindo as instruções presentes no protocolo do fabricante. O protocolo apresenta cinco etapas, sendo elas desnaturação, purificação, dessulfonação, precipitação e eluição.

No que diz respeito à identificação de citosinas metiladas presentes no DNA, a conversão por bissulfito é considerada o “padrão ouro” (CLARK et al., 2006). O

tratamento por bissulfito consiste na conversão das citosinas não metiladas em uracila por uma reação de desaminação, e mantém as citosinas metiladas (5-metilcitosina) sem nenhuma alteração (HAYATSU, 2008).

Quando o produto desse tratamento foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) as uracilas foram convertidas em timinas, e as 5-metilcitosinas se mantiveram com a mesma estrutura (HAYATSU, 2008).

#### 4.10.3 Amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A região de interesse amplificada corresponde a região 1F do gene *NR3C1* (OBERLANDER et al., 2008). No total essa região contém 410 pares de base. Sua localização corresponde à posição 961 a 1371, (GenBank: AY436590.1 (NCBI)). Nessa região concentra-se 47 sítios CpGs, dentre eles as CpGs analisadas nesse estudo, que correspondem a CpGs 40 - 47 descritos por McGowan *et al.* (2009), CpG 1 - 8 descrito por Perroud et al., (2011) e também coincidem com CpGs 6 -13 relatados por Oberlander et al. (2008).

Para a reação em cadeia da polimerase foram utilizados 20 ng de DNA extraído e convertido (tratado por bissulfito). A HotStart Taq DNA Polymerase (Qiagen®) também foi utilizada nessa etapa. Os *primers* utilizados para a reação foram adaptados com base em estudos anteriores (OBERLANDER et al., 2008; BUSTAMANTE, 2016.; COLELLA et al., 2003; TOST; DUNKER; GUT, 2003).

As condições para a realização da PCR e os *primers* utilizados estão descritos na tabela abaixo (Tabela 2). Para a confirmação da qualidade do produto da reação de PCR e falta de contaminação foi feito gel de agarose (2%) utilizando GelRed™ (Uniscience®). Os produtos da PCR foram purificados e sequenciados.

**Tabela 2:** Primers e condições para Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação da região de interesse.

Primers <i>NR3C1</i>	Condições da PCR		
<b>Forward</b> 5'-TTTTTTTTTTGAAGTTTTTTTA-3'	95°C	(14'30")	
	94°C	(30")	45 ciclos
5'-BIOTIN-CCCCCAACTCCCCAAAAA-	50°C	(30")	(410 pares de
<b>Reverse</b> 3'	72°C	(30")	base)
	72°C	(10')	

#### 4.10.4 Pirosequenciamento

Para a realização do pirosequenciamento foi utilizado o PSQ96ID Pyrosequencer (Qiagen, Valencia, CA) com o PyroMark Gold Q96 Reagent Kit (Qiagen, Valencia, CA), de acordo com o protocolo do fabricante. Considerado uma tecnologia de sequenciamento em tempo real, o pirosequenciamento é capaz de detectar polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), que podem ser criados de maneira artificial em ilhas CpGs, através do tratamento do fragmento com bissulfito (DELANEY; GARG; YUNG, 2015; POULIN et al., 2018).

É um método classificado como “padrão ouro” para a detecção de padrões de metilação quantitativa de DNA convertido, ou seja, tratado com bissulfito. O método pode ser dividido em três etapas: (i) amplificação por PCR e marcação (primer biotinilado) da sequência de interesse, (ii) isolamento do produto proveniente da PCR por meio de grânulos de estreptavidina e hibridização com um primer de sequenciamento (iii) sequenciamento (ŠESTÁKOVÁ; ŠÁLEK; REMEŠOVÁ, 2019).

Durante a etapa de sequenciamento os nucleotídeos são adicionados de acordo com a sequência de interesse. A cada adição de um nucleotídeo complementar à fita molde de DNA, um pirofosfato (PPi) é liberado. A enzima ATP sulfúrilase na presença do fosfosulfato de adenosina utiliza o PPi liberado para produzir ATP (adenosina trifosfato). Por último a enzima luciferase utiliza o ATP para converter luciferina em oxiluciferina. Essas reações produzem luz, que por sua vez é detectada e traduzida em um pico visível no software (DELANEY; GARG; YUNG, 2015; ŠESTÁKOVÁ; ŠÁLEK; REMEŠOVÁ, 2019).

Dessa forma a porcentagem de metilação é calculada através da razão das alturas de um pico de citosina (fornece um sinal de metilação) e a soma dos picos de citosina e timinas (sinal metilado e não metilado) para cada citosina em um dinucleotídeo CpG (ŠESTÁKOVÁ; ŠÁLEK; REMEŠOVÁ, 2019). Para o pirosequenciamento da região de 1F do gene *NR3C1* foram utilizados dois *sequencing primers* para obtenção de duas sequências de dispensação, devido ao tamanho do *amplicon* (Tabela 3).

**Tabela 3:** *Sequencing primers* utilizados para leitura da sequência da região promotora 1F gene *NR3C1*, correspondente aos sítios CpGs 40 - 47.

<b>Sequencing primers</b>	
<b>40 a 42 CpG</b>	5'-AGAAAAGAAATTGGAGAAATT-3'
<b>43 a 47 CpG</b>	5'-GTTTTAGAGAGATTAGGT-3'
<b>Sequências analisadas</b>	
<b>Seq 1</b>	YGGTGGTTTTTTTAAAYGTYGTTTTAATCGTGTTGATCAGTCGCTTA
<b>Seq 2</b>	YGGTTTTTYGTYGTTGTGTYGTYGTTAGTCAGTTCAGTCGTAGTCAGTCGTA

#### 4.11 Análises estatísticas

Os dados foram tabulados em planilhas do Excel®. Para verificar a distribuição normal dos dados, o teste de normalidade Shapiro-Wilk foi aplicado. Para caracterizar a amostra as variáveis faixa etária, gênero, escolaridade, renda familiar, situação conjugal, ter ou não filhos, localização, índice de massa corporal, circunferência da cintura, gordura corporal, pressão arterial, colesterol total, LDL-c, HDL-c, VLDL-c, triglicerídeos, síndrome metabólica, foram categorizadas e transformadas em variáveis dicotômicas.

Diante disso os fatores de risco para síndrome metabólica foram dicotomizados em “normal” e “alterado”, onde normal indicava que o fator de risco estava dentro dos valores de referências (NCEP-ATP III) e alterado indicava que o valor do fator de risco estava acima ou abaixo do recomendado. Já a variável síndrome metabólica foi classificada como “sim” e “não” válida para variável, no entanto, “sim” indicava três ou mais fatores de risco alterado e “não” indicava abaixo de três fatores de risco para síndrome metabólica.

Os dados categóricos foram apresentados em tabelas com frequências relativa e absoluta e comparados pelo teste do qui-quadrado com nível de significância de 5%. Para verificar os fatores determinantes para o quadro de síndrome metabólica foi realizada a análise univariada, utilizando o modelo de regressão de Poisson com variância robusta.

As variáveis preditivas utilizadas na análise univariada que apresentaram um valor  $p < 0,20$  foram inseridas pelo método backward nas análises multivariadas de regressão de Poisson com variância robusta. Durante as análises multivariadas permaneceram no modelo as variáveis significativas, ou seja, com  $p < 0,05$ , até obtenção de um modelo final, em que todas as variáveis apresentaram  $p < 0,05$ .

Para verificar a aderência final deste modelo, um ajuste foi realizado, utilizando o teste de Hosmer & Lemeshow. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando os *softwares* IBM SPSS Statistics®, versão 20 e STATA/MP®, versão 14.1.



## 5 RESULTADOS

### 5.1 Caracterização socioeconômica da amostra estudada

Entre os usuários assistidos pelo SUS do município de Alegre, foram coletados dados de 353 participantes, que compõem a amostra deste estudo. Desse total, 285 (80,7%) são do gênero feminino e 68 (19,3%) do gênero masculino. A maior parte da amostra encontra-se na faixa etária entre 40 e 59 anos (59,2%), concentra-se na área urbana (65,5%) e apresentam uma renda  $\leq$  1 salário mínimo (67,8%).

Além disso, dos 353 participantes, 82 (23,22%) foram classificados com síndrome metabólica. Também foi possível observar que existe associação entre a variável síndrome metabólica com a faixa etária ( $X^2= 5,874$ ;  $p = 0,015$ ) e ter filhos ( $X^2= 7,131$ ;  $p= 0,008$ ). As demais características estão apresentadas na tabela 4.

**Tabela 4:** Caracterização socioeconômica da amostra de acordo com a síndrome metabólica.

Características	Total		Síndrome metabólica				P
			Sim		Não		
	N	(%)	N	(%)	N	(%)	
<b>Faixa etária</b>							
20 a 39 anos	144	40,8	24	29,3	120	44,3	<b>0,015*</b>
40 a 59 anos	209	59,2	58	70,7	151	55,7	
<b>Gênero</b>							
Feminino	285	80,7	66	80,5	219	80,8	0,948
Masculino	68	19,3	16	19,5	52	19,2	
<b>Escolaridade</b>							
> 8 anos	193	54,67	39	49,4	154	57,9	0,106
< 8 anos	152	43,5	36	45,6	108	40,3	
Não avaliado	8						
<b>Localização</b>							
Rural	121	34,5	24	29,6	97	35,9	0,296
Urbana	230	65,5	57	70,4	173	64,1	
Não avaliado	2						
<b>Situação de trabalho</b>							
Sim	47	13,3	11	13,4	36	13,3	0,976
Não	306	86,7	71	86,6	235	86,7	
<b>Renda familiar</b>							
> 1 salário mínimo	111	32,2	23	28,0	88	33,5	0,360
$\leq$ 1 salário mínimo	234	67,8	59	72,0	175	66,5	
<b>Situação conjugal</b>							
Com vínculo conjugal	204	59,5	52	66,7	152	57,4	0,141
Sem vínculo conjugal	139	40,5	26	33,3	113	42,6	
Não avaliado	10						
<b>Filhos</b>							

Sim	282	79,9	74	90,2	208	76,8	<b>0,008*</b>
Não	71	20,1	8	9,8	63	23,2	

Variáveis categóricas apresentadas em frequências relativas (%) e absolutas (N). \* valor p para o teste qui-quadrado, com significância de 5%.

## 5.2 Caracterização do estilo de vida da amostra estudada

Com relação ao estilo de vida da amostra 131 (37,1%) participantes praticam atividade física e 157 (44,5%) apresentam em sua rotina alguma atividade de lazer. Os participantes também relataram consumir álcool (53%) e tabaco (26,4%). Nenhuma das variáveis classificadas para categorizar o estilo de vida da amostra apresentou resultado estatístico significativo quando associadas a variável síndrome metabólica.

**Tabela 5.** Caracterização do estilo de vida da amostra de acordo com a síndrome metabólica.

Características	Total		Síndrome metabólica				P
			Sim		Não		
	N	(%)	N	(%)	N	(%)	
<b>Hábito tabagista</b>							
Sim	93	26,4	19	23,2	74	27,4	0,446
Não	259	73,6	63	76,8	196	72,6	
Não avaliado	1	0,3					
<b>Consumo de álcool</b>							
Sim	187	53	43	52,4	144	53,5	0,862
Não	164	46,5	39	47,6	125	46,5	
Não avaliado	2	0,6					
<b>Atividade física</b>							
Sim	131	37,1	27	34,2	104	38,8	0,456
Não	216	61,2	52	65,8	164	61,2	
Não avaliado	6	1,7					
<b>Atividade de lazer</b>							
Sim	157	44,5	38	48,1	119	44,4	0,562
Não	190	53,8	41	51,9	149	55,6	
Não avaliado	6	1,7					

Variáveis categóricas apresentadas em frequências relativas (%) e absolutas (N). \* valor p para o teste qui-quadrado, com significância de 5%.

## 5.3 Caracterização do estado nutricional e dos parâmetros bioquímicos da amostra

O índice de massa corporal e a gordura corporal foram utilizados para caracterizar o estado nutricional da amostra, diante disso é possível notar que 243 (68,8%) participantes se encontram com excesso de peso e 233 (67,3%) com excesso de gordura corporal, como apresentado na tabela 6. Vale ressaltar que a associação entre o IMC ( $X^2= 15,682$ ;  $p = 0,000$ ) e a gordura corporal ( $X^2= 29,242$ ;  $p = 0,000$ ) com a síndrome metabólica foi estatisticamente significativa.

**Tabela 6:** Caracterização do estado nutricional da amostra.

Características	Total		Síndrome metabólica				p
			Sim		Não		
	N	(%)	N	(%)	N	(%)	
<b>Índice de massa corporal</b>							
Excesso de peso	243	68,8	71	86,6	172	63,5	<b>0,000*</b>
Não excesso de peso	110	31,2	11	13,4	99	36,5	
<b>Gordura corporal</b>							
Excesso de gordura	233	67,3	73	92,4	160	59,9	<b>0,000*</b>
Não excesso de gordura	113	32,7	6	7,6	107	40,1	
Não avaliado	7						

Variáveis categóricas apresentadas em frequências relativas (%) e absolutas (N). \* valor p para o teste qui-quadrado, com significância de 5%.

Em relação aos parâmetros bioquímicos foi possível verificar que o colesterol total ( $X^2= 10,078$ ;  $p = 0,002$ ) e o colesterol VLDL ( $X^2= 53,304$ ;  $p = 0,000$ ) estão associados com a síndrome metabólica. O colesterol LDL não apresentou valor estatístico significativo quando associado ao quadro de síndrome metabólica, no entanto, 122 (34,6%) participantes apresentaram alteração nesse parâmetro.

**Tabela 7:** Caracterização dos parâmetros bioquímicos da amostra.

Características	Total		Síndrome metabólica				P
			Sim		Não		
	N	(%)	N	(%)	N	(%)	
<b>Colesterol total</b>							
Normal	240	68,0	44	53,7	196	72,3	<b>0,002*</b>
Alterado	113	32,0	38	46,3	75	27,7	
<b>LDL</b>							
Normal	231	65,4	51	62,2	180	66,4	0,481
Alterado	122	34,6	31	37,8	91	33,6	
<b>VLDL</b>							
Normal	284	80,5	43	52,4	241	88,9	<b>0,000*</b>
Alterado	69	19,5	39	47,6	30	11,1	

VLDL: Lipoproteína de densidade muito baixa; LDL: Lipoproteína de baixa densidade; Variáveis categóricas apresentadas em frequências relativas (%) e absolutas (N); \* valor p para o teste qui-quadrado, com significância de 5%.

#### 5.4 Caracterização dos fatores de risco relacionados à síndrome metabólica

De acordo com os pontos de cortes estabelecidos pelo NCEP-ATP III para cada fator de risco relacionado ao quadro de síndrome metabólico, é possível observar na

amostra do estudo 268 (24,1%) participantes apresentam alterações no “colesterol bom” (HDL), 188 (53,3%) estão com a circunferência da cintura alterada, 128 (36,3%) estão com a taxa de triglicerídeos acima do valor recomendado, 67 (19%) também estão com alterações nas taxas de glicose. Em relação à pressão arterial, apenas 4 (1,1%) participantes estão com essa medida alterada (tabela 8).

**Tabela 8:** Caracterização dos fatores de risco relacionados à síndrome metabólica.

Fatores de risco	N	%
<b>Colesterol HDL</b>		
Normal	85	24,1
Alterado	268	75,9
<b>Circunferência da cintura</b>		
Normal	165	46,7
Alterado	188	53,3
<b>Triglicerídeos</b>		
Normal	225	63,7
Alterado	128	36,3
<b>Pressão arterial média</b>		
Normal	349	98,9
Alterado	4	1,1
<b>Glicose</b>		
Normal	286	81
Alterado	67	19
<b>Total</b>	<b>353</b>	<b>100</b>

### 5.5 Avaliação do perfil de metilação da região 1F do gene *NR3C1*

O perfil de metilação foi elaborado de acordo com os níveis de metilação das CpGs (6 a 13) da região 1F do gene *NR3C1*, conforme relatados por Oberlander et al. (2008). Foram analisadas todas as amostras de DNA dos 353 participantes. No sítio CpG 6 foi encontrado a maior média de metilação, 054% (DP=  $\pm 2,12$ ), seguida do sítio CpG 7 com a média de 0,43% ( $\pm 2,22$ ). As demais médias podem ser observadas na tabela abaixo.

Para as CpGs 9, 11 e 13 o perfil de metilação foi nulo, desse modo foram retiradas dos cálculos seguintes. A nomenclatura das CpGs está de acordo com a descrição de PERROUD et al., 2011.

**Tabela 9:** Perfil de metilação da região 1F do gene *NR3C1* da amostra.

Sítio CpG	N	Média (DP)	Min - Max
<b>CpG6</b>	293	0,54 ( $\pm$ 2,12)	0,00 - 21,25
<b>CpG7</b>	248	0,43 ( $\pm$ 2,22)	0,00 - 18
<b>CpG8</b>	290	0,23 ( $\pm$ 1,86)	0,00 - 22
<b>CpG9</b>	282	0,00 ( $\pm$ 0,00)	0,00 - 0,00
<b>CpG10</b>	272	0,03 ( $\pm$ 0,54)	0,00 - 9
<b>CpG11</b>	278	0,00 ( $\pm$ 0,00)	0,00 - 0,00
<b>CpG12</b>	254	0,13 ( $\pm$ 2,19)	0,00 - 35
<b>CpG13</b>	276	0,00 ( $\pm$ 0,00)	0,00 - 0,00

## 5.6 Fatores determinantes para síndrome metabólica

O teste univariado de regressão de Poisson com variância robusta foi utilizado para determinar os fatores associados ao quadro de síndrome metabólica. Assumindo o valor de  $p < 0,05$ , os fatores que se associaram com a síndrome metabólica foram a faixa etária, ter filhos, IMC, gordura corporal, colesterol total, colesterol VLDL e a metilação das CpGs 6, 8, 10 e 12 da região 1F do gene *NR3C1* (tabela 10).

**Tabela 10:** Análise univariada de regressão de Poisson com variância robusta.

Variável dependente: SM Fatores independentes	Regressão de Poisson Univariada	
	IRR (IC 95%)	Valor p
Gênero	0,98 (0,60 – 1,58)	0,948
Faixa etária	1,66 (1,08 – 2,55)	0,019**
Localização da residência	1,24 (0,81 – 1,90)	0,303
Escolaridade	0,96 (0,65 – 1,42)	0,848
Situação conjugal	1,36 (0,89 – 2,07)	0,148
Renda familiar	1,21 (0,79 – 1,86)	0,367
Filhos	2,32 (1,17 – 4,60)	0,015*
Atividade lazer	1,12 (0,76 – 1,65)	0,562
Atividade física	0,85 (0,56 – 1,29)	0,460
Consumo de álcool	0,96 (0,66 – 1,41)	0,862
Hábito tabagista	0,83 (0,53 – 1,32)	0,453
IMC	2,92 (1,61 – 5,29)	0,000**
Gordura corporal	5,90 (2,64 – 13,1)	0,000**
Colesterol total	1,83 (1,26 – 2,66)	0,001*
Cortisol	0,79 (0,37 – 1,68)	0,554
VLDL_c	3,73 (2,64 – 5,27)	0,000**

LDL_c	1,15 (0,77 – 1,69)	0,479
Metilação <i>NR3C1</i> CpG 6	1,06 (1,03 – 1,10)	0,000**
Metilação <i>NR3C1</i> CpG 7	0,93 (0,82 – 1,06)	0,308
Metilação <i>NR3C1</i> CpG 8	0,04 (0,27 – 0,07)	0,000**
Metilação <i>NR3C1</i> CpG 10	0,10 (0,08 – 0,13)	0,000**
Metilação <i>NR3C1</i> CpG12	0,56 (0,53 – 0,59)	0,000**

IMC: índice de massa corporal; NR3C1: Receptor nuclear da subfamília 3, grupo C, membro 1; VLDL\_c: Lipoproteína de densidade muito baixa; LDL\_c: Lipoproteína de baixa densidade; CpG: citosina-fosfato-guanina; IIR: valor de prevalência; IC: intervalo de confiança; valor p para regressão univariada de Poisson com variância robusta, com significância de 5% e síndrome metabólica (SM) como variável dependente, \* p <0,20, \*\* p <0,05.

Para realizar a regressão multivariada de Poisson com variância robusta foram utilizadas as variáveis preditivas considerando o valor de  $p < 0,20$ , e em seguida foi realizado o ajuste pelo teste de Hosmer & Lemeshow. Diante disso a síndrome metabólica presente na amostra foi explicada em 16% pela gordura corporal, o colesterol VLDL e a metilação das CpGs 6, 8, 10 e 12 da região 1F do gene *NR3C1* (tabela 11).

**Tabela 11:** Análise multivariada de regressão de Poisson com variância robusta, método backward, após ajuste pelo teste de Hosmer & Lemeshow.

Variável dependente: SM	Regressão de Poisson Multivariada	
	Fatores independentes	IIR (IC 95%)
Gordura corporal	4,68 (1,95 – 11,22)	0,001
VLDL	3,31 (2,23 – 4,938)	<0,001
Metilação <i>NR3C1</i> CpG 6	1,07 (1,04 - 1,108)	<0,001
Metilação <i>NR3C1</i> CpG 8	0,06 (0,04 - 0,091)	<0,001
Metilação <i>NR3C1</i> CpG 10	0,20 (0,16 - 0,254)	<0,001
Metilação <i>NR3C1</i> CpG12	0,67 (0,63 – 0,710)	<0,001

VLDL: Lipoproteína de densidade muito baixa; NR3C1: Receptor nuclear da subfamília 3, grupo C, membro 1; CpG: citosina-fosfato-guanina; IIR: valor de prevalência; IC: intervalo de confiança; valor  $p < 0,05$  para regressão multivariada de Poisson com variância robusta, com significância de 5% e síndrome metabólica (SM) como variável dependente.

É possível observar que a prevalência de síndrome metabólica é 4,68 vezes maior entre os indivíduos que possuem excesso de gordura corporal e 3,31 vezes maior entre aqueles que possuem alterações nas medidas do colesterol VLDL. Além disso, a cada 1% de metilação na CpG6 aumenta em 1,07 a prevalência de síndrome

metabólica. No entanto, a cada 1% de metilação nas CpGs 8, 10 e 12 reduz a prevalência de síndrome metabólica em 94%, 80% e 33%, respectivamente.

## 6 DISCUSSÃO

Atualmente a síndrome metabólica é considerada uma epidemia mundial e um grande problema de saúde pública (WANG et al., 2020). Devido à complexidade de cada um dos seus fatores de risco, a origem patológica da síndrome metabólica não está totalmente elucidada na literatura (OLIVEIRA; BOERY, 2018). No entanto, há um consenso a respeito dos fatores de risco que classificam o indivíduo com síndrome metabólica (PALEY; JOHNSON, 2018).

Os fatores de risco para síndrome metabólica são: excesso de gordura abdominal, baixos níveis de colesterol HDL, pressão arterial alta, triglicerídeos e glicose alterados (WANG et al., 2020). Esses fatores de risco estão associados com o aumento de doenças cardiovasculares e diabetes na população (PALEY; JOHNSON, 2018). É possível notar que estes fatores podem ser ocasionados devido ao hábito alimentar, estilo de vida, condições de saúde, estresse, entre outros (MITTELSTRASS; WALDENBERGER, 2018).

A prevalência de síndrome metabólica encontrada na amostra deste estudo foi de 23,22%. Em comparação aos estudos realizados no Brasil é possível observar que a prevalência nessa amostra é menor. Na população adulta brasileira a prevalência foi de 38,4% (OLIVEIRA et al., 2020). No Espírito Santo, um estudo realizado na cidade de Vitória identificou uma prevalência de 29,8% (SALAROLI et al., 2007).

Globalmente, a prevalência de síndrome metabólica varia de região para região como, por exemplo, na Coreia, no período entre 2013 a 2015 a prevalência padronizada por idade na população foi de 20,3% (HUH et al., 2018). No México a prevalência foi de 36%, de acordo com os critérios estabelecidos pelo NCEP-ATP III (GUTIÉRREZ-SOLIS; DATTA BANIK; MÉNDEZ-GONZÁLEZ, 2018).

Na Arábia Saudita, foi de 39,8% (AL-RUBEAN et al., 2018), quando comparada com a prevalência desse estudo, a da Arábia Saudita é alta. Nos Estados Unidos a prevalência foi de 33 %, considerando o período entre 2003 a 2012 (AGUILAR et al., 2015). Essa variação recorrente nos países mencionados pode ser explicada pela definição de síndrome metabólica adotada por cada estudo, pela amostragem realizada, entre outros fatores.



A síndrome metabólica apresenta características multifatoriais, dessa forma os fatores ambientais e genéticos podem ser levados em consideração para explicar o desenvolvimento da síndrome metabólica (FERNANDEZ GIANOTTI; PIROLA, 2015; OLIVEIRA; BOERY, 2018). Na literatura, a participação na metilação do DNA na expressão gênica em resposta a fatores ambientais está bem consolidada (STOLL; WANG; QIU, 2018).

Diante disso, é importante destacar que alguns estudos sugerem a relação de mecanismos epigenéticos com desenvolvimento de algumas doenças crônicas, como obesidade (DE ASSIS PINHEIRO et al., 2021), resistência à insulina, distúrbios lipídicos e doenças cardiovasculares (GONZÁLEZ-BECERRA et al., 2019; SAMBLAS; MILAGRO; MARTÍNEZ, 2019).

No entanto, os aspectos epigenéticos sobre a síndrome metabólica são pouco estudados, principalmente com genes relacionados com a regulação do estresse, inflamação e imunidade, fatores estes envolvidos na etiologia da síndrome metabólica. Especificamente, não há estudos que abordam a relação entre alterações na metilação do gene *NR3C1* e síndrome metabólica.

Na literatura é possível encontrar trabalhos que propõem o envolvimento da metilação global do DNA com a síndrome metabólica. Por exemplo, foi possível observar que indivíduos com síndrome metabólica apresentam hipometilação do DNA global quando comparado com indivíduos sem síndrome, isso pode ser explicado, principalmente por dois fatores de risco, a glicose e o colesterol HDL (LUTTMER et al., 2013).

Dessa forma, o objetivo dessa pesquisa foi avaliar os níveis de metilação na região promotora (1F) do gene *NR3C1* e investigar sua relação com a síndrome metabólica, em usuários do sistema único de saúde (SUS) de Alegre – Espírito Santo (ES).

Para verificar esta associação, foram considerados neste estudo diversas variáveis relacionadas ao perfil socioeconômico, estilo de vida, condições de saúde, parâmetros bioquímicos e moleculares, potencialmente envolvidos com a síndrome metabólica.

Em relação ao perfil socioeconômico (tabela 4) foi possível observar na amostra, que a faixa etária associou-se com a síndrome metabólica ( $p= 0,015$ ), sendo sua prevalência maior nos indivíduos da faixa etária entre 40 e 59 anos (70,7%). Esse achado também foi observado em outros estudos (AGUILAR et al., 2015; HUH et al., 2018).

Já a variável gênero não se associou a síndrome metabólica nesse estudo. No entanto, na amostra do estudo a frequência de síndrome metabólica foi mais alta em mulheres (80,5%) quando comparada aos homens (19,5%). Esse achado corrobora com o observado por Aguilar e colaboradores (2015).

Curiosamente as variáveis utilizadas para caracterizar o estilo de vida na amostra não apresentaram associação significativa com a síndrome metabólica (tabela 5). Entretanto, 216 (61,2%) participantes da amostra não pratica nenhum tipo de atividade física, por isso era esperado que ela se associa-se a síndrome. Visto que, na literatura, a inatividade física está diretamente relacionada com o desenvolvimento de distúrbios metabólicos (GUALANO; TINUCCI, 2011).

As condições de saúde foram caracterizadas pelas variáveis IMC e gordura corporal, ambas se associaram à síndrome metabólica (tabela 6). Além disso, foi possível observar que a prevalência de síndrome metabólica é 4,68 vezes maior entre os indivíduos que possuem excesso de gordura corporal.

Segundo a OMS (2016) a obesidade é definida como excesso de gordura corporal que apresenta risco à saúde. Atualmente um terço da população mundial é considerado com excesso de gordura corporal ou sobrepeso (CHOOI; DING; MAGKOS, 2019), isso corrobora o resultado encontrado nesta pesquisa, dado que 67,3% (233 participantes) da amostra está com excesso de gordura corporal.

Muitos estudos apontam o excesso de gordura corporal como um problema de saúde pública, visto que aumenta o risco do desenvolvimento de doenças cardiovasculares, DMII, câncer, hipertensão, entre outros (CHOOI; DING; MAGKOS, 2019; FERREIRA; SZWARCOWALD; DAMACENA, 2019; FRANCA et al., 2018).

É importante destacar que o excesso de gordura abdominal é um dos fatores de risco que classificam a síndrome metabólica, e assim como o excesso de gordura corporal,

está diretamente relacionado ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares na população (FANG et al., 2018). No contexto mundial, as doenças cardiovasculares são responsáveis por 71% das mortes, e no Brasil por 28,2% de todos os óbitos registrados no país no ano de 2012 (CUNHA DA SILVA PELLEENSE et al., 2021; POLANCZYK, 2020).

Apesar de recorrente na população, o excesso de gordura corporal pode ser resultado da interação de fatores socioeconômicos, ambientais, genéticos, hábitos alimentares e estilo de vida, devido a essa complexidade é importante o desenvolvimento de medidas que mudem o estilo e os hábitos de vida da população (CHOOI; DING; MAGKOS, 2019).

Outros fatores que se associaram à síndrome metabólica foram o colesterol total e o VLDL. O colesterol apresenta um papel importante na fisiologia humana, pois ele participa da estrutura das membranas celulares, do transporte de lipídios, sínteses de hormônios sexuais e digestivos, auxilia o tecido epitelial a controlar a perda de água, participa da absorção das vitaminas lipossolúveis, entre outras funções, além de estar presente na maioria dos tecidos e órgãos do organismo (MALTA et al., 2019).

De acordo com estimativas realizadas pela OMS os níveis de colesterol séricos são responsáveis por aproximadamente 2,6 milhões de mortes por ano (MALTA et al., 2019). Além disso, alterações nos níveis de colesterol são considerados um fator de risco cardiovascular (LIMA et al., 2020). Apesar de na literatura o colesterol total não fazer parte dos fatores de risco classificados para a síndrome metabólica, nessa pesquisa mostrou-se associado com a mesma (tabela 7).

Embora as variáveis mencionadas anteriormente tenham se associado, apenas a faixa etária, ter filhos IMC e níveis de colesterol total se mantiveram associadas na análise univariada. Contudo, na análise multivariada somente o percentual de gordura corporal, os níveis séricos de colesterol VLDL e a metilação nas CpGs 6, 8, 9 e 10 do gene *NR3C1* foram considerados fatores determinantes para síndrome metabólica na presente amostra.

Até onde sabemos, este é o primeiro trabalho que aborda a associação entre a metilação do gene *NR3C1* e síndrome metabólica. Na amostra desse estudo a

síndrome metabólica apresentou associação com a redução da metilação das CpGs 8, 10 e 12 da região 1F do gene *NR3C1*, enquanto que na CpG 6 ocorreu associação com o aumento da metilação do gene.

Este resultado pode aparentar uma contradição, mas se tratando do gene *NR3C1*, é possível notar que além de possuir uma estrutura com uma grande variabilidade de éxons, também apresenta uma regulação gênica complexa, dado que no éxon 1 é uma região rica em dinucleotídeos CpGs, sendo a modulação dessa região sensível a metilação (PALMA-GUDIÉL et al., 2015).

Diante desse resultado podemos sugerir que existe o envolvimento da regulação epigenética do gene *NR3C1* na síndrome metabólica, no entanto, não podemos afirmar com certeza qual é a “direção” dessa modulação. Se é a metilação do *NR3C1* que influencia na síndrome metabólica, ou se é a síndrome metabólica que influencia no padrão de metilação do *NR3C1*.

Contudo, o resultado encontrado pode chamar a atenção da comunidade científica, uma vez que, a metilação do *NR3C1* está envolvida com alterações na expressão gênica do receptor glicocorticóide e na reatividade ao estresse por modificações na regulação do eixo HPA (BORÇOI et al., 2020, 2021; DE ASSIS PINHEIRO et al., 2021; WEAVER et al., 2004).

Muitos estudos sobre as alterações epigenéticas no gene *NR3C1* estão disponíveis na literatura. Em sua maioria eles se concentram na relação do *NR3C1* com estresse precoce pré-natal (OBERLANDER et al., 2008), traumas na infância (PERROUD et al., 2011; VAN DER KNAAP et al., 2014), estresse pós-traumático (PERROUD et al., 2014; VUKOJEVIC et al., 2014), depressão (BORÇOI et al., 2020) e suicídio (STEIGER et al., 2013).

Em relação às modulações epigenéticas relacionados ao *NR3C1* e síndrome metabólica, não há estudos disponíveis ainda. Mas existem estudos que relacionaram as alterações epigenéticas nesse gene com o sobrepeso, lembrando que o excesso de gordura abdominal é um fator de risco para a síndrome metabólica.

De Assis Pinheiro e colaboradores (2020) verificaram a associação entre a hipometilação da mesma região do gene *NR3C1* deste estudo com o sobrepeso, e

sugeriram envolvimento do estresse crônico e da inflamação de baixo grau com o excesso de gordura.

Uma pesquisa apontou evidências sugestivas de que a obesidade na vida adulta pode estar relacionada com o perfil alimentar materno durante a gestação, já que a deficiência nutricional materna, principalmente de folato, metionina, betaína ou colina, que são doadores de metil, podem alterar o perfil de metilação do DNA, e isso por sua vez pode aumentar a probabilidade um fenótipo obeso na vida adulta (SAMBLAS; MILAGRO; MARTÍNEZ, 2019).

Portanto, os resultados aqui descritos sugerem um possível envolvimento entre a metilação do gene *NR3C1* com a síndrome metabólica. Entretanto, se tratando de um estudo transversal, não podemos afirmar uma relação de causalidade, ou seja, não é possível afirmar que a metilação no gene *NR3C1* aumenta a probabilidade de desenvolver síndrome metabólica, ou se a síndrome metabólica pode alterar os padrões de metilação do *NR3C1*.

Diante disso, novas pesquisas precisam ser realizadas para compreender realmente qual a modulação que ocorre nessa associação. Todavia, este trabalho também fornece dados relevantes para as entidades governamentais e profissionais da saúde sobre a síndrome metabólica, uma vez que o crescimento acelerado dessa condição é recorrente em escala global, e está diretamente relacionada com o desenvolvimento de doenças crônicas na população.

Além disso, os dados epidemiológicos apresentados aqui podem fornecer subsídios para o desenvolvimento de políticas públicas de prevenção e tratamento, que contribuem para a redução dos gastos públicos com a saúde.

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados encontrados neste trabalho indicam que a prevalência de síndrome metabólica nessa amostra foi de 23,22%. Dentre as variáveis utilizadas para caracterizar o perfil socioeconômico, estilo de vida, condições de saúde e parâmetros bioquímicos, a faixa etária, ter filhos, IMC, gordura corporal, colesterol total e VLDL mostraram-se associados à síndrome metabólica.

No entanto, os fatores considerados determinantes para síndrome metabólica foram a gordura corporal, colesterol VLDL e a metilação nas CpGs 6, 8, 10 e 12. Esses fatores explicam em 16% a prevalência de síndrome metabólica nesta amostra. Adicionalmente, foi possível verificar que há associação entre o perfil de metilação do gene *NR3C1* e a síndrome metabólica, entretanto, não é possível aferir uma relação de causa e consequência, devido à natureza transversal do estudo.

## REFERÊNCIAS

AGUILAR, Maria et al. Prevalence of the metabolic syndrome in the United States, 2003-2012. **Jama**, v. 313, n. 19, p. 1973-1974, 2015.

AL-RUBEAN, Khalid et al. Prevalence of metabolic syndrome in Saudi Arabia-a cross sectional study. **BMC endocrine disorders**, v. 18, n. 1, p. 1-9, 2018.

ARGENTIERI, M. Austin 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.

BIRD, Adrian. Perceptions of epigenetics. **Nature**, v. 447, n. 7143, p. 396, 2007.

BOLLATI, Valentina; BACCARELLI, Andrea. Environmental epigenetics. **Heredity**, v. 105, n. 1, p. 105-112, 2010.

BORÇOI, Aline Ribeiro et al. Food and nutritional insecurity is associated with depressive symptoms mediated by NR3C1 gene promoter 1F methylation. **Stress**, v. 24, n. 6, p. 814-821, 2021.

BORÇOI, Aline Ribeiro et al. Risk factors for depression in adults: NR3C1 DNA methylation and lifestyle association. **Journal of psychiatric research**, v. 121, p. 24-30, 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Biblioteca Virtual em Saúde. **Síndrome metabólica**. Brasília: Ministério da Saúde, 2017. Disponível em <<https://bvsmms.saude.gov.br/sindrome-metabolica/#:~:text=O%20termo%20S%C3%ADndrome%20Metab%C3%B3lica%20descreve,doen%C3%A7as%20card%C3%ADacas%2C%20derrames%20e%20diabetes>>. Acesso 02 de fev. de 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Orientações para a coleta e análise de dados antropométricos em serviços de saúde: Norma Técnica do Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional - SISVAN**. 1ª ed. Brasília, 2011.

BRASIL. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. Disponível em <<https://www.scielo.br/j/abc/a/qWzJH647dkF7H5dML8x8Nym/?format=pdf&lang=pt>>. Acesso em 5 de fev. de 2022.

BRASIL. Sociedade Brasileira de Cardiologia. V Diretriz Brasileira de Dislipidemia e Prevenção a Aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. Disponível em <[http://www.sbpc.org.br/upload/conteudo/V\\_Diretriz\\_Brasileira\\_de\\_Dislipidemias.pdf](http://www.sbpc.org.br/upload/conteudo/V_Diretriz_Brasileira_de_Dislipidemias.pdf)>. Acesso em 10 de fev. de 2022.

BRASIL. Sociedade Brasileira de Cardiologia. **VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão da Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2017**. Disponível em <<http://www.rio.rj.gov.br/dlstatic/10112/4446958/4111920/diretriz.pdf>>. Acesso em 08 de ago. De 2021.

BUSTAMANTE, Angela C. et al. Glucocorticoid receptor DNA methylation, childhood maltreatment and major depression. **Journal of affective disorders**, v. 206, p. 181-188, 2016.

CAVALLI, Giacomo; HEARD, Edith. Advances in epigenetics link genetics to the environment and disease. **Nature**, v. 571, n. 7766, p. 489-499, 2019.

CHOOI, Yu Chung; DING, Cherlyn; MAGKOS, Faidon. The epidemiology of obesity. **Metabolism**, v. 92, p. 6-10, 2019.

COLELLA, Sensitive et al. Sensitive and quantitative universal Pyrosequencing™ methylation analysis of CpG sites. **Biotechniques**, v. 35, n. 1, p. 146-150, 2003.

DA SILVA PELLEENSE, Márcia Cunha et al. Avaliação da mortalidade por Doenças Cardiovasculares no Brasil: Uma série temporal de 2015 a 2019. **Revista Ciência Plural**, v. 7, n. 3, p. 202-219, 2021.

DASKALAKIS, Nikolaos P.; YEHUDA, Rachel. Site-specific methylation changes in the glucocorticoid receptor exon 1F promoter in relation to life adversity: systematic review of contributing factors. **Frontiers in neuroscience**, v. 8, p. 369, 2014.

DE ASSIS PINHEIRO, Júlia et al. Alcohol consumption, depression, overweight and cortisol levels as determining factors for NR3C1 gene methylation. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2021.

DE CARVALHO VIDIGAL, Fernanda et al. Prevalence of metabolic syndrome in Brazilian adults: a systematic review. **BMC public health**, v. 13, n. 1, p. 1-10, 2013.

DELANEY, Colin; GARG, Sanjay K.; YUNG, Raymond. Analysis of DNA methylation by pyrosequencing. In: **Immunosenescence**. Humana Press, New York, NY, 2015. p. 249-264.

DHAR, Gaurab Aditya et al. DNA methylation and regulation of gene expression: Guardian of our health. **The Nucleus**, p. 1-12, 2021.

DO MONTE, Iberê Pinheiro et al. Comparação entre quatro diferentes critérios de diagnóstico de síndrome metabólica em indivíduos do Arquipélago do Marajó (Pará, Brasil). **Revista da Associação Brasileira de Nutrição-RASBRAN**, v. 10, n. 1, p. 96-102, 2019.

DO VALE MOREIRA, Nayla Cristina et al. Prevalence of Metabolic Syndrome by different definitions, and its association with type 2 diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular disease risk in Brazil. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 14, n. 5, p. 1217-1224, 2020.

DOR, Yuval; CEDAR, Howard. Principles of DNA methylation and their implications for biology and medicine. **The Lancet**, v. 392, n. 10149, p. 777-786, 2018.

FANG, Hongjuan et al. How to best assess abdominal obesity. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v. 21, n. 5, p. 360, 2018.



- FEINBERG, Andrew P. Cancer epigenetics takes center stage. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 2, p. 392-394, 2001.
- FÉLIX, Nuno Damácio de Carvalho; NÓBREGA, Maria Miriam Lima da. Metabolic syndrome: conceptual analysis in the nursing context. **Revista latino-americana de enfermagem**, v. 27, 2019.
- FERNÁNDEZ GIANOTTI, Tomás; PIROLA, Carlos José. Epigenética y síndrome metabólico. **Revista argentina de endocrinología y metabolismo**, v. 52, n. 1, p. 35-44, 2015.
- FERNÁNDEZ GIANOTTI, Tomás; PIROLA, Carlos José. Epigenética y síndrome metabólico. **Revista argentina de endocrinología y metabolismo**, v. 52, n. 1, p. 35-44, 2015.
- FERREIRA, Arthur Pate de Souza; SZWARCOWALD, Célia Landmann; DAMACENA, Giseli Nogueira. Prevalência e fatores associados da obesidade na população brasileira: estudo com dados aferidos da Pesquisa Nacional de Saúde, 2013. **Revista brasileira de epidemiologia**, v. 22, 2019.
- FRANCA, Ana Paula et al. Factors associated with general obesity and the percentage of body fat of women during the menopause in the city of Sao Paulo, Brazil/Fatores associados a obesidade geral e ao percentual de gordura corporal em mulheres no climaterio da cidade de Sao Paulo, Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 23, n. 11, p. 3577-3587, 2018.
- GONZÁLEZ-BECERRA, K. et al. Fatty acids, epigenetic mechanisms and chronic diseases: a systematic review. **Lipids in health and disease**, v. 18, n. 1, p. 1-18, 2019.
- GOTTLIEB, Maria Gabriela Valle; CRUZ, Ivana Beatrice Mânica da; BODANESE, Luiz Carlos. Origem da síndrome metabólica: aspectos genético-evolutivos e nutricionais. **Sci Med**, v. 18, n. 1, p. 31-8, 2008.
- GREENBERG, Maxim VC; BOURC'HIS, Deborah. The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease. **Nature reviews molecular cell biology**, v. 20, n. 10, p. 590-607, 2019.
- GUALANO, Bruno; TINUCCI, Taís. Sedentarismo, exercício físico e doenças crônicas. **Revista Brasileira de Educação Física e Esporte**, v. 25, p. 37-43, 2011.
- GUTIÉRREZ-SOLIS, Ana Ligia; DATTA BANIK, Sudip; MÉNDEZ-GONZÁLEZ, Rosa María. Prevalence of metabolic syndrome in Mexico: a systematic review and meta-analysis. **Metabolic Syndrome and Related Disorders**, v. 16, n. 8, p. 395-405, 2018.
- HAYATSU, Hikoya. The bisulfite genomic sequencing used in the analysis of epigenetic states, a technique in the emerging environmental genotoxicology research. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 659, n. 1-2, p. 77-82, 2008.

HUH, Ji Hye et al. Metabolic syndrome epidemic among Korean adults: Korean survey of Cardiometabolic Syndrome (2018). **Atherosclerosis**, v. 277, p. 47-52, 2018.

HULSHOFF, Melanie S. et al. Epigenetic regulation of endothelial-to-mesenchymal transition in chronic heart disease: histone modifications, dna methylation, and noncoding RNAs. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 38, n. 9, p. 1986-1996, 2018.

KUEHNER, Janise N. et al. Epigenetic regulations in neuropsychiatric disorders. **Frontiers in genetics**, v. 10, p. 268, 2019.

LESSEUR, Corina; CHEN, Jia. Adverse maternal metabolic intrauterine environment and placental epigenetics: implications for fetal metabolic programming. **Current environmental health reports**, v. 5, n. 4, p. 531-543, 2018.

LI, Yaru et al. Metabolic syndrome prevalence and its risk factors among adults in China: A nationally representative cross-sectional study. **PloS one**, v. 13, n. 6, p. e0199293, 2018.

LIMA, Ivonilde Bezerra da Silva Oliveira et al. Inovação na prevenção de doenças cardiovasculares a partir da alimentação saudável. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 10, p. 80508-80525, 2020.

LOHMAN, Timothy G. et al. **Anthropometric standardization reference manual**. Human kinetics books, 1988.

LUTTMER, Roosmarijn et al. Metabolic syndrome components are associated with DNA hypomethylation. **Obesity research & clinical practice**, v. 7, n. 2, p. e106-e115, 2013.

MALTA, Deborah Carvalho et al. Prevalence of altered total cholesterol and fractions in the Brazilian adult population: National Health Survey. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 22, 2019.

MANSUR, Antonio de Padua; FAVARATO, Desidério. Mortality due to cardiovascular diseases in Brazil and in the metropolitan region of São Paulo: a 2011 update. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 99, p. 755-761, 2012.

MASSAROLI, Letícia Carvalho et al. Qualidade de vida e o IMC alto como fator de risco para doenças cardiovasculares: revisão sistemática. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 16, n. 1, 2018.

MCGOWAN, Patrick O. et al. Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. **Nature neuroscience**, v. 12, n. 3, p. 342-348, 2009.

MITTELSTRAß, Kirstin; WALDENBERGER, Melanie. DNA methylation in human lipid metabolism and related diseases. **Current opinion in lipidology**, v. 29, n. 2, p. 116, 2018.

MULLER, Henrique Reichmann; PRADO, Karin Braun. Epigenética: um novo campo da genética. **Rubs**, v. 1, n. 3, p. 61-69, 2008.

NOBLE, Denis. Conrad Waddington and the origin of epigenetics. **The Journal of experimental biology**, v. 218, n. 6, p. 816-818, 2015.

OBERLANDER, Tim 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.

OLIVEIRA, Jamille Silva; BOERY, Rita Narriman Silva de Oliveira. An integrative review of associations between polymorphic variants and the metabolic syndrome. **Jornal vascular brasileiro**, v. 17, p. 141-147, 2018.

OLIVEIRA, Laís Vanessa Assunção et al. Prevalence of the Metabolic Syndrome and its components in the Brazilian adult population. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 25, p. 4269-4280, 2020.

PALEY, Carole A.; JOHNSON, Mark I. Abdominal obesity and metabolic syndrome: exercise as medicine? **BMC Sports Science, Medicine and Rehabilitation**, v. 10, n. 1, p. 1-8, 2018.

PALMA-GUDIEL, Helena 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, 2015.

PENALVA, Daniele Q. Fucciolo. Síndrome metabólica: diagnóstico e tratamento. **Revista de Medicina**, v. 87, n. 4, p. 245-250, 2008.

PERROUD, Nader 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.

POLANCZYK, Carisi Anne. Epidemiology of Cardiovascular Diseases in Brazil: The Truth Hidden in the Numbers. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 115, p. 161-162, 2020.

POULIN, Matthew et al. Pyrosequencing methylation analysis. In: **Cancer Epigenetics for Precision Medicine**. Humana Press, New York, NY, 2018. p. 283-296.

RAMIRES, Elyssia Karine Nunes Mendonça et al. Prevalence and factors associated with metabolic syndrome among Brazilian adult population: National Health Survey-2013. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 110, p. 455-466, 2018.

SALAROLI, Luciane B. et al. Prevalência de síndrome metabólica em estudo de base populacional, Vitória, ES-Brasil. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 51, p. 1143-1152, 2007.

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 I, p. 1748-1750, 1998.

SAMBLAS, Mirian; MILAGRO, Fermín I.; MARTÍNEZ, Alfredo. DNA methylation markers in obesity, metabolic syndrome, and weight loss. **Epigenetics**, v. 14, n. 5, p. 421-444, 2019.

ŠESTÁKOVÁ, Šárka; ŠÁLEK, Cyril; REMEŠOVÁ, Hana. DNA methylation validation methods: a coherent review with practical comparison. **Biological procedures online**, v. 21, n. 1, p. 1-11, 2019.

STEIGER, Howard 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.

STOLL, Shaunrick; WANG, Charles; QIU, Hongyu. DNA methylation and histone modification in hypertension. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 4, p. 1174, 2018.

TANG, Wan-ye; HO, Shuk-mei. Epigenetic reprogramming and imprinting in origins of disease. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 8, n. 2, p. 173-182, 2007.

TOST, Jörg; DUNKER, Jenny; GUT, Ivo Glynne. Analysis and quantification of multiple methylation variable positions in CpG islands by Pyrosequencing™. **Biotechniques**, v. 35, n. 1, p. 152-156, 2003.

VAN DER KNAAP, L. J. et al. Glucocorticoid receptor gene (NR3C1) methylation following stressful events between birth and adolescence. The TRAILS study. **Translational psychiatry**, v. 4, n. 4, p. e381-e381, 2014.

WADJI, D. L. et al. Child maltreatment and NR3C1 exon 1F methylation, link with deregulated hypothalamus-pituitary-adrenal axis and psychopathology: a systematic review. **Child Abuse & Neglect**, v. 122, p. 105304, 2021.

WANG, Helen H. et al. Novel insights into the pathogenesis and management of the metabolic syndrome. **Pediatric Gastroenterology, Hepatology & Nutrition**, v. 23, n. 3, p. 189, 2020.

WEAVER, Ian CG et al. Epigenetic programming by maternal behavior. **Nature neuroscience**, v. 7, n. 8, p. 847-854, 2004.

WEIDMAN, Jennifer R. et al. Cancer susceptibility: epigenetic manifestation of environmental exposures. **The cancer journal**, v. 13, n. 1, p. 9-16, 2007.

XI, Bo et al. Prevalence of metabolic syndrome and its influencing factors among the Chinese adults: the China Health and Nutrition Survey in 2009. **Preventive medicine**, v. 57, n. 6, p. 867-871, 2013.

YOO, Christine B.; JONES, Peter A. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. **Nature reviews Drug discovery**, v. 5, n. 1, p. 37-50, 2006.

## APÊNDICES

**Apêndice 1:** questionário de avaliação socioeconômica, condição de saúde e estilo de vida.

Cadastro SUS

Código: |\_\_|\_|\_\_|\_|\_\_|\_|\_\_|\_|

Cadastro Individual	
Identificação do usuário/Cidadão	
Nome completo: _____	
Número do cartão SUS: _____	Data de nascimento: _____/_____/_____
Sexo:  __  Masculino  __  Feminino	Raça:  __  Branca  __  Preta  __  Parda  __  Amarela  __  Indígena
Informações sociodemográficas	
Situação Conjugal:  __  Solteiro  __  Casado(a)  __  Divorciado/ Separado  __  Viúvo (a)  __  Outra	
Ocupação: _____	
Escolaridade:	
__  Creche	__  Ensino Fundamental EJA (5ª-8ª)
__  Pré escola	__  Ensino Médio
__  Classe Alfabetizada	__  Ensino Médio especial
__  Ensino Fundamental 1ª-4ª séries	__  Ensino Médio EJA
__  Ensino Fundamental 5ª-8ª séries	__  Superior, Aperfeiçoamento, Especialização, Mestrado
__  Ensino Fundamental Completo	Doutorado
__  Ensino Fundamental especial	__  Alfabetização Para Adultos
__  Ensino Fundamental EJA (1ª-4ª)	__  Nenhum
Situação no mercado de trabalho:	
__  Empregador	__  Aposentado/Pensionista
__  Assalariado com carteira de trabalho	__  Desempregado
__  Assalariado sem carteira de trabalho	__  Não trabalha
__  Autônomo com previdência social	__  Outro
__  Autônomo sem previdência social	
Possui deficiência?  __  Sim  __  Não	
Se sim, qual?	
__  Auditiva	__  Física
__  Visual	__  Outra
__  Intelectual/ Cognitiva	

Cadastro Domiciliar	
<b>Endereço/ Telefone para contato</b>	
Tipo de Logradouro:	
Nome do logradouro: Nº e complemento:	
Bairro:	Telefone:
<b>Condições de Moradia</b>	
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: |\_\_||\_\_||\_\_||\_\_|

<b>Data:</b>	
<b>Entrevistador:</b>	
<b>MÓDULO 1: INFORMAÇÕES GERAIS</b>	
1	Nome: _____
2	Telefone: _____ CEL: _____ Idade: _____
3	Possui filhos? ( ) sim ( ) não
4	Quantos filhos? _____
5	Renda pessoal (mês anterior): ou em salários mínimos R\$ _____ <input type="checkbox"/> Sem rendimento <input type="checkbox"/> Até 1 salário mínimo <input type="checkbox"/> Entre 1 e 3 SM <input type="checkbox"/> Entre 3 e 5 SM <input type="checkbox"/> Mais de 5 SM
6	Renda familiar (mês anterior) (toda família): ou em salários mínimos R\$ _____ <input type="checkbox"/> Sem rendimento <input type="checkbox"/> Até 1 salário mínimo (SM) <input type="checkbox"/> Entre 1 e 3 SM <input type="checkbox"/> Entre 3 e 5 SM <input type="checkbox"/> Mais de 5 SM

MÓDULO 2: CONDIÇÕES DE SAÚDE	
1	<p>Fuma (cigarro, charuto, etc.)?</p> <p><input type="checkbox"/> Nunca fumou (pule para Q3)</p> <p><input type="checkbox"/> Já fumou e não fuma atualmente</p> <p><input type="checkbox"/> Fuma atualmente</p> <p>Quantos cigarros por dia? _____</p>
2	<p>Qual o tipo de cigarro?</p> <p>_____</p>
3	<p>Você consome bebidas alcoólicas?</p> <p><input type="checkbox"/> Nunca bebeu (pule para Q7)</p> <p><input type="checkbox"/> Já bebeu no passado e atualmente não bebe</p> <p><input type="checkbox"/> Bebe atualmente</p>
4	<p>Quantas doses (1 copo americano cheio) por semana?</p> <p><input type="checkbox"/> Até 2 doses</p> <p><input type="checkbox"/> Entre 2 e 7 doses</p> <p><input type="checkbox"/> Acima de 7 doses</p>
5	<p>No ato de beber, acontece de beber grande quantidade de uma vez só?</p> <p><input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim</p>
6	<p>Qual o tipo de bebida alcoólica que você consome com maior frequência?</p> <p><input type="checkbox"/> Cerveja</p> <p><input type="checkbox"/> Cachaça</p> <p><input type="checkbox"/> Vinho</p> <p><input type="checkbox"/> Destilados em geral</p> <p><input type="checkbox"/> Outras: _____</p>



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 <input type="checkbox"/> estresse <input type="checkbox"/> ansiedade	<input type="checkbox"/> Lacrimejamento <input type="checkbox"/> Tonturas/Vertigens  <input type="checkbox"/> Tosse <input type="checkbox"/> Falta de ar/dispneia <input type="checkbox"/> Visão turva <input type="checkbox"/> Tremores <input type="checkbox"/> Vômitos  <input type="checkbox"/> Dor articulações <input type="checkbox"/> falta de memória <input type="checkbox"/> dor no peito	<input type="checkbox"/> Dor de cabeça <input type="checkbox"/> Suor excessivo  <input type="checkbox"/> Salivação  <input type="checkbox"/> Agitação/irritabilidade <input type="checkbox"/> Formigamento <input type="checkbox"/> Palpitação cardíaca <input type="checkbox"/> Câimbras <input type="checkbox"/> Dor no corpo (musculatura) <input type="checkbox"/> fraqueza
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 <input type="checkbox"/> hipotireoidismo <input type="checkbox"/> hipertireoidismo	<input type="checkbox"/> Hepatite  <input type="checkbox"/> Doenças ósseas <input type="checkbox"/> Doenças renais <input type="checkbox"/> Doença respiratória <input type="checkbox"/> Déficit de atenção <input type="checkbox"/> Abortamentos <input type="checkbox"/> obesidade <input type="checkbox"/> síndrome metabólica <input type="checkbox"/> doenças auto-imunes	<input type="checkbox"/> Depressão <input type="checkbox"/> Doenças cardiovasculares <input type="checkbox"/> Câncer <input type="checkbox"/> Hiperatividade <input type="checkbox"/> Déficit de atenção <input type="checkbox"/> hipoglicemia <input type="checkbox"/> diabetes
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 depressão	<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?	<input type="checkbox"/> semanal	<input type="checkbox"/> mensal
		<input type="checkbox"/> quinzenal	<input type="checkbox"/> não
14	Pratica atividade física?	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
15	Pratica atividade física sob exposição solar?	<input type="checkbox"/> Mais que 2 horas na semana	<input type="checkbox"/> Em média, 30 minutos na semana
		<input type="checkbox"/> Em média, 2 horas na semana	<input type="checkbox"/> Não pratica
		<input type="checkbox"/> Em média, 1 hora na semana	
16	No trabalho, quantas horas, por dia, você é exposto à luz solar?	<input type="checkbox"/> 0 horas <input type="checkbox"/> até 1 hora <input type="checkbox"/> de 1h a 4 horas <input type="checkbox"/> a partir de 5 horas	

17	No geral, como você avalia a sua saúde?	<input type="checkbox"/> muito boa <input type="checkbox"/> boa <input type="checkbox"/> regular <input type="checkbox"/> ruim <input type="checkbox"/> muito ruim
18	Fez ou faz tratamento com psiquiatra ou teve Internação por problema de saúde mental?  __  Sim  __  Não	
19	Usa Plantas medicinais?  __  Sim  __  Não	Se sim, Quais? _____
20	Usa outras práticas integrativas e complementares?  __  Sim  __  Não	

## ANEXOS

**Anexo 1:** autorização do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Espírito Santo, sob o número 1.574.160/2016.

<b>CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE/UFES</b>										
<b>PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP</b>										
<b>DADOS DO PROJETO DE PESQUISA</b>										
<b>Título da Pesquisa:</b> 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										
<b>Pesquisador:</b> ADRIANA MADEIRA ALVARES DA SILVA										
<b>Área Temática:</b> Genética Humana; (Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);										
<b>Versão:</b> 3										
<b>CAAE:</b> 52830216.5.0000.5060										
<b>Instituição Proponente:</b> CENTRO DE CIENCIAS AGRARIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO										
<b>Patrocinador Principal:</b> Financiamento Próprio										
<b>DADOS DO PARECER</b>										
<b>Número do Parecer:</b> 1.574.160										
<b>Apresentação do Projeto:</b>										
<b>Pesquisador responsável:</b> ADRIANA MADEIRA ALVARES DA SILVA										
<b>Instituição:</b> CENTRO DE CIENCIAS AGRARIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPIRITO SANTO-CCA-UFES										
<b>Finalidade:</b> PPSUS										
<b>Curso:</b> Biologia/Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia/RENORBIO da UFES										
<b>JUSTIFICATIVA:</b> 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 à										
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 2px;"><b>Endereço:</b> Av. Marechal Campos 1468</td> <td style="padding: 2px;"><b>CEP:</b> 29.040-091</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;"><b>Bairro:</b> SM</td> <td style="padding: 2px;"><b>Município:</b> VITORIA</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;"><b>UF:</b> ES</td> <td style="padding: 2px;"><b>E-mail:</b> cep@ccs.ufes.br</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;"><b>Telefone:</b> (27)3335-7211</td> <td></td> </tr> </table>			<b>Endereço:</b> Av. Marechal Campos 1468	<b>CEP:</b> 29.040-091	<b>Bairro:</b> SM	<b>Município:</b> VITORIA	<b>UF:</b> ES	<b>E-mail:</b> cep@ccs.ufes.br	<b>Telefone:</b> (27)3335-7211	
<b>Endereço:</b> Av. Marechal Campos 1468	<b>CEP:</b> 29.040-091									
<b>Bairro:</b> SM	<b>Município:</b> VITORIA									
<b>UF:</b> ES	<b>E-mail:</b> cep@ccs.ufes.br									
<b>Telefone:</b> (27)3335-7211										

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA  
SAÚDE/UFES**



Continuação do Parecer: 1.574.160

hipovitaminose D. A reposição desta vitamina é simples, pois sendo o sol uma fonte inesgotável de obtenção e de baixo custo, mesmo na necessidade de suplementação vitamínica. Níveis anormais de vitamina D estão relacionados ao câncer, depressão, obesidade, diabetes e outras condições de alto custo para o SUS. Assim como a vitamina D, o Receptor do Glicocorticoide (GR), também está correlacionado com câncer, depressão e obesidade. Ele é sujeito à metilação e perde a função de controle do stress.

**OBJETIVO PRINCIPAL:** Avaliar o impacto da implantação de um programa de educação e capacitação dos agentes do SUS quanto ao estado nutricional de vitamina D e sua relação com obesidade, depressão e câncer georreferenciado, além de investigar a prevalência de hipovitaminose D e doenças correlacionadas, além disso, pretendemos realizar averiguação da metilação do GR e sua correlação com as doenças.

**LOCAL DO ESTUDO:** Agentes de Unidade Básicas de Saúde do SUS e indivíduos da cidade e do campo na região do Caparaó Capixaba.

**INTERVENÇÃO/PROCEDIMENTOS:** Será realizada avaliação bioquímica, antropométrica, alimentar e socioeconômica da população da cidade e do campo para a obtenção dos dados de prevalência. A avaliação socioeconômica, de saúde e estilo de vida será feita por meio da aplicação de questionário junto à população, serão averiguadas 300 pessoas na zona urbana e 300 na zona rural. Para a antropometria, serão aferidos peso, altura e circunferência da cintura (CC), segundo SISVAN. Será feito o cálculo do Índice de Massa Corpórea (IMC) e classificação quanto ao estado nutricional baseada nos pontos de corte da OMS. A avaliação bioquímica consistirá na determinação dos níveis séricos de vitamina D, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), parâmetros bioquímicos séricos e hemograma completo por kits comerciais para automação, a análise molecular será por extração do DNA, com posterior determinação da metilação do gene Receptor de Glicocorticoide. A avaliação do consumo alimentar de vitamina D será feita por meio de Questionário de Frequência de Consumo Alimentar (QFA). Para a avaliar do estado de depressão será aplicado o Inventário de Beck de autoavaliação, com 21 itens, cuja intensidade varia de 0 a 3. O stress será avaliado pelo inventário de Lipp segundo protocolo. Os casos de câncer atendidos pelo HECI desde 2010 serão tabulados e georreferenciados.

**BENEFÍCIOS:** Os dados gerados poderão ser utilizados pelo SUS na implantação do programa em

<b>Endereço:</b> Av. Marechal Campos 1468	<b>CEP:</b> 29.040-091
<b>Bairro:</b> S/N	
<b>UF:</b> ES	<b>Município:</b> VITORIA
<b>Telefone:</b> (27)3335-7211	<b>E-mail:</b> cep@ccs.ufes.br

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA  
SAÚDE/UFES**



Continuação do Parecer: 1.574.160

outros municípios, no fomento de políticas públicas de saúde no país e como medida de economia para o SUS, já que índices normais de vitamina D poderiam promover a redução de casos de tumores, depressão e obesidade, doenças consideradas de alto custo. Além disso, a capacitação de profissionais do SUS na região de menor IDH do Estado do Espírito Santo é importante para a melhoria e desenvolvimento da região.

**Objetivo da Pesquisa:**

A proposta tem como objetivo geral avaliar o impacto da implantação de um programa de educação e capacitação dos agentes do SUS quanto ao estado nutricional de vitamina D e sua relação com obesidade, depressão e câncer, bem como investigar a prevalência de hipovitaminose D e suas doenças correlacionadas em grupos de indivíduos da área urbana e rural na região do Caparaó Capixaba, assim como avaliar o status de metilação do gene receptor do glicocorticoide para a possibilidade de utilização como marcador de doenças.

- 1 - Avaliar o impacto da implantação de um programa de educação e capacitação para os agentes SUS sobre o estado nutricional de vitamina D e sua relação com obesidade, depressão e câncer.
- 2 - Envolver os profissionais do SUS em um projeto de investigação da hipovitaminose D e prevalência de suas doenças correlacionadas, na região, de modo que possam se capacitar com benefício para a população atendida.
- 3 - Levantar dados populacionais da região do Caparaó Capixaba quanto à condição socioeconômica, estilo de vida, condições de saúde da população urbana e rural do Caparaó Capixaba e correlacionar com a hipovitaminose D.
- 4 - Realizar a avaliação bioquímica, hematológica, antropométrica e alimentar e relacionar com hipovitaminose D e suas doenças relacionadas.
- 5 - Realizar a análise molecular do gene Receptor de Glicocorticoide (RG) por estudo de metilação e relacionar com depressão, câncer, obesidade e hipovitaminose D e como possível marcador para detecção de depressão e stress.
- 6 - Identificar os casos de câncer na população investigada e caracterizá-los quanto aos casos familiares e não familiares.
- 7 - Georreferenciar os casos de câncer da região por meio dos Registros Hospitalares de Câncer (RHC) do Hospital Evangélico de Cachoeiro de Itapemirim (HECI) e correlacionar a doença com as possíveis causas ambientais como ocupação, acesso à água, uso de agrotóxicos e outros.
- 8 - Realizar avaliação do estado de depressão e stress na população investigada e correlacionar com a hipovitaminose D e a metilação do receptor do glicocorticoide.

**Endereço:** Av. Marechal Campos 1468

**Bairro:** S/N

**CEP:** 29.040-091

**UF:** ES

**Município:** VITORIA

**Telefone:** (27)3335-7211

**E-mail:** cep@ccs.ufes.br

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA  
SAÚDE/UFES**



Continuação do Parecer: 1.574.160

9 – Realizar capacitação continuada para os profissionais do SUS nas áreas de nutrição, com enfoque para vitamina D, obesidade e educação alimentar, além de atividade física; saúde mental e stress e depressão.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

- Riscos: de acordo com a pesquisadora, "População 1: Em relação a população em que serão realizadas a coleta de material biológico e de dados (população urbana e rural), os riscos envolvem os procedimentos usados na coleta de sangue por punção venosa em seringa estéril e descartável, realizada por profissional habilitado. Todos os frascos e tubos receberão uma etiqueta de código de barras para que os pacientes não sejam identificados por seus nomes. Os materiais coletados serão transportados em gelo até o laboratório. Entre os procedimentos, o que causa maior desconforto é o de coleta de sangue, podendo levar a um hematoma local, porém com pequeno risco à saúde. Alguns sujeitos podem sentir um desconforto maior, como alteração da pressão arterial. Para minimizar os riscos a coleta será feita somente por profissionais habilitados e devidamente treinados e a utilização de materiais estéreis e descartáveis. Outro risco inerente ao projeto é a identificação dos indivíduos participantes da pesquisa através dos resultados dos exames e da tabulação de dados. Para minimizar estes riscos, os sujeitos serão identificados por códigos numéricos e a planilha com a tradução dos códigos ficará sob a guarda da pesquisadora responsável. Ainda assim existe o risco de identificação do sujeito já que os resultados dos exames terão que ser digitados e impressos. Para minimizar este risco, a digitação será feita por uma única pessoa treinada e sob a supervisão da responsável pelo projeto. Durante a coleta, tabulação e impressão dos dados será proibida a permanência com aparelhos celulares ou equipamentos eletrônicos que possibilitem a filmagem ou fotografia dos dados obtidos. População 2: Dos sujeitos do estudo que serão submetidos à avaliação de conhecimentos prévios e treinamento, existe o risco de identificação do sujeito, especialmente no caso dos profissionais contratados em pequeno número. Para se evitar o risco de identificação dos indivíduos, os questionários de avaliação não serão identificados por nomes, pois a análise dos resultados será feita de forma coletiva. Outra forma adotada para a não identificação dos sujeitos e não vazamento de informações será através da tabulação de dados de forma sigilosa, afim de que os piores resultados não sejam identificados. Durante a coleta e tabulação dos dados será proibida a permanência com aparelhos celulares ou equipamentos eletrônicos que possibilitem a filmagem ou fotografia dos dados obtidos. Além disto, para evitar qualquer tipo de constrangimento o sujeito poderá responder quantas questões quiser do questionário e se achar que alguma pergunta é ofensiva poderá deixar de responder ou mesmo se recusar. O sujeito não terá nenhum

**Endereço:** Av. Marechal Campos 1468

**Bairro:** S/N

**CEP:** 29.040-091

**UF:** ES

**Município:** VITORIA

**Telefone:** (27)3335-7211

**E-mail:** cep@ccs.ufes.br

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA  
SAÚDE/UFES**



Continuação do Parecer: 1.574.160

ônus na participação desta pesquisa.”.

- **Benefícios:** de acordo com a pesquisadora, “População 1: Os benefícios imediatos decorrentes desta pesquisa para os indivíduos que se dispuserem a participar serão o fornecimento dos resultados dos exames realizados, além de informações e orientações quanto ao conteúdo dos exames e encaminhamento para os profissionais qualificados. Esses resultados poderão beneficiar, no futuro, outras pessoas e a ciência. Os dados secundários gerados pela pesquisa não beneficiarão diretamente os sujeitos da pesquisa. População 2: O benefício direto decorrente da pesquisa para essa população será a realização de atividades educativas propostas no projeto, que capacitarão os profissionais de saúde do SUS e o fornecimento dos certificados de participação/capacitação nos referidos cursos. Esses resultados também poderão beneficiar, no futuro, outras pessoas e a ciência. Os dados secundários gerados pela pesquisa não beneficiarão diretamente os sujeitos da pesquisa.”.

- Os riscos e benefícios, conforme descritos pelo pesquisador, atendem as exigências da Resolução CNS n° 466/12.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Projeto de pesquisa potencialmente relevante, com benefícios previstos prevalecendo sobre os riscos.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

- A folha de rosto está adequada;
- o projeto de pesquisa está adequado;
- o TCLE está adequado;
- o orçamento é apresentado de forma adequada;
- os documentos autorizando o desenvolvimento do projeto na instituição/uso de dados são apresentados.

**Recomendações:**

Antes de submeter ou resubmeter seu projeto de pesquisa para o CEP verifique as recomendações abaixo:

Alguns projetos encaminhados ao CEP têm apresentado problemas que tem dificultado a apreciação dos mesmos, atrasando a emissão do parecer e sobrecarregando o colegiado com o grande número de projetos com pendências. Desta forma, o CEP, vem por meio desse encaminhar algumas recomendações, baseadas na RESOLUÇÃO CNS N° 466, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2012 a

**Endereço:** Av. Marechal Campos 1468

**Bairro:** S/N

**CEP:** 29.040-091

**UF:** ES

**Município:** VITORIA

**Telefone:** (27)3335-7211

**E-mail:** cep@ccs.ufes.br



**CENTRO DE CIÊNCIAS DA  
SAÚDE/UFES**



Continuação do Parecer: 1.574.160

serem observadas para agilizar a avaliação dos projetos.

1. De acordo com a referida resolução, XI.2 "Cabe ao pesquisador: a) apresentar o protocolo devidamente instruído ao CEP ou à CONEP, aguardando a decisão de aprovação ética, antes de iniciar a pesquisa", ou seja, **NENHUMA ETAPA DA PESQUISA QUE ENVOLVA QUALQUER CONTATO COM OS PARTICIPANTES OU SEUS DADOS PODE SER INICIADA ANTES DA APROVAÇÃO DO CEP.**
2. A res. CNS 466/12 dispõe: "V – DOS RISCOS E BENEFÍCIOS; Toda pesquisa com seres humanos envolve risco em tipos e gradações variados", portanto o pesquisador deverá prever quais situações poderão atingir física ou mentalmente um sujeito. Questionários, por exemplo, podem demandar tempo, causar constrangimento, fazer a pessoa a reviver experiências que podem causar sofrimento psíquico, causar ansiedade, expor informações de um grupo ou comunidade específica, etc. Assim o pesquisador deverá, em todo tipo de projeto, relatar os possíveis riscos mesmo que mínimos, e também as providências e cautelas a serem empregadas para evitar e/ou reduzir os riscos citados.
3. O cronograma deve prever o tempo para os trâmites no CEP. Deve-se considerar a possibilidade do projeto não ser aprovado na primeira avaliação e possuir pendências, além do calendário de reuniões. Dessa forma, o projeto depois de adaptado terá que ser novamente avaliado. Isso pode acarretar em atrasos. Assim, nunca deixe para submeter o projeto, contanto com a aprovação na primeira avaliação.
4. Cumprir com rigor as exigências da Res. CNS 466/12, IV, que trata do Consentimento Livre e Esclarecido. Foi disponibilizado um modelo de TCLE pelo CEP – CCS/UFES a fim de auxiliar na elaboração do referido documento.
5. Verificar se o projeto está sendo vinculando ao CCS, pois caso contrário o projeto pode ser encaminhado para outro CEP/UFES.
6. A Folha de Rosto que deverá ser digitalizada e anexada ao protocolo será gerada pela plataforma. Não usar o modelo disponível no site do CONEP.
7. Caso tenha alguma dificuldade em utilizar a Plataforma Brasil (como inclusão de anexo, etc), sugerimos mudar de navegador.
8. Informar e comprovar a existência de Biorrepositório ou Biobanco. A não comprovação inviabiliza a aprovação do projeto.
9. Caso o acesso aos participantes ocorra em local diferente da instituição proponente, uma carta de anuência assinada pelo responsável por este local precisa ser apresentada — por exemplo, hospital, unidade de saúde, escola, asilo, creche, etc.

**Endereço:** Av. Marechal Campos 1468

**Bairro:** S/N

**UF:** ES

**Telefone:** (27)3335-7211

**Município:** VITÓRIA

**CEP:** 29.040-091

**E-mail:** cep@ccs.ufes.br

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA  
SAÚDE/UFES**



Continuação do Parecer: 1.574.160

10. Caso no projeto conste o uso de dados secundários, como prontuários médicos ou outros bancos de dados do tipo, uma carta de anuência assinada pelo responsável pelos dados precisa ser apresentada. Neste caso, ainda é obrigatório a apresentação de um termo de sigilo, privacidade e confidencialidade assinado pelo pesquisador responsável pelo projeto proposto.

11. O orçamento detalhado precisa ser apresentado, independentemente se o projeto caracteriza-se como "financiamento próprio" ou não.

**ALGUNS DOCUMENTOS IMPORTANTES**

- Resolução CNS nº 466/12 — diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos

<http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/2012/Reso466.pdf>

- Resolução CNS nº 441/11 — armazenamento e utilização de material biológico humano com finalidade de pesquisa (Biorrepositório ou Biobanco).

<http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/2011/Reso441.pdf>

- Modelo para elaboração do TCLE preparado pelo CEP/CCS/UFES

<http://ccs.ufes.br/sites/ccs.ufes.br/files/Modelo%20de%20TCLE.pdf>

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Todas as pendências foram adequadas. O projeto está de acordo com as exigências d sistema CEP/CONEP, de acordo com a Resolução do CNS 466/12.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_657299.pdf	30/05/2016 11:49:14		Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	cartaresposta2.pdf	30/05/2016 11:39:48	ADRIANA MADEIRA ALVARES DA SILVA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ppsusVitDV3.pdf	30/05/2016 11:35:31	ADRIANA MADEIRA ALVARES DA SILVA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEPPSUS_AG.docx	30/05/2016 11:35:10	ADRIANA MADEIRA ALVARES DA SILVA	Aceito
TCLE / Termos de	TCLEPPSUS_BIO.docx	30/05/2016	ADRIANA MADEIRA	Aceito

**Endereço:** Av. Marechal Campos 1468

**Bairro:** S/N

**CEP:** 29.040-091

**UF:** ES

**Município:** VITORIA

**Telefone:** (27)3335-7211

**E-mail:** cep@ccs.ufes.br

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA  
SAÚDE/UFES**



Continuação do Parecer: 1.574.160

Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEPPSUS_BIO.docx	11:34:59	ALVARES DA SILVA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	anunicipios0001.pdf	16/05/2016 09:45:36	ADRIANA MADEIRA ALVARES DA SILVA	Aceito
Outros	RHC.pdf	16/05/2016 09:43:31	ADRIANA MADEIRA ALVARES DA SILVA	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	biorreppsus_1.pdf	29/01/2016 10:11:35	ADRIANA MADEIRA ALVARES DA SILVA	Aceito
Folha de Rosto	folhappsusass_1.pdf	29/01/2016 10:11:17	ADRIANA MADEIRA ALVARES DA SILVA	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

VITÓRIA, 03 de Junho de 2016

Assinado por:  
**Cynthia Furst Leroy Gomes Bueloni**  
(Coordenador)

**Endereço:** Av. Marechal Campos 1468

**Bairro:** S/N

**CEP:** 29.040-091

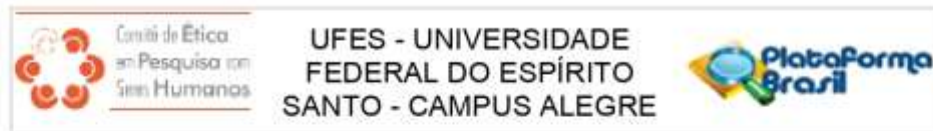
**UF:** ES

**Município:** VITÓRIA

**Telefone:** (27)3335-7211

**E-mail:** cep@ccs.ufes.br

**Anexo 2:** autorização do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Espírito Santo, sob o número 3.420.734/2019.



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação epigenética dos genes BDNF e NR3C1 e a relação com a Segurança Alimentar e Nutricional, a saúde e o estilo de vida de adultos, usuários do SUS

**Pesquisador:** Wagner Miranda Barbosa

**Área Temática:**

**Versão:** 4

**CAAE:** 08454919.5.0000.8151

**Instituição Proponente:** COORDENACAO ADMINISTRATIVA DO SUL DO ESPIRITO SANTO - CASES -

**Patrocinador Principal:** FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESPIRITO SANTO - FAPES  
CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E  
TECNOLOGICO-CNPQ

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.420.734

#### Apresentação do Projeto:

O projeto aborda problemas que interferem na oferta de alimentos, no acesso físico e econômico, no consumo ou no padrão de sua utilização biológica, resultando em situação de (IN)Segurança Alimentar e Nutricional (INSAN) e comprometimento do estado de saúde e bem-estar, o que pode levar ao desenvolvimento de doenças e agravos endêmicos. Tais agravos envolvem tanto situações carenciais como desnutrição e deficiências nutricionais específicas quanto situações relacionadas à ingestão calórica excessiva, como a obesidade e seus desdobramentos, e as associações com outras doenças crônicas de reconhecida relevância epidemiológica. O comprometimento do estado nutricional e de saúde relaciona-se com os hábitos de vida de forma bidirecional e a investigação sociodemográfica deve ser realizada nos estudos de saúde. Tanto as situações de agravos à saúde quanto as de comprometimento do acesso às necessidades básicas estão diretamente relacionadas ao estresse psicossocial e este, por sua vez, ao maior risco de ansiedade, depressão e outras alterações psiquiátricas. Pesquisas em epigenética tem despontado nos últimos tempos, de modo que a epigenética tem sido reconhecida como a resposta do indivíduo ao ambiente no sentido de adaptação por meio da expressão diferencial de genes, ou seja, são modificações que afetam a expressão gênica decorrentes de alterações como metilação e acetilação das caudas de histonas e metilação do DNA, que acabam por aumentar ou reduzir a expressão gênica. Alterações na

**Endereço:** Alto Universitário, s/n, Guararema

**Bairro:** CENTRO

**CEP:** 29.500-000

**UF:** ES

**Município:** ALEGRE

**Telefone:** (28)3552-8771

**E-mail:** cep.alegre.ufes@gmail.com



Continuação do Parecer: 3.420.734

metilação do DNA têm sido sugeridas como possíveis moduladoras da saúde a longo prazo em resposta a eventos ambientais e que podem ser passadas para as gerações futuras. Considerando que o estudo da regulação epigenética auxilia na compreensão do comportamento fisiológico, bem como a etiologia dessas doenças consideradas limitantes, complexas e multifatoriais, este projeto pretende investigar, na população usuária do SUS (400 indivíduos recrutados), o perfil de metilação dos genes NR3C1 e BDNF e a sua relação com o estado de saúde, de (IN)Segurança Alimentar e Nutricional (INSAN) e com o estilo de vida (consumo alimentar, hábito tabagista e etilista). A proposta busca, por meio de análises epigenéticas, possíveis marcadores do estado de saúde, INSAN, padrão alimentar e estilo de vida para a melhor compreensão, prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças. Para tanto, a pesquisa será realizada com indivíduos adultos usuários do SUS e a coleta de dados (a ser realizada somente após aprovação do CEP/Alegre/UFES), se dará por meio de entrevista individual, com aplicação de questionários de avaliação socioeconômica, de INSAN, de saúde e estilo de vida. Além da entrevista, será feita avaliação antropométrica, aferição da pressão arterial e coleta de sangue para análises bioquímicas e moleculares.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

De acordo com o pesquisador responsável, os objetivos da pesquisa são: "Objetivo Primário: Investigar, na população usuária do SUS, o perfil de metilação dos genes NR3C1 e BDNF e a sua relação com o estado de saúde, de Insegurança Alimentar e Nutricional (INSAN) e com o estilo de vida (relato de estresse e ansiedade como traço de personalidade, consumo alimentar, hábito tabagista e etilista)"; e "Objetivo Secundário: Avaliar as condições socioeconômicas da população pesquisada; Avaliar prevalência de Insegurança alimentar e nutricional; Avaliar o consumo alimentar e identificar hábitos alimentares; Realizar avaliação antropométrica; Avaliar a pressão arterial; Avaliar a prevalência de sintomas de depressão; Investigar hábito tabagista e etilista; Realizar avaliação bioquímica; Avaliar alterações moleculares relacionadas ao perfil de metilação dos genes NR3C1 e BDNF; Investigar a associação entre a metilação dos genes NR3C1 e BDNF, o estado nutricional e de saúde, de INSAN e o estilo de vida da população."

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

De acordo com o pesquisador responsável, os riscos e benefícios da pesquisa são: "Riscos: O risco proveniente da avaliação proposta (socioeconômica/ de saúde, hábitos de vida e de insegurança alimentar e nutricional) seria o possível constrangimento dos participantes durante a aplicação dos questionários de avaliação socioeconômica, de hábitos alimentares, de condições de saúde e estilo de vida. Os participantes

<b>Endereço:</b> Alto Universitário, s/n, Guararema	<b>CEP:</b> 29.500-000
<b>Bairro:</b> CENTRO	
<b>UF:</b> ES	<b>Município:</b> ALEGRE
<b>Telefone:</b> (28)3552-8771	<b>E-mail:</b> cep.alegre.ufes@gmail.com



Continuação do Parecer: 3.420.734

serão informados que poderão responder quantas questões quiserem dos questionários e, se acharem que alguma pergunta é ofensiva poderão deixar de responder ou mesmo recusar. Durante a coleta do sangue, o paciente pode sentir um pouco de dor ou apresentar um hematoma (mancha roxa) no braço, no local onde for inserida a agulha. É possível, mas não provável, que o paciente apresente inchaço ou sangramento no local da punção. Pode também ocorrer um mal-estar relacionado a agulhas. É improvável que ocorram danos físicos a partir da coleta de sangue. Se estes danos ou outros danos ocorrerem resultantes da participação no estudo, o paciente será tratado pelos profissionais da equipe, terá assistência integral, bem como manterá seus direitos legais, incluindo o direito de procurar obter indenização por danos eventuais. Para minimizar os riscos da ocorrência de inchaços/hematomas durante a coleta sanguínea, o paciente será orientado a não se movimentar durante o procedimento, o que evitaria qualquer erro no momento da punção. Além disso, será explicado que não é recomendável massagear o local da picada, pois ao invés de ajudar a diminuir o desconforto, irá facilitar o surgimento de hematomas na região. O paciente também será orientado a retirar qualquer acessório, como pulseiras e relógios, e evitar usar roupas que possam apertar o braço. Ademais, será recomendado que ele não faça qualquer exercício físico ou pegue peso com o braço no qual foi feita a coleta de sangue por pelo menos uma hora. O paciente também será aconselhado no caso de aparecimento de hematomas e/ou inchaço, para que as lesões desapareçam mais facilmente. As recomendações serão: aplicar gelo no local ou usar cremes específicos com orientação médica. Em relação aos dados de prontuários que farão parte do estudo, sempre existe risco de identificação e vazamento de informação sigilosa do paciente. Para minimizar os riscos, este levantamento será feito por colaboradores de dentro das instituições envolvidas, o prontuário não sairá da UFES e as equipes de pesquisa receberão apenas uma planilha identificada numericamente sem o nome ou qualquer identificação do paciente. Durante a coleta de dados será proibida a permanência com aparelhos celulares ou equipamentos eletrônicos que possibilitem a filmagem ou fotografia dos dados". E: Benefícios: "Como benefício direto, o participante receberá os resultados das avaliações e exames realizados, além de informações e orientações quanto ao conteúdo dos exames e encaminhamento para os profissionais de saúde. Indiretamente, proposta é promissora para a melhoria do comportamento e hábitos alimentares e melhoria do estilo de vida dos adultos participantes do estudo. Para o Sistema Único de Saúde, a pesquisa que tem um aspecto importante de inovação busca justamente a contribuição para a inclusão de soluções de baixo custo para as problemáticas de alto custo. O conhecimento das possíveis deficiências e excessos alimentares constituirão a base para elaboração do programa de educação alimentar e nutricional voltados à adoção de práticas

**Endereço:** Alto Universitário, s/n, Guararema

**Bairro:** CENTRO

**CEP:** 29.500-000

**UF:** ES

**Município:** ALEGRE

**Telefone:** (28)3552-8771

**E-mail:** cep.alegre.ufes@gmail.com



Continuação do Parecer: 3.420.734

saudáveis de alimentação. Os estudos de epigenética propostos no projeto trarão inovação científica para as pesquisas no Estado do Espírito Santo, tanto para alunos, pesquisadores e para a população abrangida."

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

É um projeto com condições de realização, claramente definido e de muita relevância. Pesquisa bem fundamentada. As pendências apontadas pelo CEP foram corrigidas pelo pesquisador.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

- Folha de rosto: apresentada e adequada.
- Projeto detalhado: apresentado e adequado.
- TCLE: apresentado e adequado.
- Termo de anuência da instituição onde a pesquisa será realizada: apresentado e adequado.
- Questionários: apresentados e adequados.
- Regulamento do biorrepositório: apresentado e adequado.
- Cronograma: apresentado e adequado.
- Orçamento: apresentado e adequado.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não há pendências. As pendências apontadas pelo CEP foram corrigidas pelo pesquisador.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

1. O CEP/Alegre/UFES deverá ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo.
2. Caso a pesquisa seja suspensa ou encerrada antes do previsto, o CEP/Alegre/UFES deverá ser comunicado, estando os motivos expressos no relatório final a ser apresentado.
3. O TCLE deverá ser obtido em duas vias, uma ficará com o pesquisador e a outra com o sujeito de pesquisa.
4. Em conformidade com a Carta Circular nº.003/2011CONEP/CNS, faz-se obrigatória a rubrica em todas as páginas do TCLE pelos participantes de pesquisa ou seu responsável e pelo pesquisador.
5. Em muitos estudos, para que os benefícios aos participantes sejam efetivos, posteriormente à realização da pesquisa, é de grande importância o pesquisador retornar à Instituição onde foi realizada a pesquisa e apresentar os resultados e conclusões.

**Endereço:** Alto Universitário, s/n, Guararema

**Bairro:** CENTRO

**UF:** ES

**Município:** ALEGRE

**CEP:** 29.500-000

**Telefone:** (28)3552-8771

**E-mail:** cep.alegre.ufes@gmail.com



Continuação do Parecer: 3.420.734

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1301171.pdf	26/06/2019 14:16:09		Aceito
Parecer Anterior	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_3415067.pdf	26/06/2019 14:14:39	Wagner Miranda Barbosa	Aceito
Outros	CARTA_RESPOSTA.pdf	26/06/2019 14:14:11	Wagner Miranda Barbosa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_vs_3.pdf	27/05/2019 14:41:47	Wagner Miranda Barbosa	Aceito
Brochura Pesquisa	Projeto_brochura__Etica_vs2.pdf	23/05/2019 17:25:23	Wagner Miranda Barbosa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_vs_2.pdf	23/05/2019 17:24:18	Wagner Miranda Barbosa	Aceito
Parecer Anterior	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_3299029.pdf	23/05/2019 17:23:53	Wagner Miranda Barbosa	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_brochura__Etica.pdf	23/05/2019 17:20:53	Wagner Miranda Barbosa	Aceito
Outros	Lattes_Suzanny_Mendes.pdf	23/05/2019 17:07:07	Wagner Miranda Barbosa	Aceito
Outros	termo_flavia.pdf	02/04/2019 18:04:57	Wagner Miranda Barbosa	Aceito
Outros	lattes_Elizeu_Batista.pdf	29/03/2019 17:08:04	Wagner Miranda Barbosa	Aceito
Outros	Lattes_Tamires_Vieira.pdf	29/03/2019 17:07:39	Wagner Miranda Barbosa	Aceito
Outros	Lattes_Flavia.pdf	29/03/2019 17:07:13	Wagner Miranda Barbosa	Aceito
Outros	Lattes_Anderson_Barros.pdf	29/03/2019 17:05:02	Wagner Miranda Barbosa	Aceito
Outros	Lattes_Adriana_Madeira.pdf	29/03/2019 17:03:58	Wagner Miranda Barbosa	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	29/03/2019 16:45:09	Wagner Miranda Barbosa	Aceito
Outros	anuencia_assinado.pdf	29/03/2019 16:40:52	Wagner Miranda Barbosa	Aceito
Outros	biorrepositorio.pdf	29/03/2019 16:39:05	Wagner Miranda Barbosa	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	22/02/2019 12:27:29	Wagner Miranda Barbosa	Aceito
Outros	termo_de_sigilo.pdf	22/02/2019	Wagner Miranda Barbosa	Aceito

Endereço: Alto Universitário, s/n, Guararema

Bairro: CENTRO

CEP: 29.500-000

UF: ES

Município: ALEGRE

Telefone: (28)3552-8771

E-mail: cep.alegre.ufes@gmail.com





Continuação do Parecer: 3.420.734

Outros	termo_de_sigilo.pdf	12:05:31	Barbosa	Aceito
Outros	questSocioEconSaudeEstVida.pdf	21/02/2019 14:41:05	Wagner Miranda Barbosa	Aceito
Outros	cadIndviDomiciliar.pdf	21/02/2019 14:39:58	Wagner Miranda Barbosa	Aceito
Outros	qfcaeantropometria.pdf	21/02/2019 09:34:16	Wagner Miranda Barbosa	Aceito
Outros	EBIA.pdf	21/02/2019 09:32:11	Wagner Miranda Barbosa	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

ALEGRE, 27 de Junho de 2019

---

Assinado por:  
**JUSSARA MOREIRA COELHO**  
(Coordenador(a))

**Endereço:** Alto Universitário, s/n, Guararema  
**Bairro:** CENTRO **CEP:** 29.500-000  
**UF:** ES **Município:** ALEGRE  
**Telefone:** (28)3552-8771 **E-mail:** cep.alegre.ufes@gmail.com

**Anexo 3:** Termo de consentimento livre esclarecido (TCLE).

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIMENTO

Profa. Dra. Adriana Madeira Álvares da Silva (28) 3552-8624; (28) 99271-9791

#### Dados de Identificação do Voluntário

Nome: \_\_\_\_\_ Sexo: F ( ) M ( ) Data de Nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Fumante ( ) Não Fumante ( ) Endereço: \_\_\_\_\_ Bairro: \_\_\_\_\_ Cidade: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_ Telefones: (\_\_\_\_) \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

**Título do estudo:** “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”

**Natureza e objetivo do estudo:** Você está sendo convidado(a) a participar de um estudo que tem por objetivo avaliar o impacto da implantação de um programa de educação e capacitação dos agentes do SUS quanto ao estado nutricional de vitamina D e sua relação com obesidade, depressão e câncer, bem como investigar a prevalência de hipovitaminose D e suas doenças correlacionadas em grupos de indivíduos da área urbana e rural na região do Caparaó Capixaba, assim como avaliar o status de metilação do gene receptor do glicocorticoide para a possibilidade de utilização como marcador de doenças.

**Local do estudo:** Esse estudo será realizado no Laboratório de Biotecnologia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCA/UFES).

**Procedimentos do estudo:** Para esse estudo você responderá a um questionário sobre os hábitos, ocupação, exposição, presença de depressão, ansiedade e stress. Você terá o **direito** de se recusar a responder as perguntas, se assim achar conveniente. **Serão colhidas amostras:** coleta de sangue através de punção venosa através de utilização de seringa descartável estéril, coletada por profissional habilitado, **com a duração aproximada de 30 minutos.** O material coletado será identificado com código de barras e seu nome não ficará exposto nos tubos e frascos mantendo o **sigilo** de sua identidade, em seguida o material será transportado em gelo e levado ao laboratório de Biotecnologia do CCA/UFES. Depois de utilizadas, as amostras de sangue (soro e plasma) e material genético (DNA e RNA) serão armazenadas no Biorrepositório de Materiais Biológicos do CCA-UFES até o final do estudo.

**Riscos e Benefícios:** Você terá direito de responder quantas questões quiser do questionário e se você achar que alguma pergunta é ofensiva, poderá deixar de responder ou mesmo se recusar. Você sentirá desconforto na coleta de sangue (uma picada de agulha), poderá ficar com o braço roxo no local da picada e sentir alguma dor. Todo o material coletado será analisado no laboratório sob a responsabilidade da Profa. Dra. Adriana Madeira Álvares da Silva, se você assim concordar. O uso e coleta de sua amostra de sangue não implicarão em riscos adicionais para a sua saúde, nem exigirão que você se submeta a qualquer outro procedimento depois. Você não terá nenhum ônus na participação desta pesquisa. Como benefício você receberá os resultados dos exames realizados, além de informações e

orientações quanto ao conteúdo dos exames e encaminhamento para os profissionais qualificados. Esses resultados poderão beneficiar, no futuro, outras pessoas e a ciência.

**Confidencialidade dos registros:** Nesse estudo, todos os frascos e tubos receberão uma etiqueta de código de barras para manutenção de **sigilo**, em conformidade com Resolução 466/12 do CNS, de forma que você, paciente não seja identificado por seu nome. Caso os resultados do estudo sejam publicados ou apresentados em congresso a confidencialidade das informações serão garantidas e sua identidade não será revelada. **Você receberá uma via desse termo, ficando a outra com o pesquisador.**

**Esclarecimento de Dúvidas:** Em caso de dúvida ligue para o pesquisador responsável Profa. Dra. Adriana Madeira Álvares da Silva nos telefones (28) 3552-8622, 3552-8624; (28) 99271-9791. Você poderá retirar o consentimento para pesquisa em qualquer época do estudo. O Comitê de Ética em Pesquisa responsável pela autorização do estudo atende pelo telefone (27) 3335-7211 e o link na internet é [www.ccs.ufes.br/cep](http://www.ccs.ufes.br/cep) - o e-mail é cep.ufes@hotmail.com. O Comitê de Ética em Pesquisa da UFES fica na Rua Marechal Campos, número 1468, Bairro Maruípe, CEP 29.040-090, Centro de Ciências da Saúde (CCS) - Prédio da Direção, Vitória, ES.

Declaro que fui verbalmente informado e esclarecido sobre o teor do presente documento, entendendo todos os termos acima expostos, como também, os meus direitos, e que voluntariamente aceito participar deste estudo. Também declaro ter recebido uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinada pelo(a) pesquisador(a). Autorizo também o uso das informações obtidas na pesquisa em publicações em revista médicas e apresentações em congressos (desde que meus dados de identificação pessoal sejam mantidos em sigilo).

Na qualidade de pesquisador responsável pela 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 Glicocorticoide e avaliação de hipovitaminose D na população da região do Caparaó Capixaba”, eu, ADRIANA MADEIRA ÁLVARES DA SILVA, declaro ter cumprido as exigências do(s) item(s) IV.3 e IV.4 (se pertinente), da Resolução CNS 466/12, a qual estabelece diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.

---

(LOCAL/DATA)

---

Participante da pesquisa

---

Pesquisador colaborador

---

**Pesquisador Principal**  
**Profa. Dra. Adriana Madeira Álvares da Silva**