

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA**

**CRISTIANA CORTES DE OLIVEIRA**

**Marcadores epigenéticos das vias inflamatórias antes e após intervenção  
dietética hipocalórica em mulheres com obesidade grau III**

**Ribeirão Preto  
2022**

**CRISTIANA CORTES DE OLIVEIRA**

**Marcadores epigenéticos das vias inflamatórias antes e após intervenção  
dietética hipocalórica em mulheres com obesidade grau III**

**Versão Original**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências Médicas.

Área de concentração: Clínica Médica

Opção: Investigação Biomédica

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Carla Barbosa Nonino

**Ribeirão Preto**

**2022**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial desde trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

### FICHA CATALOGRÁFICA

Cortes-Oliveira, Cristiana

Marcadores epigenéticos das vias inflamatórias antes e após intervenção dietética hipocalórica em mulheres com obesidade grau III, 2022.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Clínica Médica.

Orientadora: Nonino, Carla Barbosa.

1. Obesidade
2. Intervenção dietética hipocalórica
3. Perda de peso
4. Metilação do DNA
5. Vias inflamatórias

Cristiana Cortes de Oliveira

Marcadores epigenéticos das vias inflamatórias antes e após intervenção dietética hipocalórica em mulheres com obesidade grau III, 2022.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências Médicas.

Área de concentração: Clínica Médica

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

*Dedico esse trabalho aos meus amados pais Júlia e Donizeti (in memoriam) e meus queridos irmãos Natália e Fábio por sempre acreditarem em mim e por toda compreensão, carinho e paciência que sempre me proporcionaram em minha vida pessoal e profissional.*

## AGRADECIMENTOS

*Agradecer a todos que contribuíram de alguma forma no desenvolvimento desse trabalho é um dos pontos mais importantes que considero nesses anos de doutorado. Me lembro que ao finalizar minha dissertação em 2015 eu carregava comigo o último conselho que meu amado pai me deu poucos dias antes de falecer “Trabalhe no lugar certo e com as pessoas certas, o sucesso vem com o tempo”, e hoje não consigo pensar em algo com mais sentido que essa frase. Dentro do LEN (o lugar certo) pude conhecer as pessoas certas para que mais um sonho pudesse ser realizado!*

*Agradeço a todos de coração por todo apoio que recebi em mais uma etapa da minha vida.*

*Agradeço...*

*À Deus por me ensinar a acreditar em mim mesma e sempre me dar forças e sabedoria para seguir o melhor caminho.*

*Aos meus pais Júlia e Donizeti que sempre acreditaram nos meus sonhos e me proporcionaram oportunidades de crescimento em todos os sentidos.*

*Aos meus irmãos Natália e Fábio e ao Marco Valério por me darem apoio e por todo carinho que tiveram comigo nessa parte da minha história.*

*À minha querida orientadora Profa Dra Carla Barbosa Nonino, a qual confiou em mim desenvolver esse lindo trabalho e me proporcionou muitos momentos de aprendizado, grandes experiências, amizade, compreensão e me permitiu fazer parte de*

*um grupo de extrema qualificação como a equipe do Laboratório de Estudos em Nutrigenômica (LEN). Muito obrigada de coração por acreditar em mim!*

*À Dra Carolina Nicoletti que com todo seu conhecimento sobre genômica nutricional pude aprender e desenvolver essa tese com muito carinho e dedicação. Carol você foi muito importante não somente no desenvolvimento desse trabalho, mas também por muitas decisões na minha vida pessoal, as quais sempre lembrarei de você!*

*Aos meus grandes amigos Bruno e Marcela, que desde o início dessa caminhada acadêmica sempre estiveram do meu lado me apoiando, me ajudando e mostrando que a amizade de vocês será para o resto da minha vida!*

*Aos meus queridos amigos do LEN, Flávia Campos, Leticia Wolf, Caroline Welendorf, Bruna Moraes, Luzania Martins, Heitor Bernardes, Gabriel Franco e Natália Yumi por sempre me apoiarem e me ajudarem com ótimos momentos a trilhar nessa caminhada acadêmica.*

*Ao Dr Sérgio Marchini e toda a equipe da Nutrologia por me ajudarem muito na coleta de dados para o desenvolvimento desse trabalho. Meu coração é imensamente grato ao Dr Sérgio, pois com ele aprendi que o “saber conversar” é uma das principais dádivas que o ser humano carrega consigo e devemos saber usufruir da melhor forma possível!*

*Ao Centro de Medicina Genômica pela disponibilidade em auxiliar nas técnicas de biologia molecular.*

*Às enfermeiras por toda assistência fornecida durante o período de hospitalização e coleta de dados das pacientes do presente trabalho.*

*Às participantes do estudo pela disponibilidade, dedicação, compromisso e paciência para realização de todas as coletas de dados.*

*Ao meu namorado Lucas Gomes, que mesmo entrando na minha vida na reta final desse trabalho foi imprescindível para me dar todo o gás para finalizar essa etapa da minha vida. Obrigada por acreditar em mim e por todo apoio, carinho e amor que tem me dado nesses últimos meses.*

*Aos meus vários amigos que de alguma maneira me ajudaram, me apoiaram ou me proporcionaram momentos importantes no meu crescimento pessoal.*

*Ao secretário Emerson Quirino de Oliveira do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP pela atenção e auxílio no decorrer desses anos de doutorado.*

*À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento do meu projeto por meio de bolsa de doutorado e auxílio à pesquisa regular. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.*

*“Trabalhe no lugar certo e com as pessoas certas. As conquistas surgem com o tempo.”*

*(Donizeti Aparecido de Oliveira - in memoriam)*

*Resumo*

## RESUMO

CORTES-OLIVEIRA, C. **Marcadores epigenéticos das vias inflamatórias antes e após intervenção dietética hipocalórica em mulheres com obesidade grau III, 2021.** Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2022.

A nutrição personalizada tem como objetivo fornecer uma intervenção nutricional direcionada e adaptada ao genoma do indivíduo. As modificações de metilação do DNA podem ser dinâmicas em decorrência de estímulos ambientais ou podem ser estáveis e passadas para as próximas gerações. As marcas epigenéticas podem ser modificadas e, o entendimento dos fatores envolvidos nessas modificações pode ser crucial para a prevenção e/ou tratamento de doenças. O objetivo do presente estudo foi identificar as modificações no padrão de metilação do DNA envolvidos com as vias da inflamação após intervenção dietética hipocalórica em mulheres com obesidade grau III e compará-las com mulheres com peso normal. Tratou-se de um estudo longitudinal, no qual foram coletadas medidas antropométricas de peso, estatura, índice de massa corporal (IMC) e circunferência abdominal (CA), composição corporal (massa corporal magra (MCM) e massa gorda (MG)) por bioimpedância elétrica e análise de metilação do DNA. Houve diminuição significativa do peso, IMC, massa corporal magra e massa gorda após intervenção dietética. Ao comparar os dois grupos do estudo, verificou-se diferença significativa para os indicadores de peso, IMC, CA, MCM e MG, tanto no momento antes como após intervenção dietética. Verificou-se que 16.064 sítios CpGs tiveram seus níveis de metilação modificados após intervenção dietética, sendo que 1.324 sítios CpG foi diferente entre pacientes com obesidade antes da intervenção e mulheres com peso normal e, após a intervenção dietética, 78.596 sítios CpGs foram diferentes. Do total de CpGs que modificaram os níveis de metilação após intervenção dietética, 19 estavam em genes relacionados às vias da inflamação, sendo que 9 CpGs tiveram seus níveis de metilação reduzidos e 10 CpGs aumentados. Observou-se correlações positivas entre os níveis de metilação do DNA de CpGs nos genes *CCL24*, *NFKB2* e *RIPK2* antes da intervenção dietética com o percentual de perda de peso e com as variações das concentrações de colesterol total, AST e ALT após intervenção dietética. A análise de regressão linear múltipla evidenciou contribuição dos níveis de metilação da cg25634545 no gene *NFKB2* no momento antes da intervenção na variação das concentrações de colesterol total com a intervenção dietética, mesmo após ajustado para idade, perda de peso (%) e perda de MG. Conclui-se que a intervenção dietética hipocalórica proporciona perda de peso, diminuição de medidas antropométricas e é capaz de alterar os níveis de metilação do DNA de genes relacionados as vias inflamatórias, evidenciando diminuição da metilação de genes relacionados ao aumento do processo de inflamação.

**Palavras chaves:** Obesidade. Intervenção dietética hipocalórica. Perda de peso. Metilação do DNA. Vias inflamatórias.

*Abstract*

## ABSTRACT

CORTES-OLIVEIRA, C. **Epigenetic markers of inflammatory pathways before and after hypocaloric dietary intervention in women with grade III obesity, 2021. Thesis (Doctorate)** – Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo. Ribeirão Preto, 2021.

Personalized nutrition aims to provide a targeted nutritional intervention adapted to the individual's genome. DNA methylation changes can be dynamic due to environmental stimuli or they can be stable and passed on to the next generations. Epigenetic marks can be modified and the understanding of the factors involved in these changes can be crucial for the prevention and/or treatment of diseases. The aim of the present study was to identify changes in the DNA methylation pattern involved with inflammation pathways after hypocaloric dietary intervention in women with grade III obesity and to compare them with women with normal weight. This was a longitudinal study, in which were collected anthropometric measurements of weight, height, body mass index (BMI) and waist circumference (WC), body composition (lean body mass (MCM) and fat mass (MG)) by electrical bioimpedance and DNA methylation analysis. There was a significant decrease in weight, BMI, lean body mass and fat mass after dietary intervention. When comparing the two study groups, there was a significant difference for the indicators of weight, BMI, CA, MCM and MG, both in the moment before and after dietary intervention. It was found that 16,064 CpGs sites had their methylation levels modified after dietary intervention, with 1,324 CpG sites being different between patients with obesity before the intervention and women with normal weight and, after the dietary intervention, 78,596 CpGs sites were different. Of the total CpGs that modified methylation levels after dietary intervention, 19 were in genes related to inflammation pathways, with 9 CpGs having their methylation levels reduced and 10 CpGs increased. Positive correlations were observed between the levels of DNA methylation of CpGs in the *CCL24*, *NFKB2* and *RIPK2* genes before the dietary intervention with the percentage of weight loss and with the variations in the total cholesterol, AST and ALT concentrations after dietary intervention. Multiple linear regression analysis showed contribution of methylation levels of cg25634545 in the *NFKB2* gene just before the intervention in the variation of total cholesterol concentrations with dietary intervention, even after adjusted for age, weight loss (%) and loss of MG. We conclude that the hypocaloric dietary intervention provides weight loss, reduction of anthropometric measures and is capable of altering the DNA methylation levels of genes related to the inflammatory pathways, showing a decrease in the methylation of genes involved with the increase of the inflammation process.

**Key words:** Obesity. Hypocaloric dietary intervention. Weight loss. DNA Methylation. Pathways of inflammation.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** - Metilação do DNA – Adição do grupo metil no carbono 5 do anel de citosina. Reação mediada pela DNA metil-transferase (DNMT).

**Figura 2** - Aparelho de Bioimpedância Elétrica e posicionamento dos eletrodos no momento da avaliação.

**Figura 3 - A)** Beadchip: apresenta mais de 450 mil regiões de metilação dentro e fora das ilhas CpGs; **B)** Sistema iScan: sistema que usa lasers de alto desempenho, sistemas óticos e sistemas de detecção, oferecendo resolução submicron e alto rendimento. Apresenta tempo de varredura extremamente rápidos sem sacrificar a qualidade dos dados ou reprodutibilidade.

**Figura 4** - Fluxograma das pacientes selecionadas para o estudo. A: Grupo Intervenção Dietética. B: Grupo Controle.

## LISTA DE QUADROS

**Quadro 1** - Equação de JAKICIC (1998) para correção da massa corporal magra (MCM) de mulheres com obesidade.

**Quadro 2** - Valores de referência de indicadores bioquímicos utilizados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Ingestão alimentar de paciente com obesidade antes e durante a intervenção dietética e de mulheres eutróficas (Grupo Controle).

**Tabela 2** - Dados de antropometria e composição corporal de pacientes com obesidade antes e após intervenção dietética e mulheres sem obesidade (Grupo Controle).

**Tabela 3** - Indicadores bioquímicos de pacientes com obesidade antes e após intervenção dietética e de mulheres sem obesidade (Grupo Controle).

**Tabela 4** - Análise da metilação dos principais genes relacionados as vias da inflamação de indivíduos com obesidade antes e após intervenção dietética hipocalórica (n=11).

**Tabela 5** - Análise da metilação dos principais genes relacionados às vias da inflamação de indivíduos com obesidade antes da intervenção dietética hipocalórica (n=11) e grupo controle (n=24).

**Tabela 6** - Análise da metilação dos principais genes relacionados às vias da inflamação de indivíduos com obesidade após intervenção dietética hipocalórica (n=11) e grupo controle (n=24).

**Tabela 7** - Correlações entre níveis de metilação de CpGs envolvidas com as vias da inflamação antes da intervenção dietética com delta variações ( $\Delta$ ) de antropometria, lipidograma e enzimas hepáticas após intervenção dietética.

**Tabela 8** - Regressão linear múltipla mostrando a contribuição dos níveis de metilação da CpGs 25634545 antes da intervenção dietética com  $\Delta$ Colesterol Total após dieta hipocalórica.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
CA	Circunferência abdominal
CHR	Cromossomo
cm	Centímetro
CT	Colesterol Total
DNMT1	DNA metil-transferases de manutenção
DNMT3	DNA metil transferases <i>de novo</i>
DP	Desvio Padrão
DCV	Doenças cardiovasculares
FDR	False Discovery Rate
g	Gramas
HCFMRP-USP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HDL	<i>High Density Lipoproteins (Lipoproteína de alta densidade)</i>
HERP	Hospital Estadual de Ribeirão Preto
IMC	Índice de massa corpórea
Kcal	Quilocaloria
Kg	Quilograma
LDL	<i>Low Density Lipoproteins (Lipoproteína de baixa densidade)</i>
MCM	Massa corporal magra
MG	Massa gorda
m <sup>2</sup>	Metros ao quadrado
TG	Triglicerídeos
OMS	Organização Mundial da Saúde
SPSS	<i>Statistical Package for Social Science</i>
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
VCT	Valor calórico total

## LISTA DE NOME DOS GENES

*CCL2* – C-C motif chemokine ligand 2  
*CCL20* – C-C motif chemokine ligand 20  
*CCL23* – C-C motif chemokine ligand 23  
*CCL24* – C-C motif chemokine ligand 24  
*CCL25* – C-C motif chemokine ligand 25  
*CCL26* – C-C motif chemokine ligand 26  
*CCL28* – C-C motif chemokine ligand 28  
*CD14* – CD14 molecule  
*CHUK* – Component of inhibitor of nuclear factor kappa B kinase complex  
*HGF* – hepatocyte growth factor  
*IL10* – interleukin 10  
*IL10RB* – interleukin 10 receptor subunit beta  
*IL17D* – interleukin 17D  
*IL17RB* – interleukin 17 receptor B  
*IL1A* – interleukin 1 alpha  
*IL1B* – interleukin 1 beta  
*IL1F10* – interleukin 1 family member 10  
*IL1RAP* – interleukin 1 receptor accessory protein  
*IL6* – interleukin 6  
*IL6R* – interleukin 6 receptor  
*IL6ST* – interleukin 6 signal transducer  
*IRAK1* – interleukin 1 receptor associated kinase 1  
*IRAK2* – interleukin 1 receptor associated kinase 2  
*IRAK3* – interleukin 1 receptor associated kinase 3  
*IRAK4* – interleukin 1 receptor associated kinase 4  
*MAPKBP1* – Mitogen-activated protein kinase binding protein 1  
*MYD88* – MYD88 innate immune signal transduction adaptor  
*NFKB1* – Nuclear factor kappa B subunit 1  
*NFKBIB* – NFKB inhibitor beta  
*NFKBIL1* – NFKB inhibitor like 1  
*NR2C2* – Nuclear receptor subfamily 2 group C member 2  
*RELA* – RELA proto-oncogene, NF-kB subunit

*RIPK1* – Receptor interacting serine/threonine kinase 1  
*RIPK2* – Receptor interacting serine/threonine kinase 2  
*RIPK3* – Receptor interacting serine/threonine kinase 3  
*RIPK4* – Receptor interacting serine/threonine kinase 4  
*SQSTM1* – Sequestosome 1  
*TANK* – TRAF family member associated NFκB activator  
*TNF* – Tumor necrosis factor  
*TNFRSF10B* – TNF receptor superfamily member 10b  
*TNFRSF11A* – TNF receptor superfamily member 11a  
*TNFRSF1B* – TNF receptor superfamily member 1B  
*TNFRSF8* – TNF receptor superfamily member 8  
*TNFRSF9* – TNF receptor superfamily member 9  
*TNFRSF10* – TNF receptor superfamily member 10  
*TNFRSF12* – TNF receptor superfamily member 25  
*TNFRSF17* – TNF receptor superfamily member 17  
*TNFRSF19* – TNF receptor superfamily member 19  
*TNFRSF21* – TNF receptor superfamily member 21  
*TNFRSF25* – TNF receptor superfamily member 25  
*TNFSF9* – TNF superfamily member 9  
*TRADD* – TNFRSF1A associated via death domain  
*TRAF2* – TNF receptor associated factor 2  
*TRAF6* – TNF receptor associated factor 6

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	22
1.1 Obesidade: prevalência e definição .....	22
1.2 Consumo alimentar e intervenções para perda de peso .....	23
1.3 Obesidade e inflamação.....	24
1.4 Epigenética.....	26
1.4.1 Metilação do DNA e obesidade .....	27
1.4.2 Metilação do DNA e estratégias para perda de peso .....	28
1.4.3 Metilação do DNA de genes relacionados as vias inflamatórias na obesidade	29
4. OBJETIVOS .....	31
4.1 Objetivo Geral .....	31
4.2 Objetivos específicos .....	31
5. CASUÍSTICA E MÉTODOS .....	33
5.1 Casuística.....	33
5.2 Critérios de inclusão.....	33
5.3 Critérios de não inclusão.....	33
5.4 Critérios de exclusão .....	34
5.5 Delineamento do estudo.....	34
5.6 Intervenção dietética hipocalórica .....	34
5.7 Avaliação nutricional .....	35
5.7.1 Consumo alimentar .....	35
5.7.2 Antropometria.....	35
5.7.3 Avaliação da Composição Corporal .....	36
5.8 Avaliação dos indicadores bioquímicos.....	37
5.9 Extração do DNA.....	38
5.10 Conversão do DNA por Bissulfito de Sódio.....	38
5.11 Análise de metilação do DNA.....	39

5.12 Análise de bioinformática .....	39
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	40
7. RESULTADOS .....	42
7.1 Características fenotípicas .....	42
7.2 Dados de metilação do DNA .....	46
7.3 Correlações entre variáveis fenotípicas e metilação do DNA.....	54
7.4 Regressões lineares.....	54
8. DISCUSSÃO .....	56
9. CONCLUSÕES .....	66
10. REFERÊNCIAS BOBLIOGRÁFICAS .....	68
APÊNDICES.....	81
ANEXOS .....	91

# *Introdução*

## 1. INTRODUÇÃO

Neste tópico será descrita uma análise crítica sobre os temas diretamente relacionados ao desenvolvimento dessa tese de doutorado. Dessa maneira, serão abordados os assuntos de obesidade, como sua etiologia e consequências clínicas, consumo alimentar e intervenção dietética hipocalórica, objetivando perda de peso e metilação do DNA de genes relacionados às vias inflamatórias.

### 1.1 Obesidade: prevalência e definição

As últimas cinco décadas anunciaram um aumento drástico na prevalência de sobrepeso e obesidade em todo o mundo, atingindo proporções epidêmicas e preocupantes para a saúde pública (LAVIE et al., 2016; CHOOI et al., 2019). A prevalência global de obesidade quase dobrou desde 1980 e atualmente cerca de um terço da população mundial é classificada como excesso de peso ou obesidade (CHOOI et al., 2019).

No Brasil esse cenário não é diferente, pois a prevalência da obesidade também tem apresentado aumentos significativos nas últimas décadas, trazendo consigo a grande preocupação das comorbidades associadas a essa doença. De acordo com dados do sistema de vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico (Vigitel) realizada pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2021), 57,5% da população brasileira encontra-se com excesso de peso, sendo 21,5% desta com obesidade. O excesso de peso se mostra mais frequente na população masculina (58,9%) do que a feminina (56,2%), assim como a obesidade, em que os homens apresentam uma frequência ligeiramente maior (22,6%) do que as mulheres (20,3%).

Associados ao aumento do desenvolvimento da obesidade houve um agravamento dos principais fatores de risco para doenças cardiovasculares (DCV), incluindo hipertensão arterial sistêmica (HAS), resistência à insulina, diabetes, dislipidemia e inflamação crônica, consequentemente aumentando a morbidade e mortalidade da população (WORMSER et al., 2011; LAVIE et al., 2016; PICHÉ et al., 2020).

De uma maneira simplista, a obesidade é considerada uma doença crônica não transmissível (DCNT), com acúmulo acentuado de tecido adiposo decorrente

principalmente pelo desequilíbrio entre o consumo de energia ingerida e o gasto energético em longo prazo (FROOD et al., 2013; ENGIN, 2017).

Para melhor classificação dos níveis de obesidade, a OMS padronizou diferentes graus da doença por meio do Índice de Massa Corpórea (IMC), o qual é calculado pela divisão do peso em quilogramas pela altura em metros elevada ao quadrado ( $\text{Peso} / \text{Altura}^2$ ). Com isso, a obesidade é classificada como grau I quando o IMC se encontra entre 30 e 34,9  $\text{kg}/\text{m}^2$ , grau II para IMC de 35 a 39,9  $\text{kg}/\text{m}^2$  e obesidade grau III para  $\text{IMC} \geq 40 \text{ kg}/\text{m}^2$  (OMS, 2004).

## **1.2 Consumo alimentar e intervenções para perda de peso**

Nas últimas décadas houve alteração importante do estilo de vida da população mundial, assim como alterações no padrão alimentar. Vários estudos já descreveram sobre a relação do processo de desenvolvimento econômico com a saúde e as mesmas abordam várias explicações estruturais concorrentes para o aumento do IMC populacional, incluindo os processos de globalização, desenvolvimento econômico e mudanças de papel da sociedade, os quais afetam de forma significativa os mecanismos comportamentais dos indivíduos (BLEICH et al., 2008; DE VOGLI et al., 2014; FOX et al., 2019).

Com a globalização/urbanização, a população está mais exposta à difusão de produtos obesogênicos, como bebidas adoçadas com açúcar e alimentos processados e ultra-processados, principalmente em países de baixa e média renda (STUCKLER et al., 2012; FRIEL et al., 2013; MALTA et al., 2014; DE VOGLI et al., 2014; OBERLANDER et al., 2017).

Uma explicação alternativa para o aumento global da obesidade é que os países estão passando por “transições nutricionais” domésticas, ou seja, a mudança de uma dieta baseada principalmente em vegetais para uma dieta com alta ingestão de carne e alimentos processados, associados ao ganho de peso e desenvolvimento de DCNT (RAYMOND et al., 2006; FOX et al., 2019).

As intervenções direcionadas a mudanças no estilo de vida, principalmente no padrão alimentar ainda são as mais utilizadas no tratamento da obesidade, pois são alterações com menores custos e não são invasivas como são as cirurgias para perda de peso (FROOD et al., 2013). Além disso, estudos têm demonstrado que a restrição energética pode levar a perda de peso significativa em curto prazo (JOHANSSON; NEOVIUS; HEMMINGSSON, 2014; LIONETT et al., 2016; CORTES-OLIVEIRA et al., 2016). Ademais, a composição da dieta também deve ser considerada, pois a variação das

fontes energéticas influencia diretamente a composição corporal no processo de perda de peso (HU et al., 2012; HALL et al., 2015; MERRA et al., 2017).

Verheggen et al. (2016) em uma meta análise avaliando os efeitos do exercício físico versus restrição calórica no processo de perda de peso na obesidade, mostraram que a dieta hipocalórica proporcionou maior perda ponderal, porém o exercício físico leva a uma maior redução de gordura visceral. Isso nos leva a pensar que a combinação das duas estratégias proporciona resultados mais eficazes na perda de peso de indivíduos com obesidade.

Ademais, as modificações no estilo de vida, incluindo um comportamento alimentar mais saudável associado à prática de atividade física podem também influenciar diretamente no controle do apetite, por mecanismos complexos, envolvendo fatores ambientais e fisiológicos, incluindo alterações no DNA (BLUNDELL et al., 2012; HINTZE et al., 2017; CORELA & ORDOVAS, 2017; RAVUSSIN et al., 2019).

### **1.3 Obesidade e inflamação**

O aumento significativo das DCNT na população mundial tem levado muitos pesquisadores a buscarem fatores associados a essas complicações. Com isso, o reconhecimento de que a inflamação crônica de baixo grau presente na obesidade está associada a essas comorbidades e que o tecido adiposo é o maior órgão imunologicamente ativo que influencia nessa inflamação está crescendo no meio científico (GRANT & DIXIT, 2015).

A obesidade tem o tecido adiposo como um grande órgão imunologicamente ativo, o qual apresenta características de resposta inata e adaptativa (SHOELSON et al., 2017). A compreensão das interações entre as células do sistema imune e os adipócitos revela as vias clinicamente relevantes que controlam o processo de inflamação desse tecido. Além disso, o maior conhecimento da associação entre sistema imune e tecido adiposo pode contribuir para o entendimento do mecanismo pelo qual a obesidade contribui para o aumento da suscetibilidade às doenças metabólicas e certas doenças infecciosas (GRANT & DIXIT, 2015; KAWAI et al., 2021). Nesse sentido, estudos mostram aumento de marcadores inflamatórios em indivíduos com obesidade, como maiores concentrações de complemento C3, proteína C reativa, interleucina 6 (IL-6), interferon-  $\gamma$  e fator de necrose tumoral (TNF), além de diminuição de adiponectina em comparação com indivíduos metabolicamente saudáveis (PHILLIPS & PERRY, 2013; LACKEY et al., 2014; KAWAI et al., 2021).

As alterações inflamatórias são tipicamente observadas no tecido adiposo visceral de indivíduos com obesidade, ou seja, esse tecido apresenta uma infiltração por macrófagos, alterando-o para um fenótipo pró-inflamatório. Esse processo se deve ao aumento de ácidos graxos livres e sinais endógenos liberados pelos adipócitos em estresse decorrente da obesidade, como a hipóxia (OLEFSKY, 2010; KAWAI et al., 2021). Especificamente, os macrófagos são atuadores chave na homeostase do tecido adiposo e podem ser ativados por uma variedade de sinais ambientais para exibir um fenótipo inflamatório (RUF, 2015). Além de controlar a inflamação do tecido adiposo, os macrófagos também são incorporados como um sensor para alterações no ambiente imunológico local (RUF, 2015; MAURIZI et al., 2018).

Além disso, com o excesso do peso pode ocorrer também o aumento da resistência à insulina, conseqüentemente elevando os níveis de glicose sanguínea, fator que contribui para o aumento do processo inflamatório. O aumento da utilização de glicose pelas células imunológicas pode também contribuir para a ativação e polarização de processos pró-inflamatórios, como por exemplo, o fenômeno do metabolismo de glicose de macrófagos, o qual é necessário para secreção de IL-1 $\beta$  (TANNAHILL et al., 2013; GRANT & DIXIT, 2015). Por meio de diferentes estímulos de estresse, os macrófagos podem se diferenciar, adotando características imuno-fenotípicas distintas, modulando assim a resposta imune (RUSSO & LUMENG, 2018).

Sabe-se que o número de macrófagos de indivíduos com obesidade é maior que indivíduos magros, com um aumento variando de 5 a 10% para 40 a 50% no tecido adiposo (WEISBERG et al., 2003; LUMENG et al., 2007; KAWAI et al., 2021). Ainda, alguns estudos têm demonstrado que os macrófagos do tecido adiposo de indivíduos com obesidade exibem marcadores de superfície que não se assemelham nem ao modelo de ativação clássico (M1) e nem o alternativo (M2), mas sim um estado de ativação metabólica induzida por diversos estímulos metabólicos (ácidos graxos livres, concentrações elevadas de insulina e glicose), os quais geram estados de aglomerados de ativação (XUE et al., 2014; KRATS et al., 2014). Além disso, existe uma heterogeneidade de macrófagos presentes no tecido adiposo visceral quando comparado com o tecido adiposo subcutâneo em humanos (ARON-WISNEWSKY et al., 2009).

Além do aumento do número de macrófagos no tecido adiposo durante a obesidade, outros estudos identificaram a presença de outras células imunológicas, incluindo, neutrófilos, células dendríticas, eosinófilos, células *natural killer* e células linfóides inatas, assim como células de imunidade adaptativa (células B e T) (CHAWLA et al., 2011; OSBORN & OLEFSKY, 2012; SEIJKENS et al., 2014; MCLAUGHLIN et al., 2017).

## 1.4 Epigenética

O objetivo da nutrição personalizada é fornecer uma intervenção nutricional direcionada e adaptada ao genoma de cada indivíduo. Esse conceito é sustentado em vários estudos que mostraram que diferentes intervenções influenciam variavelmente a epigenética e a expressão gênica do indivíduo (OLIVEIRA et al., 2016; CORTES-OLIVEIRA et al., 2016; NICOLETTI et al., 2016).

O genoma humano é composto por bilhões de arranjos de sequências de nucleotídeos, gerando códigos genéticos, os quais controlam como os genes serão expressos. Além dos marcadores genéticos baseados em sequências do DNA, vários outros biomarcadores estão disponíveis (epigenômica, transcriptômica, metabolômica e proteômica) (CORELLA & ORDOVAS, 2017).

A epigenética é definida como o processo que altera a atividade do gene sem modificar a sequência de nucleotídeos, ou seja, esse mecanismo é responsável em regular a expressão de genes presentes no DNA. Dentre os mecanismos epigenéticos mais relevantes envolvidos na regulação da atividade gênica estão inclusas modificações de histonas, RNA não codificantes e a metilação do DNA, a qual é a mais estudada atualmente (JIANG et al., 2010; SAMBLAS; MILAGRO; MARTINEZ, 2019).

As modificações de metilação do DNA podem ser dinâmicas e alteradas por estímulos ambientais ou podem ser estáveis e passadas para as próximas gerações (ABDUL et al., 2017; ROHDE et al., 2019). Estudos, principalmente em modelos animais, mostraram que a exposição a fatores ambientais em uma geração causou efeitos fenotípicos em gerações futuras que não foram expostas, sendo assim considerado o mecanismo de metilação do DNA responsável por esse processo, o qual é denominado herança epigenética transgeracional (SHARMA, 2017).

As marcas epigenéticas podem ser modificadas e, o entendimento dos fatores envolvidos nessas modificações pode ser crucial para a prevenção e/ou tratamento de doenças (CORELLA & ORDOVAS, 2017; ROHDE et al., 2019).

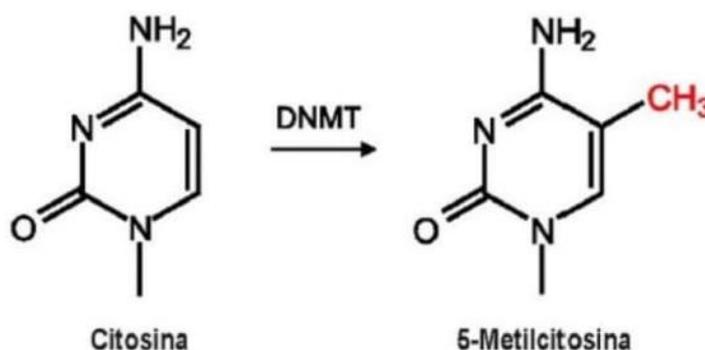
Por mais que a definição dos padrões de metilação do DNA ocorra na embriogênese, este pode ser modificado durante o curso da vida por variáveis ambientais e comportamentais, como alimentação, tabagismo e situações metabólicas (DOLINOY et al., 2006; SHENKER et al., 2013; REICHETZEDER, 2021). Devido ao seu papel na regulação da expressão gênica, o padrão de metilação do DNA é um mecanismo que pode estar envolvido na suscetibilidade a diversas doenças, como por exemplo, obesidade, resistência

à insulina e diabetes mellitus (DRONG et al., 2012; RAKYAN et al., 2011; ROHDE et al., 2019).

### 1.4.1 Metilação do DNA e obesidade

O processo de metilação do DNA é o fenômeno que envolve a adição enzimática de um grupo metil ao carbono C-5 da citosina. A maioria das 5-metilcitosinas está presente em dinucleotídeos de citosina-fosfato-guanina (CpG) (JIANG et al., 2010; SAMBLAS; MILAGRO; MARTINEZ, 2019).

**Figura 1.** Metilação do DNA – Adição do grupo metil no carbono 5 do anel de citosina. Reação mediada pela DNA metil-transferase (DNMT).



Fonte: Adaptado de Attwood et al., 2002

A metilação do DNA é realizada pelas enzimas DNA metil-transferases (DNMT), as quais são classificadas em dois grupos: DNA metil-transferases de manutenção (DNMT1), que mantêm padrões de metilação e DNA metil-transferases *de novo* (DNMT3A e DNMT3B), que realizam novas metilações. As desmetilases são responsáveis pelo processo inverso (eliminação do grupo metil), mas esses mecanismos são menos compreendidos (CORELLA & ORDOVAS, 2017).

Os dinucleotídeos CpG não são distribuídos uniformemente por todo o genoma, mas estão centralizados em certas regiões. As áreas enriquecidas nesses dinucleotídeos são chamadas ilhas CpGs, as quais são concentradas entre o promotor e o local de início da transcrição (CORELLA & ORDOVAS, 2017). Com isso, a metilação de elementos reguladores nos genes, como promotores, intensificadores, isoladores e repressores geralmente suprime a função do gene (MAZZIO & SOLIMAN, 2012; CORELLA & ORDOVAS, 2017).

A associação da metilação de determinados genes com o desenvolvimento da obesidade tem sido muito discutida no meio científico nas últimas décadas, com vários estudos tentando elucidar na origem molecular da obesidade e distúrbios relacionados, com foco na assinatura epigenética durante as diferentes fases da vida (MILAGRO et al., 2012; REMELY et al., 2015; VAN-DIJK et al., 2015; NILSSON & LING, 2017), sendo que, já existem evidências de que os mecanismos epigenéticos estão envolvidos no início e no desenvolvimento da obesidade e de suas complicações metabólicas e que muitos desses são modulados pelo ambiente, principalmente pelos nutricionais e fisiológicos (LIM & SONG, 2012; LUFT, et al., 2013; RENDO-URTEAGA et al., 2015; FLORES-SIERRA et al., 2016; MARRANZANO et al., 2018).

Nesse contexto, pesquisas sobre novos biomarcadores epigenéticos são necessárias para entender a fisiopatologia da obesidade e suas manifestações clínicas.

#### **1.4.2 Metilação do DNA e estratégias para perda de peso**

Vários estudos já demonstraram que a metilação do DNA sofre influência de fatores ambientais, principalmente os que proporcionam a perda de peso.

Segundo estudo realizado por Nicoletti et al., 2020, a intervenção dietética hipocalórica de curto prazo em pacientes com obesidade grave foi capaz de alterar os padrões de metilação do DNA relacionados à obesidade. Além disso, os autores verificaram que as alterações na metilação do DNA no grupo de estudo podem ser proporcionais a taxa de perda de peso após intervenção dietética.

A cirurgia bariátrica é outra estratégia para perda de peso que tem crescido muito nas últimas décadas e alguns estudos também tem demonstrado sua influência na metilação do DNA. Estudo realizado por Morcillo et al., 2017 mostrou que a cirurgia bariátrica pode modificar a metilação do DNA de diferentes genes associados com a melhora metabólica verificada após o procedimento cirúrgico.

Outro estudo com pacientes submetidos a cirurgia bariátrica também mostrou influência da perda de peso após 12 meses de realização do procedimento nos parâmetros clínicos e metilação do DNA. Os autores verificaram que as mudanças epigenéticas podem ser usadas como potenciais biomarcadores para obesidade e, no futuro, para comorbidades relacionadas à obesidade (FRASZCZYK et al., 2020).

A atividade física é outra estratégia para perda de peso muito adotada e que também apresenta influencia na metilação do DNA. Segundo um estudo de revisão realizado por Voisin et al., 2015, os autores concluíram que os exercícios agudos e crônicos impactam

significativamente na metilação do DNA, de maneira altamente específica para tecidos e genes. Os estudos analisados mostraram que o treinamento físico além de contribuir para a perda de peso, também são capazes de moldar favoravelmente o epigenoma de um indivíduo, melhorando seu desempenho e também induzindo alterações no tecido adiposo (RÖNN et al., 2013) e no músculo esquelético (LINDHOLM et al., 2014).

Resumindo, as estratégias para perda de peso abordadas acima são capazes de modificar o perfil de metilação do DNA de diferentes genes, além de contribuir para os benefícios metabólicos à saúde que costumam ser observados com o excesso de peso. Embora existam muitas lacunas com relação a esse assunto, a capacidade de reverter o padrão de metilação do DNA de locais específicos desperta o interesse por marcadores-alvo para o tratamento de comorbidades relacionadas a obesidade.

### **1.4.3 Metilação do DNA de genes relacionados as vias inflamatórias na obesidade**

Sabe-se que na obesidade existe um processo de inflamação de baixo grau no tecido adiposo com excesso de gordura (WANG et al., 2016; SHOELSON et al., 2017), assim como a metilação do DNA de indivíduos com obesidade pode sofrer modificações quando submetidos a alteração ambiental, como restrição calórica, atividade física e perda de peso (VOISIN et al., 2015; NICOLETTI et al, 2020; FRASZCZYK et al., 2020). Entretanto, surge a importância no conhecimento de como é a resposta epigenética em genes relacionados às vias da inflamação em indivíduos com obesidade submetidos a intervenção dietética hipocalórica e perda de peso.

A literatura atual ainda é escassa nessas informações, principalmente em casuística brasileira. Diante disso, a hipótese desse estudo sugere que a dieta hipocalórica por 6 semanas e perda de peso em mulheres com obesidade grau III é capaz de modificar a metilação do DNA de genes envolvidos com as vias da inflamação.

*Objetivos*

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo foi identificar as modificações no padrão de metilação do DNA em genes envolvidos com as vias da inflamação após intervenção dietética hipocalórica em mulheres com obesidade grau III e compará-las com mulheres com peso normal.

### 4.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar o estado nutricional por meio de medidas antropométricas, composição corporal, consumo alimentar e perfil bioquímico de mulheres com obesidade grau III antes e após intervenção dietética hipocalórica e no grupo controle (mulheres com peso normal);
- ✓ Analisar os níveis de metilação do DNA de genes envolvidos nas inflamatórias de mulheres com obesidade grau III antes e após intervenção dietética hipocalórica e de mulheres com peso normal;
- ✓ Correlacionar os níveis de metilação do DNA dos genes selecionados com o perfil bioquímico, antropométrico e composição corporal.

*Casuística e Métodos*

## 5. CASUÍSTICA E MÉTODOS

### 5.1 Casuística

Foram selecionadas para o presente estudo 35 mulheres, de etnia miscigenada (PENA et al., 2011), com idade entre 21 e 50 anos, as quais foram distribuídas em dois grupos: Grupo Intervenção, composto por 11 mulheres com obesidade grau III (IMC  $\geq$  40 kg/m<sup>2</sup>), as quais foram submetidas à intervenção dietética hipocalórica e Grupo Controle, composto por 24 mulheres sem obesidade (IMC entre 18,5 kg/m<sup>2</sup> a 24,9 kg/m<sup>2</sup>).

Foram realizados os esclarecimentos a respeito do protocolo da pesquisa para as participantes, sendo incluídas somente as mulheres que concordaram com a realização do mesmo. A pesquisa e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP (CAAE: 82749718.4.0000.5440).

### 5.2 Critérios de inclusão

Para o Grupo Intervenção foram selecionadas mulheres acompanhadas no ambulatório de Obesidade e Dislipidemia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP – USP), sendo candidatas as que possuíam idade entre 21 a 50 anos, com IMC acima de 40 kg/m<sup>2</sup> e sem doenças ou comorbidades associadas.

Para o Grupo Controle foram selecionadas mulheres acompanhadas pelo Hospital Estadual de Ribeirão Preto, com classificação de IMC entre 18,5 kg/m<sup>2</sup> e 24,9 kg/m<sup>2</sup>, com idade entre 21 e 50 anos e sem doenças e comorbidades associadas.

### 5.3 Critérios de não inclusão

Não foram incluídas no estudo mulheres com distúrbios psiquiátricos, gestantes, lactantes, tabagistas, etilistas, portadoras de doenças e/ou que estavam realizando algum tratamento relacionado a quadros de inflamação e/ou infecção ou tratamentos prévios para perda de peso ou preparo para realização de cirurgia bariátrica.

#### **5.4 Critérios de exclusão**

Foram excluídas do estudo as pacientes que iniciaram tratamento com antibiótico durante período de hospitalização e que desistiram ou não seguiram corretamente a intervenção dietética.

#### **5.5 Delineamento do estudo**

Trata-se de um estudo de caráter longitudinal prospectivo, sendo a coleta de dados realizada em duas etapas no Grupo Intervenção e uma etapa no Grupo Controle. A primeira etapa para o Grupo Intervenção foi realizada no início da hospitalização das pacientes na enfermaria de Nutrologia do HCFMRP – USP, na qual foram coletados dados de avaliação nutricional, incluindo medidas de peso, estatura, circunferência abdominal (CA), análise da composição corporal e coleta de sangue para análise de metilação e dos indicadores bioquímicos. No mesmo dia foi iniciada a intervenção dietética hipocalórica.

Na semana que antecedeu a internação, foram coletados três recordatórios alimentares de 24 horas, por meio de entrevista telefônica, para análise da ingestão alimentar fora do ambiente hospitalar.

A segunda etapa do presente estudo foi realizada após seis semanas de intervenção dietética hipocalórica e foram realizados todos os procedimentos descritos na etapa 1.

Para o Grupo Controle as avaliações foram realizadas em um único momento, incluindo todas as análises realizadas no grupo Grupo Intervenção. Os três recordatórios alimentares de 24 horas foram coletados também por entrevista telefônica, assim como o grupo Grupo Intervenção. Todas as coletas foram realizadas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

#### **5.6 Intervenção dietética hipocalórica**

Durante a internação houve um período de três dias de adaptação ao esquema alimentar, com prescrição dietética de 1800 kcal no primeiro dia, 1500 kcal no segundo dia e 1200 kcal a partir do terceiro dia.

## **5.7 Avaliação nutricional**

### **5.7.1 Consumo alimentar**

Para avaliação do consumo alimentar foram coletados três recordatórios de 24 horas na semana que antecedeu a hospitalização do Grupo Intervenção na enfermaria de Nutrologia do HCFMRP e, antes da avaliação agendada do Grupo Controle. A coleta foi realizada por via telefônica por nutricionista treinado. O software Dietwin® foi utilizado para cálculo dos recordatórios alimentares e foram analisadas ingestão energética diária e de macronutrientes (carboidrato, proteína e lipídio) em gramas e porcentagem correspondente ao valor calórico total (VCT).

### **5.7.2 Antropometria**

Na avaliação antropométrica foram considerados os indicadores de peso (kg), estatura (m), IMC ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) e CA (cm). O peso foi aferido em balança digital Filizola® do tipo plataforma, com capacidade para 300 kg e precisão de 0,2 Kg. Para aferição da estatura foi utilizada haste vertical com graduação de 0,5 cm. O IMC foi obtido pela fórmula:  $\text{IMC} = \text{Peso}/\text{Altura}^2$ . A classificação do grau da obesidade foi realizada com adoção dos critérios da OMS de 1997.

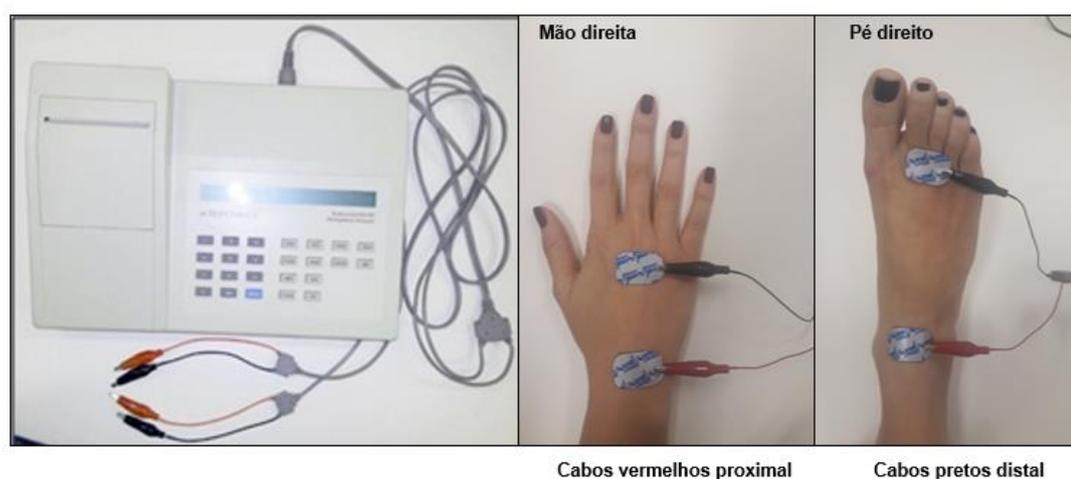
No Grupo Intervenção a CA foi medida passando-se uma fita métrica inextensível com graduação de 0,1 mm na maior circunferência em torno da cicatriz umbilical e, no Grupo Controle entre o ponto médio da última costela com a crista ilíaca. Valores de cintura  $\geq 80$  cm para mulheres foram considerados alterados conforme critérios propostos pela Associação Brasileira para Estudos da Obesidade e da Síndrome Metabólica (DIRETRIZES BRASILEIRAS DE OBESIDADE, 2009).

A perda de peso (absoluta e em percentual) do grupo intervenção foi calculada por meio da diferença entre o peso pré hospitalização e após seis semanas de intervenção dietética hipocalórica.

### 5.7.3 Avaliação da Composição Corporal

Para análise da composição corporal foi utilizado aparelho de Bioimpedância Elétrica modelo Quantum BIA 450 Q – RJL System®. As participantes realizaram o exame após seis horas de jejum, com a bexiga urinária vazia, e com as mesmas deitadas, com pernas afastadas e braços em paralelo afastados do corpo. Quatro eletrodos adesivos foram colocados na mão e no pé das participantes: um na superfície dorsal do punho direito entre os ossos ulnar e rádio e outro no terceiro metacarpo, um na superfície anterior do tornozelo direito entre as porções proeminentes dos ossos e outro na superfície dorsal do terceiro metatarso. Uma corrente elétrica de baixa amplitude (entre 500 a 800 A) e frequência de 50 Khz foi aplicada nos eletrodos distais da mão e do pé.

**Figura 2.** Aparelho de Bioimpedância Elétrica e posicionamento dos eletrodos no momento da avaliação.



Fonte: elaborada pela própria autora, 2022.

No Grupo Controle, a massa corporal magra foi obtida diretamente pelo equipamento descrito acima, sendo a massa gorda (MG) obtida por meio da subtração da massa corporal magra (MCM) do peso total do indivíduo.

Para obtenção da MCM do Grupo Intervenção, foram utilizadas fórmulas específicas para análise de composição corporal de indivíduos com obesidade, considerando os valores de resistência e reactância (JAKICIC; WING; LANG, 1998). A MG também foi obtida por meio da subtração da MCM do peso total do indivíduo. A fórmula para o cálculo da MCM está apresentada no Quadro 1.

**Quadro 1.** Equação de JAKICIC (1998) para correção da massa corporal magra (MCM) de mulheres com obesidade.

$$\text{MCM (kg)} = 2,68 + (0,2 \times \text{Est}^2 / R) + 0,19 \times P + 2,55 \times \text{etnia (caucasianos} = 0, \text{ afro-descendentes} = 1) + 0,1157 \times \text{Est.}$$

Est = estatura em metros; P = peso em quilogramas; R = resistência em Ohm.

### 5.8 Avaliação dos indicadores bioquímicos

Foram avaliados glicemia de jejum, colesterol total (CT), HDL colesterol (HDL-c), LDL colesterol (LDL-c), triglicerídeos (TG), creatinina, uréia, Aspartato aminotransferase (AST) e Alanina aminotransferase (ALT) antes e após intervenção dietética. Foram adotados os valores de referência padronizados no sistema HCFMRP-USP, descritos no Quadro 2.

**Quadro 2.** Valores de referência de indicadores bioquímicos utilizados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo.

Exames Bioquímicos	Valores de Referência	Método de Análise
Glicemia de jejum (mg/dL)	70 – 100	Enzimático
Colesterol Total (mg/dL)	< 200	Enzimático
HDL colesterol (mg/dL)	> 35	Enzimático
LDL colesterol (mg/dL)	< 130	Enzimático
Triglicérides (mg/dL)	< 150	Enzimático
Creatinina (mg/dL)	0,7 – 1,5	Reação de Jaffe
Uréia (mg/dL)	10 – 50	Enzimático
TGO/AST (U/L)	< 32	Enzimático
TGP/ALT (U/L)	< 31	Enzimático
Gama GT (U/L)	11 a 50	Enzimático

mg: miligrama; dL: decilitro; HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; TGO transaminase glutâmico oxalacética; AST: aspartato aminotransferase; TGP: transaminase glutâmico pirúvica; ALT: Alanina aminotrasferase; U/L: unidade por litro

## 5.9 Extração do DNA

O DNA foi extraído por meio do método automatizado por *beads* magnéticas utilizando o equipamento *Maxwell MDx* e reagentes sugeridos pelo fabricante (Promega). Neste método a amostra de sangue recebeu primeiramente um tampão de lise celular (*Lysis Buffer*) e depois a proteinase K para desnaturação das proteínas presentes na mesma. Posteriormente foram adicionadas as *beads* magnéticas, as quais se ligam nos ácidos nucleicos, separando-os do restante da amostra de forma magnética. Em seguida foi realizada a lavagem dessa amostra e, por último foi realizada a eluição e transferência do conteúdo de DNA extraído para outro tubo, contendo somente os ácidos nucleicos purificados.

A concentração de DNA extraído foi avaliada utilizando *NanoDrop*, a integridade foi verificada por meio de gel de agarose e a qualidade a partir das razões obtidas por leitura óptica (260/280 e 260/230).

## 5.10 Conversão do DNA por Bissulfito de Sódio

O DNA foi convertido por bissulfito de sódio por meio do Kit *EZ DNA Methylation* (*Zymo Research*, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Essa técnica envolve o tratamento do DNA metilado com bissulfito, o qual converte citosinas não metiladas em uracila e, as citosinas metiladas permanecem inalteradas durante o tratamento.

O Kit utilizado baseia-se em 3 etapas. Primeiramente foi adicionado na amostra de DNA extraído um tampão de diluição e realizada a desnaturação do DNA. Posteriormente essa mistura foi incubada e depois foi adicionado um reagente de conversão de citosina. Por fim foi realizada uma nova incubação e, posteriormente a amostra passou por uma lavagem, com as citosinas não metiladas já convertidas em uracila.

*Exemplo de conversão do DNA por Bissulfito de Sódio*

**Modelo:**

A: 5' – GACCGTTCAGGTCAGCAGTGCGCT – 3'

B: 3' – CTGGCAAGGTCAGGTCGTCACGCGA – 5'

**DNA Convertido:**

A: 5' – GATCGTTTTAGGTTTAGTAGTGCGTT – 3'

B: 3' – TTGGCAAGGTTTAGGTTGTTATGCGA – 5'

## **C: Citosinas metiladas e que são mantidas após conversão por bissulfito de sódio**

### **5.11 Análise de metilação do DNA**

A análise de metilação de DNA específica baseada em *array* foi realizada com a tecnologia *Infinium Human Methylation 450K Beadchip* (Illumina, San Diego, CA). O DNA genômico tratado com bissulfito foi amplificado, hibridizado no *Human Methylation 450 BeadChip* (Illumina) e digitalizados utilizando a plataforma *Illumina iScan SQ*. A intensidade das imagens foi extraída com o software *Genome Studio Methylation* (1.9.0, Illumina).

**Figura 3. A)** Beadchip: apresenta mais de 450 mil regiões de metilação dentro e fora das ilhas CpGs; **B)** Sistema iScan: sistema que usa lasers de alto desempenho, sistemas óticos e sistemas de detecção, oferecendo resolução submicron e alto rendimento. Apresenta tempo de varredura extremamente rápidos sem sacrificar a qualidade dos dados ou reprodutibilidade.

**A)**



**B)**



Fonte: elaborada pela própria autora, 2022.

### **5.12 Análise de bioinformática**

Os dados obtidos foram analisados por meio de bioinformática para verificação de quais sítios CpG foram diferentemente metilados (valor  $\beta$ ).

A análise de bioinformática foi realizada em parceria com equipe da Professora Doutora Ana Belén Crujeiras do Complexo Hospitalar Universitário de Santiago de Compostela, da Universidade de Santiago de Compostela – Espanha.

Após análise de bioinformática e verificação sítios CpGs válidos e diferentemente metilados, foram aplicados os filtros de  $p$  valor menor que 10% ( $p < 0,01$ ),  $\Delta\beta$  maior que 10% e *False Discovery Rate* (FDR) menor que 0,05. Posteriormente foi realizado um levantamento de quais sítios estavam presentes em genes das vias inflamatórias.

## 6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A estatística descritiva foi composta por valores de média e desvio-padrão. A normalidade de distribuição dos dados foi verificada pelo teste de *Shapiro Wilk*. Foi utilizado o teste de *Wilcoxon* para as comparações entre os momentos antes e após a intervenção dietética hipocalórica e o teste de *Man-Whitney* para comparação entre o grupo controle com os momentos antes e após intervenção dietética. Correlações de *Spearman* foram utilizadas para avaliar a correlação de padrões de metilação do DNA com as variáveis fenotípicas. Modelos de regressão linear foram aplicados para analisar a previsão do padrão de metilação do DNA de genes específicos e as variáveis selecionadas. A significância estatística foi estabelecida em 5% ( $p < 0,05$ ), sendo todas as análises realizadas no software *Statistical Package for Social Science* (SPSS versão 22.0 [Inc. Chicago. IL]).

*Resultados*

## 7. RESULTADOS

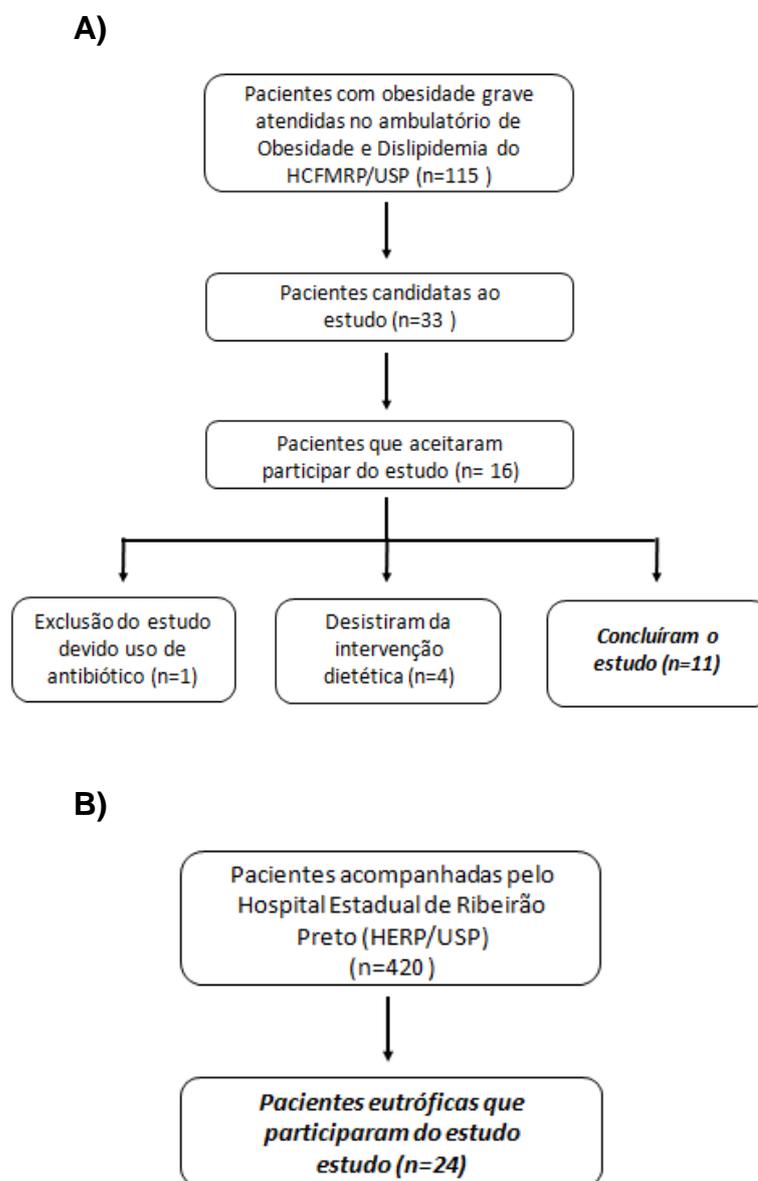
### 7.1 Características fenotípicas

Participaram do presente estudo 35 mulheres, sendo 11 com obesidade grau III, com média de idade de  $35,7 \pm 6,8$  anos que foram submetidas à intervenção dietética (Grupo Intervenção) e 24 mulheres com peso normal (Grupo Controle), com média de idade de  $36,9 \pm 11,8$  anos.

Foram selecionadas um total de 115 mulheres com obesidade acompanhadas pelo ambulatório de Obesidade e Dislipidemia, sendo que 33 se enquadravam nos critérios pré-estabelecidos para o estudo. Entretanto, somente 16 mulheres aceitaram participar da pesquisa. O trabalho e questões familiares impossibilitaram muitas pacientes a participarem do estudo, fato que justifica o pequeno número de voluntárias. Durante o estudo, cinco pacientes foram excluídas: uma devido ao uso de antibiótico após quadro de infecção de urina e quatro por desistirem da intervenção dietética após iniciada a internação. Assim, 11 mulheres finalizaram a intervenção dietética proposta.

Em relação ao grupo controle, de um total de 420 atendimentos realizados durante o período do estudo, somente 24 pacientes preencheram os critérios pré-determinados e aceitaram participar da pesquisa. A Figura 6 mostra o fluxograma das pacientes do estudo.

**Figura 4 – Fluxograma das pacientes selecionadas para o estudo. A: Grupo Intervenção Dietética. B: Grupo Controle.**



Fonte: elaborada pela própria autora, 2022.

A Tabela 1 mostra os dados de ingestão alimentar. Não foi observada diferença na ingestão energética, de carboidratos, lipídios e proteínas antes e durante a intervenção. Por outro lado, observou-se menor ingestão calórica ( $p=0,001$ ) e de lipídios ( $p=0,000$ ) e maior ingestão de carboidratos ( $p=0,001$ ) e proteínas ( $p=0,034$ ) no Grupo Intervenção durante o período de hospitalização quando comparado ao Grupo Controle. Ressalta-se que o consumo alimentar do Grupo Controle foi analisado em 21 pacientes devido à dificuldade de contato com as mesmas (tanto pessoalmente quanto por telefone), impossibilitando a coleta de recordatórios alimentares para análise completa dessa variável.

**Tabela 1** – Ingestão alimentar de paciente com obesidade antes e durante a intervenção dietética e de mulheres sem obesidade (Grupo Controle).

	<b>Grupo Pré Intervenção Dietética (n=11)</b>	<b>Grupo Durante Intervenção Dietética (n=11)</b>	<b>Grupo controle (n=21)</b>
<b>Energia (kcal)</b>	1473,7±563,6	1245,8±19,0	1462,8±374,5 <sup>b</sup>
<b>Carboidrato (g)</b>	165,8±67,9	175,1±2,8	180,5±45,4
<b>Carboidrato (% do VCT)</b>	45,4±11,2	56,4±1,2	50,0±8,9 <sup>b</sup>
<b>Proteína (g)</b>	59,8±29,0	57,7±1,7	62,5±21,9
<b>Proteínas (% do VCT)</b>	16,3±4,6	18,6±0,7	16,9±5,4 <sup>b</sup>
<b>Lipídios (g)</b>	60,9±28,7	38,8±2,3	55,1±21,3 <sup>b</sup>
<b>Lipídios (% do VCT)</b>	36,5±6,1	27,6±2,0	33,2±6,7 <sup>b</sup>

kcal: quilocaloria; g: gramas; VCT: valor calórico total; a:  $p < 0,05$  em relação ao Grupo Pré Intervenção Dietética; b:  $p < 0,05$  em relação ao Grupo Durante Intervenção Dietética.

Houve redução significativa do peso ( $9,2 \pm 3,6$  kg; 5,6% de perda de peso;  $p = 0,003$ ), IMC ( $p = 0,003$ ), MCM ( $p = 0,006$ ) e MG ( $p = 0,003$ ) após a intervenção dietética hipocalórica, contudo mantiveram-se sempre diferentes do Grupo Controle (Tabela 2). Não houve redução significativa da CA ( $p = 0,33$ ) após a intervenção dietética nos indivíduos com obesidade, sendo os valores encontrados muito acima do preconizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS - 2004).

**Tabela 2** – Dados de antropometria e composição corporal de pacientes com obesidade antes e após intervenção dietética e mulheres sem obesidade (Grupo Controle).

	<b>Grupo Pré Intervenção Dietética (n = 11)</b>	<b>Grupo Pós Intervenção Dietética (n = 11)</b>	<b>Grupo Controle (n = 24)</b>
<b>Idade (anos)</b>		35,7±6,8	36,9±11,8
<b>Estatura (m)</b>		1,62±0,05	1,64±0,1 <sup>a,b</sup>
<b>Peso (kg)</b>	158,0±33,3	148,9±29,4 <sup>a</sup>	60,7±6,3 <sup>a,b</sup>
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	59,8±11,0	56,3±9,7 <sup>a</sup>	22,5±1,6 <sup>a,b</sup>
<b>CA (cm)</b>	149,2±20,1	147,3±18,0	78,7±7,2 <sup>a,b</sup>
<b>MCM (kg)</b>	66,2±9,0	63,7±7,7 <sup>a</sup>	42,7±5,6 <sup>a,b</sup>
<b>MCM (%)</b>	42,6±3,8	43,5±4,1 <sup>a</sup>	70,4±4,1 <sup>a,b</sup>
<b>MG (kg)</b>	91,9±24,5	85,1±22,1 <sup>a</sup>	17,9±2,7 <sup>a,b</sup>
<b>MG (%)</b>	57,4±3,8	56,5±4,1 <sup>a</sup>	29,7±4,1 <sup>a,b</sup>

kg: quilograma; IMC: índice de massa corporal; m: metro; CA: circunferência abdominal; cm: centímetro; MCM: massa corporal magra; MG: massa gorda; g: gramas; a:  $p < 0,05$  em relação ao Grupo Pré Intervenção Dietética; b:  $p < 0,05$  em relação ao Grupo Pós Intervenção Dietética.

As pacientes com obesidade antes da intervenção tinham maiores concentrações séricas de glicose ( $p=0,02$ ) e triglicérides ( $p=0,00$ ) e menores valores de HDL-c ( $p=0,00$ ) que as mulheres sem obesidade. Após a intervenção dietética houve redução significativa nas concentrações séricas de CT ( $p=0,03$ ), HDL-c ( $p=0,00$ ) e LDL-c ( $p=0,04$ ) e aumento de AST ( $p=0,02$ ) e ALT ( $p=0,01$ ). Após a intervenção, mulheres com obesidade mantiveram concentrações mais elevadas de TG ( $p=0,00$ ) e diminuídas de HDL-c ( $p=0,00$ ) que mulheres com peso normal (Tabela 3).

Não houve comparação entre os grupos com relação aos indicadores bioquímicos de função renal (creatinina e uréia) e hepática (AST, ALT e Gama GT), pois os mesmos não são solicitados entre os exames de rotina das pacientes sem obesidade acompanhadas no HERP-USP. A análise de dados bioquímicos foi realizada somente em 18 pacientes no Grupo Controle, pois seis mulheres não compareceram ao serviço para coleta do material (sangue) no prazo pré-determinado.

**Tabela 3** – Indicadores bioquímicos de pacientes com obesidade antes e após intervenção dietética e de mulheres sem obesidade (Grupo Controle).

	<b>Grupo Pré Intervenção Dietética (n = 11)</b>	<b>Grupo Pós Intervenção Dietética (n = 11)</b>	<b>Grupo Controle (n = 18)</b>
<b>Glicemia jejum (mg/dL)</b>	96,1±21,7	86,6±11,8	81,2±8,8 <sup>a</sup>
<b>Colesterol total (mg/dL)</b>	180,6±38,4	153,4±23,5 <sup>a</sup>	171,6±31,4
<b>HDL-colesterol (mg/dL)</b>	40,0±7,6	31,8±5,4 <sup>a</sup>	56,7±13,7 <sup>a,b</sup>
<b>LDL-colesterol (mg/dL)</b>	116,1±31,7	97,7±23,2 <sup>a</sup>	100,8±27,4
<b>Triglicérides (mg/dL)</b>	139,6±52,7	119,8±40,2	70,4±36,7 <sup>a,b</sup>
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	0,7±0,1	0,8±0,1	-
<b>Uréia (mg/dL)</b>	29,7±10,6	24,9±9,5	-
<b>TGO/AST (U/L)</b>	27,4±10,7	36,8±18,6 <sup>t</sup>	-
<b>TGP/ALT (U/L)</b>	26,7±8,3	59,4±44,5 <sup>a</sup>	-
<b>Gama GT (U/L)</b>	56,6±36,3	54,6±26,1	-

HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; TGO: transaminase glutâmico oxalacética; AST: aspartato aminotransferase; TGP: transaminase glutâmico pirúvica; ALT: alanina aminotransferase; mg: miligrama; dL: decilitro; a:  $p < 0,05$  em relação ao Grupo Pré Intervenção Dietética; b:  $p < 0,05$  em relação ao Grupo Pós Intervenção Dietética; t: tendência  $p = 0,05$ .

## 7.2 Dados de metilação do DNA

Após estabelecidos os filtros de detecção  $p$ -valor,  $p < 0,01$  e exclusão das *probes* registradas como polimorfismos, um total de 406.957 sítios CpGs foram considerados válidos. Análise diferencial mostrou que 16.064 sítios CpGs tiveram seus níveis de metilação modificados após intervenção dietética. O nível de metilação de 1.324 sítios CpG foi diferente entre pacientes com obesidade antes da intervenção e mulheres com peso normal e, após a intervenção dietética, 78.596 sítios CpGs foram diferentes.

Do total de sítios CpGs com níveis de metilação modificados após intervenção, 19 estavam em genes relacionados às vias da inflamação, sendo que 9 CpGs tiveram seus níveis de metilação reduzidos e 10 CpGs aumentados. Desse total, 47,4% encontravam-se no corpo do gene, enquanto 52,6% na região promotora. Dentre as CpGs hipometiladas após a intervenção, os níveis de metilação do DNA variaram entre 12 e 21%. Dados semelhantes foram encontrados entre as CpGs hipermetiladas, com variação de 10 a 24% (Tabela 4).

**Tabela 4** – Níveis de metilação do DNA de genes relacionados às vias da inflamação de indivíduos com obesidade antes e após intervenção dietética hipocalórica (n=11)

<i>CpGs hipometiladas após a intervenção dietética</i>							
<b>CpG</b>	<b>Gene</b>	<b>CHR</b>	<b>Região do gene</b>	<b>Níveis metilação antes da intervenção (<math>\beta</math>)</b>	<b>Níveis metilação após intervenção (<math>\beta</math>)</b>	<b><math>\Delta\beta</math></b>	<b>p valor</b>
cg17741993	<i>TNF</i>	6	Corpo	0,59±0,08	0,45±0,17	-0,15	0,0087
cg20548977	<i>IL1A</i>	2	Corpo	0,85±0,11	0,68±0,20	-0,17	0,0067
cg17427986	<i>IL6R</i>	1	Corpo	0,88±0,03	0,76±0,14	-0,12	0,0075
cg18944653	<i>HGF</i>	7	3'UTR;Corpo	0,77±0,99	0,59±0,20	-0,18	0,0039
cg04633676	<i>CCL2</i>	17	TSS1500	0,76±0,08	0,60±0,18	-0,17	0,0051
cg26237003	<i>CCL28</i>	5	TSS1500	0,72±0,10	0,55±0,20	-0,17	0,0087
cg12219838	<i>RIPK1</i>	6	Corpo	0,97±0,01	0,80±0,21	-0,17	0,0087
cg18123581	<i>RIPK2</i>	8	Corpo	0,87±0,06	0,66±0,21	-0,21	0,0073
cg14041194	<i>TRAF2</i>	9	Corpo	0,96±0,02	0,81±0,21	-0,15	0,0067
<i>CpGs hipermetiladas após a intervenção dietética</i>							
<b>CpG</b>	<b>Gene</b>	<b>CHR</b>	<b>Região do gene</b>	<b>Níveis metilação antes da intervenção (<math>\beta</math>)</b>	<b>Níveis metilação após intervenção (<math>\beta</math>)</b>	<b><math>\Delta\beta</math></b>	<b>p valor</b>
cg01770232	<i>IL6</i>	7	TSS1500	0,13±0,06	0,28±0,18	0,15	0,0051
cg14280424	<i>IL10RB</i>	21	Corpo	0,02±0,03	0,15±0,13	0,12	0,0087
cg11584277	<i>CCL23</i>	17	1stExon;5'UTR	0,17±0,06	0,35±0,18	0,18	0,0063
cg12788666	<i>CCL24</i>	7	TSS1500	0,08±0,04	0,18±0,17	0,10	0,0087
cg16296902	<i>CCL28</i>	5	Corpo	0,06±0,03	0,19±0,12	0,13	0,0079

cg06589507	<i>SQSTM1</i>	5	5'UTR;TSS1500	0,15±0,16	0,38±0,30	0,24	0,0087
cg05892903	<i>RIPK2</i>	8	TSS1500	0,10±0,11	0,33±0,28	0,23	0,0087
cg18679712	<i>NR2C2</i>	3	5'UTR	0,01±0,01	0,11±0,20	0,11	0,0087
cg25634545	<i>NFKB2</i>	10	TSS1500;TSS200	0,01±0,01	0,13±0,16	0,12	0,0067
cg20203089	<i>NFKB2</i>	10	5'UTR;1stExon	0,06±0,08	0,23±0,19	0,17	0,0087

Valores apresentados em média±desvio padrão; CHR: cromossomo;  $\Delta\beta$ : variação nos níveis de metilação antes e após intervenção dietética, sendo que valores negativos indicam redução e valores positivos indicam aumento da metilação; 3'UTR: 3' região não traduzida; 5'UTR: 5' região não traduzida; TSS200: 200 pares de bases do local inicial de transcrição; TSS1500: 1500 pares de bases do local inicial de transcrição; 1stExon: primeiro éxon.

A comparação de mulheres com obesidade (antes da intervenção) e mulheres com peso normal mostrou níveis de metilação diferentes em apenas 2 sítios CpGs associados às vias da inflamação, ambos localizados no corpo dos genes. Observou-se diferença de 11 a 13% (Tabela 5).

**Tabela 5** – Níveis de metilação do DNA de genes relacionados às vias da inflamação de indivíduos com obesidade antes da intervenção dietética hipocalórica (n=11) e grupo controle (n=24)

<i>CpGs com menores níveis de metilação em mulheres com obesidade antes da intervenção</i>							
<b>CpG</b>	<b>Gene</b>	<b>CHR</b>	<b>Região do gene</b>	<b>Níveis metilação antes da intervenção (<math>\beta</math>)</b>	<b>Níveis metilação Grupo Controle (<math>\beta</math>)</b>	<b><math>\Delta\beta</math></b>	<b>p valor</b>
cg27302645	MAPKBP1	15	Corpo	0,77±0,18	0,87±0,03	-0,11	0,0015
<i>CpGs com maiores níveis de metilação em mulheres com obesidade antes da intervenção</i>							
<b>CpG</b>	<b>Gene</b>	<b>CHR</b>	<b>Região do gene</b>	<b>Níveis metilação antes da intervenção (<math>\beta</math>)</b>	<b>Níveis metilação Grupo Controle (<math>\beta</math>)</b>	<b><math>\Delta\beta</math></b>	<b>p valor</b>
cg12866960	IRAK3	12	Corpo	0,64±0,12	0,51±0,07	0,13	0,0061

Valores apresentados em média±desvio padrão; CHR: cromossomo;  $\beta$ : níveis de metilação, sendo que valores negativos indicam redução e valores positivos indicam aumento da metilação; 3'UTR: 3' região não traduzida; 5'UTR: 5' região não traduzida; TSS200: 200 pares de bases do local inicial de transcrição; TSS1500: 1500 pares de bases do local inicial de transcrição; 1stExon: primeiro éxon.

Do total de sítios CpGs com níveis de metilação diferentes entre mulheres com obesidade após intervenção e mulheres sem obesidade, 85 sítios CpGs (ANEXO 3) foram associados às vias da inflamação, dos quais 58 e 27 CpGs apresentavam maiores e menores níveis no grupo controle, respectivamente. Desse total, 55,2% encontravam-se no corpo do gene, enquanto 44,8% na região promotora.

A Tabela 6 mostra as características dos principais sítios CpGs (com maior  $\Delta\beta$ ) diferencialmente metilados entre pacientes com obesidade depois da intervenção dietética e mulheres sem obesidade.

**Tabela 6** – Níveis de metilação do DNA de genes relacionados às vias da inflamação de indivíduos com obesidade após intervenção dietética hipocalórica (n=11) e grupo controle (n=24)

<i>CpGs com menores níveis de metilação em mulheres com obesidade após intervenção</i>							
<b>CpG</b>	<b>Gene</b>	<b>CHR</b>	<b>Região do gene</b>	<b>Níveis metilação após intervenção (<math>\beta</math>)</b>	<b>Níveis metilação Grupo Controle (<math>\beta</math>)</b>	<b><math>\Delta\beta</math></b>	<b>p valor</b>
cg24258439	<i>TNFRSF11A</i>	18	Corpo	0,65±0,27	0,93±0,01	-0,28	0,0079
cg14985741	<i>TNFRSF19</i>	13	3'UTR	0,57±0,29	0,83±0,02	-0,27	0,0021
cg02302587	<i>IL1F10</i>	2	TSS200;5'UTR	0,62±0,28	0,88±0,01	-0,25	0,0001
cg12363898	<i>IL17RB</i>	3	Corpo	0,62±0,25	0,89±0,01	-0,27	0,0055
cg05440824	<i>CCL2</i>	17	TSS1500	0,57±0,31	0,88±0,02	-0,32	0,0080
cg26237003	<i>CCL28</i>	5	TSS1500	0,55±0,20	0,82±0,03	-0,26	0,0015
cg03564661	<i>IRAK3</i>	12	3'UTR	0,57±0,27	0,88±0,03	-0,31	0,0038
cg24944079	<i>TRAF6</i>	11	3'UTR	0,65±0,24	0,90±0,02	-0,25	0,0074
cg11355225	<i>NFKBIB</i>	19	3'UTR; Corpo	0,64±0,24	0,90±0,02	-0,26	0,0049
cg12615753	<i>NFKB1</i>	4	Corpo	0,58±0,29	0,87±0,02	-0,29	0,0053
<i>CpGs com maiores níveis de metilação em mulheres com obesidade após intervenção</i>							
<b>CpG</b>	<b>Gene</b>	<b>CHR</b>	<b>Região do gene</b>	<b>Níveis metilação após intervenção (<math>\beta</math>)</b>	<b>Níveis metilação Grupo Controle (<math>\beta</math>)</b>	<b><math>\Delta\beta</math></b>	<b>p valor</b>
cg25324068	<i>TNFSF13;TNFSF12-TNFSF13</i>	17	5'UTR;1stExon;Corpo	0,56±0,23	0,32±0,04	0,24	0,0030
cg16117781	<i>TNFRSF9</i>	1	Corpo	0,35±0,28	0,06±0,03	0,29	0,0009

cg07720188	<i>TNFRSF19</i>	13	TSS1500	0,43±0,26	0,18±0,04	0,25	0,0059
cg26847029	<i>CHUK</i>	10	TSS200	0,28±0,23	0,07±0,02	0,21	0,0010
cg09043153	<i>IL6ST</i>	5	TSS1500	0,24±0,21	0,06±0,00	0,19	0,0047
cg02314846	<i>ACAA1;MYD88</i> <i>PUS7L;IRAK4</i>	3	1stExon;Corpo; 5'UTR;TSS1500	0,20±0,21	0,01±0,01	0,19	0,0005
cg08728825	<i>TRAF6</i>	12	1stExon;5'UTR;TSS1500	0,44±0,31	0,13±0,02	0,32	0,0008
cg02911637	<i>NFKBIL1;</i>	11	5'UTR	0,26±0,19	0,06±0,03	0,20	0,0021
cg15649774	<i>ATP6V1G2</i>	6	TSS200;5'UTR;TSS1500	0,22±0,22	0,03±0,02	0,19	0,0030
cg19098421	<i>TANK</i>	2	5'UTR	0,22±0,23	0,02±0,01	0,20	0,0002

Valores apresentados em média±desvio padrão; CHR: cromossomo;  $\beta$ : níveis de metilação, sendo que valores negativos indicam redução e valores positivos indicam aumento da metilação; 3'UTR: 3' região não traduzida; 5'UTR: 5' região não traduzida; TSS200: 200 pares de bases do local inicial de transcrição; TSS1500: 1500 pares de bases do local inicial de transcrição; 1stExon: primeiro éxon.

### 7.3 Correlações entre variáveis fenotípicas e metilação do DNA

Observou-se correlações positivas entre os níveis de metilação do DNA de CpGs nos genes *CCL24*, *NFKB2* e *RIPK2* antes da intervenção dietética com o percentual de perda de peso e com as variações das concentrações de colesterol total, AST e ALT após intervenção dietética (Tabela 7).

**Tabela 7** – Correlações entre níveis de metilação de CpGs envolvidas com as vias da inflamação antes da intervenção dietética com perda de peso (%) e variação do Colesterol Total e enzimas hepáticas (AST e ALT) após intervenção dietética.

	Perda de peso (%)		Δ Colesterol Total		Δ AST		Δ ALT	
	r	p	r	p	r	p	r	p
cg12788666 ( <i>CCL24</i> )	0,645	0,032	-	-	-	-	-	-
cg25634545 ( <i>NFKB2</i> )	-	-	0,656	0,028	0,745	0,008	0,855	0,001
cg05892903 ( <i>RIPK2</i> )	-	-	-	-	0,691	0,019	-	-

Δ: delta; HDL-c: High Density Lipoproteins; LDL-c: Low Density Lipoproteins; AST: aspartato aminotransferase; ALT: Alanina aminotransferase

Quando comparadas as variações dos níveis de metilação do DNA após intervenção dietética com as variações das características fenotípicas, verificou-se correlação positiva de apenas uma CpG do gene *NR2C2* com a variação das concentrações de colesterol total ( $r=0,679$  e  $p=0,022$ )

### 7.4 Regressões lineares

A análise de regressão linear múltipla evidenciou contribuição dos níveis de metilação da cg25634545 no gene *NFKB2* no momento antes da intervenção na variação das concentrações de colesterol total com a intervenção dietética, mesmo após ajustado para idade, perda de peso (%) e perda de MG (Tabela 8). Os efeitos das outras correlações encontradas anteriormente desaparecem quando corrigidas pela perda de peso, idade e variação de massa gorda.

**Tabela 8** – Regressão linear múltipla mostrando a contribuição dos níveis de metilação da cg25634545 antes da intervenção dietética nas variações de colesterol total após dieta hipocalórica

	$\beta$	$r^2$	$p$	IC 95%
<b><math>\Delta</math>Colesterol Total</b>				
<b>cg25634545 (NFKB2)</b>				
Modelo 1	-2176,2	0,387	<b>0,050</b>	(-4346,6; -5,7)
Modelo 2	-2421,6	0,324	<b>0,034</b>	(-4604,6; -238,7)

$r^2$ : coeficiente de determinação, IC: intervalo de confiança, Modelo 1: regressão linear múltipla ajustada pela perda de peso (%) e idade, Modelo 2: regressão linear múltipla ajustada por  $\Delta$ MG e idade,  $p < 0,05$ .

## *Discussão*

## 8. DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que a intervenção dietética hipocalórica por seis semanas proporcionou redução significativa do peso, IMC, MCM e MG e modificou níveis de metilação do DNA de genes envolvidos em vias da inflamação.

A mudança do padrão alimentar atual da população mundial é a principal responsável pelo grande aumento do número de indivíduos com excesso de peso e obesidade, sendo essa uma consequência direta da globalização, desenvolvimento econômico e mudanças de papel da sociedade moderna (DE VOGLI et al., 2014; FOX et al., 2019). O processo de transição nutricional, no qual a população diminui o consumo de alimentos *in natura* para consumir alimentos altamente processados influencia também no aumento do desenvolvimento de doenças associadas à obesidade (HAIDAR & COSMAN, 2011; FOX et al., 2019; JAACKS et al., 2019; MARTI, et al., 2021).

Neste estudo, o consumo alimentar das mulheres com obesidade não foi significativamente diferente quando comparado com a alimentação durante hospitalização e com o consumo de mulheres sem obesidade. Essa informação contradiz com os dados antropométricos dessas pacientes e a explicação para tal fato pode ser o sub-relato alimentar por parte desse grupo. Malinowska et al. (2019) mostraram que 24,4% de um total de 410 indivíduos apresentaram subnotificação da alimentação.

Outro estudo realizado por Nonino et al. (2007) também mostrou sub-relato por parte de indivíduos com obesidade, pois ao fornecer aporte calórico de 2500 kcal/dia durante os 3 primeiros dias do estudo, as participantes apresentaram perda de peso, mesmo com o relato de consumo alimentar fora do ambiente hospitalar ser de 2100 kcal/dia. O sub-relato alimentar é um fenômeno complexo, envolvendo fatores morais, emocionais, sociais, físicos e cognitivos (SCAGLIUSI & LANCHÁ-JUNIOR, 2003).

Estudos prévios evidenciavam que uma intervenção com dieta hipocalórica era suficiente para proporcionar perda de peso em indivíduos com obesidade (COWBORN et al., 1997; CORTES-OLIVEIRA et al., 2016). Ramage et al., 2014 mostraram que a redução da ingestão calórica, associada com aumento da ingestão de fibra alimentar e prática de atividade física regular (pelo menos 150 minutos de atividade aeróbica por semana), além do auto-monitoramento e outras técnicas comportamentais são essenciais para a perda de peso saudável e manutenção da

mesma a longo prazo. Além disso, Mason et al., 2019 mostraram melhorias significativas no comportamento alimentar e perda de peso com um programa de perda de peso por 12 meses. Entretanto, os autores concluíram que para o sucesso da perda de peso a longo prazo, esses programas devem abordar melhor os comportamentos alimentares desordenados e suas comorbidades psicológicas comuns, incluindo transtornos de humor e ansiedade.

No presente estudo foi verificado uma média de perda de peso de  $9,2 \pm 3,6$  kg (5,6%) em seis semanas. Segundo estudo realizado por Wing et al. (2011), uma perda de peso modesta de 5 a <10% foi associada a melhorias significativas nos fatores de risco para DCV, como redução das concentrações de glicose, triglicerídeos e de pressão arterial, assim como o aumento das concentrações de HDL-c. Os autores também mostraram que quanto maior a perda de peso, maiores foram os benefícios aos indivíduos do estudo.

Pode-se observar também que apesar da significativa redução das variáveis de peso, IMC, MCM e MG das pacientes submetidas à intervenção dietética hipocalórica, não houve redução significativa da circunferência abdominal após o período de seis semanas de restrição calórica e, todas as variáveis analisadas mantiveram-se diferentes do grupo controle. A obesidade abdominal das pacientes do Grupo Intervenção manteve-se muito acima do preconizado pela OMS (WHO, 2003), sendo considerada um fator de risco independente para o desenvolvimento de doenças metabólicas e cardiovasculares, mesmo quando os indivíduos apresentam IMC dentro dos valores de normalidade e, principalmente quando associada ao sedentarismo (VELOSO & SILVA, 2010; TIGBE et al., 2017). A medida da circunferência abdominal tem sido amplamente utilizada na prática clínica considerada como critério diagnóstico para a síndrome metabólica (DESPRÉS et al., 2008; GOBATO et al., 2014; PERONA et al., 2019).

Observou-se no final desse estudo a diminuição da MG e da MCM. Alguns estudos relatam que até 25% da perda de peso obtida por meio de dieta com restrição energética de curto prazo é referente à diminuição da massa corporal magra (NICKLAS et al., 2009; FOSTER-SCHUBERT et al., 2012). Os programas de perda de peso mais comuns são capazes de reduzir peso corporal nas primeiras semanas, no entanto, uma quantidade significativa inclui perdas de massa corporal magra (MCM), além de alterações no status de fluido (WILLOUGHBY et al., 2018). Estudo realizado por Thomson et al. (2008) mostrou perda de peso média de 6,9 kg em 10

semanas de intervenção dietética, com redução de 2,9 kg de MG e 3,5 kg de MCM. Jaime et al. (2015) também mostraram redução de 3,9 kg, sendo 2,7 kg de MG e 0,3 de MCM em mulheres submetidas a 3 meses de dieta hipocalórica. Com isso, os resultados do presente estudo corroboram com estudos prévios.

Ainda, observamos redução das concentrações séricas de colesterol total, LDL-c e HDL-c após seis semanas de intervenção dietética. As pacientes com obesidade no momento pré-intervenção apresentaram valores significativamente maiores de glicemia e triglicerídeos e menores de HDL-c quando comparadas ao grupo controle. Após a intervenção, as mulheres com obesidade apresentaram menores valores de HDL-c e maiores valores de triglicerídeos em relação ao grupo controle. De acordo com estudos prévios, essa redução das concentrações de lipídios séricos é de extrema importância para a diminuição do risco para doenças cardio-metabólicas (FRANČULA-ZANINOVIĆ et al., 2018; CLIFTON, 2019). Além disso, nossos resultados corroboraram com estudo realizado por Jaime et al. (2015), o qual avaliou mulheres com obesidade submetidas a restrição calórica por três meses e observaram redução das concentrações séricas de triglicérides. Ademais, outros estudos também mostram melhora da qualidade de ingestão de gordura e carboidrato e redução das concentrações de lipídios após intervenção dietética hipocalórica, evidenciando a restrição energética e melhora da qualidade da dieta como uma estratégia eficaz no tratamento da dislipidemia (WOOD et al., 2006; VALLE et al., 2010; CLIFTON, 2019). A redução das concentrações de HDL-c apesar de ser prejudicial para o organismo, considerando sua atuação no controle do colesterol total, acontece em decorrência da redução geral dos lipídios séricos durante o processo de perda de peso (VALLE et al., 2010).

Neste estudo, não houve mudança na glicemia após intervenção dietética no grupo intervenção, porém, sabe-se que a perda de peso é importante no controle glicêmico em indivíduos com obesidade (KNOWLER, et al., 2002; GAAL & SCHEEN, 2015). Segundo estudo de Wing et al. (2011), indivíduos com sobrepeso e obesidade que apresentaram perda de 5 a 10% de seu peso corporal aumentaram as chances de redução de 0,5% da hemoglobina glicada. O fato das pacientes do presente estudo apresentarem concentrações de glicose dentro da faixa de normalidade antes do período de hospitalização pode ser a justificativa da sua manutenção após intervenção dietética e perda de peso.

O acúmulo de gordura hepática é o resultado de um desequilíbrio entre deposição e remoção de lipídios nesse órgão, no qual a síntese hepática de triglicerídeos pode ser considerada um mecanismo parcialmente protetor, com o objetivo de armazenar ácidos graxos livres que são tóxicos para o organismo (MARCHESINI et al., 2016). Os ácidos graxos livres podem ser provenientes da alimentação (cerca de 15%), da lipólise do tecido adiposo (60 a 80%) e do processo de lipogênese de novo (cerca de 26%) (MARCHESINI et al., 2016). Esse processo pode em partes explicar o aumento das enzimas hepáticas no presente estudo (AST e ALT). Acredita-se a perda de peso significativa durante as seis semanas de intervenção dietética hipocalórica levou ao aumento da lipólise no tecido adiposo e, assim, uma maior liberação de ácidos graxos livres, com consequente aumento de metabolização dessa gordura no fígado. Acredita-se que as seis semanas de intervenção dietética seja um tempo reduzido para se observar melhora do quadro de esteatose hepática em pacientes com obesidade em processo de perda de peso, como verificado em vários estudos, os quais realizaram avaliações a longo prazo (52 semanas) (VILAR-GOMEZ et al., 2015; LASSAILLY et al., 2015).

No presente estudo verificamos alterações dos níveis de metilação de sítios CpGs específicos em genes envolvidos com o processo inflamatório após intervenção dietética hipocalórica. Dentre os sítios que apresentaram hipometilação, todos estão presentes em genes envolvidos com o processo pró-inflamatório (*TNF*, *IL1A*, *IL6R*, *HGF*, *CCL2*, *CCL28*, *RIPK1*, *RIPK2*, *TRAF2*). Já os sítios que apresentaram hipermetilação, nove estão presentes em genes pró-inflamatórios (*IL6*, *CCL23*, *CCL24*, *CCL28*, *SQSTM1*, *RIPK2*, *NR2C2* e *NFKB2*) e apenas um em gene anti-inflamatório (*IL10RB*). Esses resultados mostram uma tendência a resposta pró-inflamatória, considerando a hipometilação de genes chaves no processo inflamatório, além de uma hipermetilação de um dos principais genes anti-inflamatórios.

Um estudo realizado por Tareen et al., 2020, o qual avaliou transcriptoma e proteômica, também encontrou aumento da resposta imune após perda e/ou manutenção do peso com dieta hipocalórica na maioria dos indivíduos analisados. Os autores esperavam que a perda de peso melhorasse a resposta inflamatória, porém, concluíram que uma escala de tempo seja influenciadora nos resultados de flexibilidade metabólica, ou seja, o tempo após perda e/ou manutenção da perda de peso contribui para a melhora de parâmetros relacionados ao metabolismo do tecido adiposo e resposta inflamatória. Os autores também acreditam que sejam necessários

mais estudos a fim de desvendar as possíveis interações celulares existentes, principalmente no tecido adiposo, no processo de emagrecimento em indivíduos com obesidade.

Gálvez et al. (2022) mostraram em um artigo de revisão que a maioria dos estudos recentes que investigam os efeitos da perda de peso por meio de intervenções dietéticas sem a prática de atividade física não apontaram para uma melhora do estado inflamatório, principalmente no tecido adiposo, mesmo quando ocorrem melhorias metabólicas. Entretanto, os estudos longitudinais associando perda de peso e alterações epigenéticas em genes das vias da inflamação são inexistentes na literatura, confirmando que nossos achados são inéditos.

Outra possível explicação para os resultados do presente estudo está relacionada com um processo adaptativo com a lipólise presente na perda de peso. Sabe-se que o processo de perda de peso induz o aumento da lipólise, que por sua vez proporciona a liberação de ácidos graxos livres (MARCHESINI et al., 2016). Com isso, a elevada circulação dos ácidos graxos livres poderia justificar a redução da metilação de genes pró-inflamatórios, considerando que são sinalizadores para os macrófagos do tipo M1 aumentem sua atuação na indução da resposta imune, principalmente no tecido adiposo (MCARDLE et al., 2013; RAY et al., 2016). Somada a essas evidências sobre a ação dos ácidos graxos livres na resposta pró-inflamatória, outro estudo mostrou que o tecido adiposo apresenta alterações que contribuem para liberação de células envolvidas na inflamação. A hiperplasia e hipertrofia dos adipócitos no tecido adiposo em indivíduos com obesidade diminuem a disponibilidade de oxigênio no tecido e induzem o processo de hipóxia, considerado um importante mecanismo envolvido na inflamação crônica relacionada a obesidade (GASPAR & VELLOSO, 2018). Complementando esses achados, um estudo realizado por Bekkering et al. (2014) mostrou que monócitos humanos isolados expostos a baixas concentrações de lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (oxLDL) induz macrófagos pró-inflamatórios via modificações epigenéticas, caracterizadas por aumento da produção de citocinas inflamatórias. Wang et al. (2016) também demonstraram evidências de que a alteração da metilação do DNA na obesidade pode ocorrer devido aos estímulos dos ácidos graxos saturados e citocinas pró-inflamatórias, como o TNF $\alpha$ , resultando na polarização desregulada de macrófagos, contribuindo para ativação da inflamação em indivíduos com obesidade.

Ao comparar mulheres com obesidade antes da intervenção dietética com mulheres com peso normal, observamos que os indivíduos do primeiro grupo apresentaram menor metilação de genes envolvidos com a síntese de proteína reguladora das vias de sinalização de JNK (*MAPKBP1*), além da maior metilação do gene *IRAK3*, envolvido com a transdução de sinal imune via Toll/IL-R, ou seja, mulheres com obesidade apresentam maiores atuações de genes envolvidos com a resposta pró-inflamatórias quando comparadas a mulheres com peso normal. Tais resultados podem ser explicados pela diferença de composição corporal entre os dois grupos do estudo, sendo o maior acúmulo de tecido adiposo nas mulheres com obesidade responsável por promover resposta inflamatória crônica e de baixo grau (LEÓN-PEDROZA et al., 2015; IVANOV et al., 2018).

Um dos primeiros mecanismos implicados no início da inflamação sistêmica de baixo grau é a inflamação no tecido adiposo branco visceral (LEÓN-PEDROZA et al., 2015). O processo de hiperplasia e hipertrofia do tecido adiposo visceral em indivíduos com obesidade levam a modificações no espaçamento da fração estromal vascular, ocasionando a hipóxia e necrose das células adiposas localizadas em áreas distantes dos vasos sanguíneos. Tal fato induz as células fagocíticas iniciarem um processo de inflamação, visando a remoção desses adipócitos (MURANO, et al., 2008; YOSHIZAKI et al., 2012; LEE et al., 2014, LEE et al., 2018). Além disso, o excesso de ácidos graxos armazenados nas células adiposas é capaz de exacerbar processos oxidativos como a lipoperoxidação dentro do adipócito. Esse processo proporciona um cenário de estresse oxidativo e, como consequência, numerosas células imunológicas são recrutadas para o tecido adiposo, iniciando um processo inflamatório local caracterizado pela elevação dos níveis de TNF- $\alpha$  e diminuição de IL10 e adiponectina (MURANO, et al., 2008; LEE et al., 2014, LEE et al., 2018).

Observamos 251 sítios CpGs, localizados em 96 genes, com níveis de metilação do DNA diferentes entre mulheres com peso normal e aquelas submetidas a intervenção dietética. Desses sítios, 59 apresentaram hipometilação, sendo 36 genes pró-inflamatório e apenas 1 gene anti-inflamatório. Dos 27 sítios que apresentaram hipermetilação, 23 estão envolvidos com o processo pró-inflamatório e apenas 1 com o processo anti-inflamatório. Dentre os genes que apresentaram hipometilação, podemos citar como os principais responsáveis por desencadear a resposta inflamatória o *TNF*, *IL1F10*, *IL1RAP*, *IL6R*, *IL6ST*, *IL17D*, *IL17RB*, *TRADD*, *TRAF6*, *NFKBIB* e o *NFKB1* e o gene *IL10*, responsável pela ação anti-inflamatória.

Nos indivíduos com peso normal, os macrófagos apresentam um fenótipo M2 (anti-inflamatório), o que pode sugerir que essas células dependem da oxidação de ácidos graxos para suas demandas metabólicas. Já na obesidade, a troca progressiva de macrófagos tipo M2 para o fenótipo M1 (pró-inflamatório) é acompanhado por alto conteúdo lipídico intracelular, sugerindo que a lipotoxicidade é um participante fundamental na geração de inflamação do tecido adiposo (PRIEUR et al., 2011). Acredita-se que o acúmulo excessivo de lipídios no tecido adiposo de indivíduos com obesidade é um evento importante na origem da polarização dos macrófagos para o tipo M1 ou que os macrófagos do tecido adiposo com esse fenótipo pró-inflamatório não seja capaz de utilizar lipídios como substratos energéticos e, portanto, se acumulam em excesso (PRIEUR et al., 2011; IVANOV et al., 2018).

Com isso, a comunicação entre células imunes e adipócitos é um importante regulador da função do tecido adiposo e do metabolismo sistêmico (CHUNG et al., 2018). Segundo metanálise realizada por Bianchi (2018) sobre a influência da perda de peso nos marcadores inflamatórios, o mesmo mostrou que, apesar da grande discrepância dos desenhos dos estudos presentes na literatura, a perda de peso modesta de 5% melhorou alguns parâmetros metabólicos, como a sensibilidade a insulina, enquanto uma perda de peso mais consistente (16%) regulou negativamente a expressão de genes marcadores inflamatórios.

Em complementação a esses achados, Roumans et al., 2017 verificaram que a inflamação de baixo grau em indivíduos com obesidade se mantém após intervenção dietética com restrição energética e perda de peso, porém a explicação para tal fato seria a redução do volume do adipócito devido à perda de triglicerídeos, criando um estresse entre o conteúdo celular e a matriz extracelular circundante (MEC).

Entretanto, observa-se que ainda são escassos estudos que avaliaram a influência da perda de peso após dieta hipocalórica em indivíduos com obesidade e metilação de genes das vias inflamatórias em comparação com indivíduos com peso normal.

No presente estudo verificou-se correlações positivas entre a metilação basal de 3 CpGs com a porcentagem de perda de peso (cg12788666 – gene *CCL24*), variação do Colesterol Total (cg25634545 – gene *NFKB2*) e enzimas hepáticas AST (cg25634545 – gene *NFKB2*; cg05892903 – gene *RIPK2*) e ALT (cg25634545 – gene *NFKB2*) após intervenção dietética. Entretanto, a análise de regressão linear múltipla

mostrou apenas a associação entre o nível de metilação da cg25634545 no gene *NFKB2* antes da intervenção dietética na variação da concentração de colesterol total após dieta hipocalórica, mesmo corrigindo para idade, perda de peso (%) e perda de MG.

Com isso, entende-se que quanto mais metilada essa CpG estava no início da intervenção, melhor foi a resposta (redução) das concentrações séricas de colesterol após intervenção dietética hipocalórica.

O NFKB é um ativador transcricional importante de mediadores inflamatórios, como as citocinas pró inflamatórias, sendo responsável por desencadear a inflamação nas células imunes (MULERO et al., 2019). Para ser ativado, esse fator de transcrição recebe sinalização de indutores fisiológicos, sendo o mais potente o TNF $\alpha$  (LIU et al., 2017). Em estudo prévio, Martín-Núñez et al., 2017 verificaram aumento da metilação do gene *TNF $\alpha$* , com consequente redução da ação do NFKB aos 6 meses após cirurgia bariátrica. Entretanto, os estudos são escassos na literatura associando nível de metilação entre os genes *NFKB* e TNF $\alpha$ , além de não existir evidências científicas associando dieta hipocalórica e perda de peso em mulheres com obesidade com nível de metilação desse fator de transcrição, tornando o presente estudo inédito.

Ainda, sobre a associação entre metilação do gene *NFKB* e concentração de colesterol após intervenção dietética, estudos descrevem que a melhora de indicadores inflamatórios em indivíduos com obesidade após perda de peso a longo prazo, incluindo a ação do NFKB, influência de forma importante em diversas vias relacionadas com o risco de desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, tais como diabetes e dislipidemia (BEKKERING et al., 2014; IVANOV et al., 2018; BIANCHI, 2018).

Além disso, a literatura mostra que o tecido adiposo é um importante local para armazenamento de colesterol em humanos, sendo aproximadamente 25% do *pool* dessa molécula armazenada em depósitos adiposos, os quais podem aumentar para, aproximadamente, 50% nos indivíduos com obesidade (CHUNG & PARKS, 2016). Com isso, entende-se que o aumento da metilação do gene *NFKB* no tecido adiposo no processo de inflamação crônica presente na obesidade, pode auxiliar a redução de colesterol no processo de perda de peso.

Entretanto é importante lembrar que o paradigma de conhecimento de vias isoladas está caindo por terra, pois a medida que mais interações de sinalização são descobertas, mais a sinalização linear é insuficiente para descrever a complexidade

de como a informação se propaga entre receptores e efetores. Com isso, a visão centrada na rede de interações representa um desafio para a ciência para assim melhor entender todo o processo de atuação de genes em condições específicas, tais como a inflamação na obesidade (MAITY & WOLLMAN, 2020).

Por fim, o aprofundamento no entendimento das vias da inflamação no processo de perda de peso após intervenção dietética hipocalórica em indivíduos com obesidade torna-se fundamental para determinar estratégias personalizadas para obtenção de melhores resultados no tratamento da obesidade e suas comorbidades associadas.

*Conclusões*

## 9. CONCLUSÕES

Com os resultados do presente estudo, pode-se concluir que:

- ❖ A análise do consumo alimentar das mulheres com obesidade mostra um possível sub-relato, pois os dados verificados não são condizem com as variáveis antropométricas das mesmas;
- ❖ A intervenção dietética hipocalórica é eficaz na redução de peso, MCM e MG, além de melhorar os parâmetros bioquímicos, principalmente perfil lipídico;
- ❖ Como esperado, mulheres com obesidade apresentam maiores valores de peso, IMC, CA, MCM e MG que mulheres com peso normal, além de pior perfil lipídico;
- ❖ A intervenção dietética hipocalórica proporcionou piora dos indicadores bioquímicos de TGO/AST e TGP/ALT, evidenciando uma resposta do organismo das mulheres com obesidade ao aumento de ácidos graxos livres durante o processo de lipólise na perda de peso;
- ❖ A intervenção dietética hipocalórica por seis semanas é capaz de alterar os níveis de metilação do DNA de genes relacionados as vias inflamatórias, evidenciando diminuição da metilação de genes relacionados ao processo de inflamação;
- ❖ Mulheres com obesidade antes da intervenção dietética hipocalórica e mulheres sem obesidade apresentam apenas dois sítios CpCs diferencialmente metilados, sendo esses sítios localizados em genes pró inflamatórios;
- ❖ Houve correlações positivas entre os níveis de metilação do DNA de CpGs nos genes *CCL24*, *NFKB2* e *RIPK2* antes da intervenção dietética com o percentual de perda de peso e com as variações das concentrações de colesterol total, AST e ALT após intervenção dietética;
- ❖ A regressão linear múltipla evidenciou contribuição dos níveis de metilação de CpG no gene *NFKB2* no momento antes da intervenção na variação das concentrações de colesterol total com a intervenção dietética, mesmo após ajustado para idade, porcentagem de perda de peso e perda de massa gorda.

*Referências  
Bibliográficas*

## 10. REFERÊNCIAS BOBLOGRÁFICAS

ABDUL, Q. A.; YU, B. P.; CHUNG, H. Y.; et al. Epigenetic modifications of gene expression by lifestyle and environment. **Arch Pharm**, v. 40, p. 1219–1237, 2017.

ARON-WISNEWSKY, J.; TORDJMAN, J.; POITOU, C.; DARAKHSHAN, F.; HUGOL, D.; BASDEVANT, A.; et al. Human adipose tissue macrophages: M1 and M2 cell surface markers in subcutaneous and omental depots and after weight loss. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 94, p. 4619-23, 2009.

ATTWOOD, J. T.; YUNG, R. L.; RICHARDSON, B. C. DNA methylation and the regulation of gene transcription. **CMLS, Cell. Mol. Life Sci**, v. 59, p. 241–257, 2002.

BEKKERING, S.; QUINTIN, J.; JOOSTEN, L. A. B.; VAN-DER-MEER, J. W. M.; NETEA, M. G.; RIKSEN, N. P. Oxidized low-density lipoprotein induces long-term proinflammatory cytokine production and foam cell formation via epigenetic reprogramming of monocytes. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 34, n. 8, p. 1731-8, 2014.

BIANCHI, V. E. Weight loss is a critical factor to reduce inflammation. **Clinical Nutrition ESPEN**. p. 1-15, 2018.

BLEICH, S.; CUTLER, D.; MURRAY, C.; Adams, A. Why is the developed world obese? **Annu Rev Public Health**, v. 29, p. 273–295, 2008.

BLUNDELL, J. E.; CAUDWELL, P.; GIBBONS, C.; HOPKINS, M.; NASLUND, E.; KING, N.; FINLAYSON, G. Role of resting metabolic rate and energy expenditure in hunger and appetite control: a new formulation. **Dis Model Mech**, v. 5, n. 5, p. 608-613, 2012.

CHAWLA, A.; NGUYEN, K.D.; GOH, Y.P. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 11. p. 738–49, 2011.

CHOOI, Y.; DING, C.; MAGCOS, F. The epidemiology of obesity. **Metabolismo**. v.92, p. 92-96, 2019.

CHUNG, S.; PARKS, J.S. Dietary Cholesterol Effects on Adipose Tissue Inflammation. **Curr Opin Lipidol**. v. 27, n. 1, p. 19-25, 2016.

CHUNG, K. J.; NATI, M.; CHAVAKIS, T.; CHATZIGEORGIOU, A. Innate immune cells in the adipose tissue. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 19, p. 283–292, 2018.

CLIFTON, P. M. Diet exercise and weight loss and dyslipidaemia. **Pathology**, v. 51, n. 2, p. 222-226, 2019.

CORELLA, D.; ORDOVAS, J. M. Basic concepts in molecular biology related to genetics and epigenetics. **Rev Esp Cardiol**, p. 1-10, 2017.

CORTES-OLIVEIRA, C.; NICOLETTI, C.F.; PINHEL, M.A.S.; OLIVEIRA, B.A.P.; QUINHONEIRO, D.C.G.; NORONHA, N.Y.; et al. UCP2 expression is associated with weight loss after hypocaloric diet intervention. **European Journal of Clinical Nutrition**. p. 1-5, 2016.

COWBURN, G., HILLSDON, M., HANKEY, C.R. Obesity management by life-style strategies. **British Medical Bulletin**, v.53, n.2, p.389-408, 1997.

DESPRÉS J. P.; LEMIEUX, I.; BERGERON, J.; PIBAROT, P.; MATHIEU, P.; LAROSE, E.; RODÉS-CABAU, J.; BERTRAND, O. F.; POIRIER, P. Abdominal obesity and the metabolic syndrome: contribution to global cardiometabolic risk. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 28, n. 6, p. 1039-49, 2008.

DE VOGLI, R.; KOUVONEN, A.; ELOVAINIO, M.; MARMOT, M. Economic globalization, inequality and body mass index: a cross-national analysis of 127 countries. **Crit Public Health**, v. 24, n. 1, p. 7–21, 2014.

DIRETRIZES BRASILEIRAS DE OBESIDADE. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. v.3, p.1-85, 2009.

DOLINOY, D. C.; WEIDMAN, J. R.; WATERLAND, R. A.; JIRTLE, R. L. Maternal genistein alters coat color and protects Avy mouse offspring from obesity by modifying the fetal epigenome. **Environmental health perspectives**, v. 114, n. 4, p. 567-572, 2006.

DRONG, A. W.; LINDGREN, C. M.; MCCARTHY, M. I. The genetic and epigenetic basis of type 2 diabetes and obesity. **Clinical pharmacology and therapeutics**, v. 92, n. 6, p. 707-715, 2012.

ENGIN, A. The Definition and Prevalence of Obesity and Metabolic Syndrome. **Adv Exp Med Biol**, p. 960:1-17; 2017.

FLORES-SIERRA, J.; ARREDONDO-GUERRERO, M.; CERVANTES-PAZ, B.; et al. The trans fatty acid elaidate affects the global DNA methylation profile of cultured cells and in vivo. **Lipids Health Dis**, v. 15, p. 75, 2016.

FOSTER-SCHUBERT, K.E. et al. Effect of diet and exercise, alone or combined, on weight and body composition in overweight-to-obese postmenopausal women. **Obesity**, Washington, v.20, p. 1628-1638, 2012.

FOX, A.; FENG, W.; ASAL, V. What is driving global obesity trends? Globalization or “modernization”? **Globalization and Health**, p. 15:32, 2019.

FRANČULA-ZANINOVIĆ, S.; NOLA, I. A. Management of Measurable Variable Cardiovascular Disease' Risk Factors. **Current Cardiology Reviews**, v. 14, p. 153-163, 2018.

FRASZCZYK, E.; LUIJTEN, M.; SPIJKERMAN, A. M. W.; SNIEDER, H.; WACKERS, P. F. K. The effects of bariatric surgery on clinical profile, DNA methylation, and ageing in severely obese patients. **Clinical Epigenetics**, v. 12, p. 14, 2020.

FRIEL, S.; HATTERSLEY, L.; SNOWDON, W.; THOW, A. M.; LOBSTEIN, T.; SANDERS, D.; et al. Monitoring the impacts of trade agreements on food environments. **Obes Rev**, v. 14, p. 120-134, 2013.

FROOD, S.; JOHNSTON, L. M.; MATTESON, C. L.; FINEGOOD, D. T. Obesity, complexity, and the role of the health system. **Curr Obes Rep**, Burnaby, v.2, p.320–326, 2013.

GAAL, L. V.; SCHEEN, A. Weight management in type 2 diabetes: current and emerging approaches to treatment. **Diabetes Care**, v. 38, n. 6, p. 1161-72, 2015.

GÁLVEZ, I.; NAVARRO, M. C.; MARTÍN-CORDERO, L.; OTERO, E. HINCHADO, M. D.; ORTEGA, E. The influence of obesity and weight loss on the biorregulation of innate/inflammatory responses: macrophages and immunometabolism. **Nutrients**, v. 14, p. 612, 2022.

GASPAR, J. M.; VELLOSO, L. A. Hypoxia Inducible Factor as a central regulator of metabolism – implications for the development of obesity. **Front Neurosci**, v. 12, p. 813, 2018.

GOBATO, A. O.; VASQUES, A. C. J.; ZAMBON, M. P.; BARROS-FILHO, A. A.; HESSEL, G. Metabolic syndrome and insulin resistance in obese adolescents. **Rev Paul Pediatr**, v. 32, n 1, p. 55-62, 2014.

GRANT, W. R.; DIXIT, V. D. Adipose tissue as an immunological organ. **Obesity (Silver Spring)**, v. 23, n. 3, p. 512–518, 2015.

Haidar, Y. M.; COSMAN, B. C. Obesity epidemiology. **Clin Colon Rectal Surg**, v. 24, n. 4, p. 205-210, 2011.

HALL, K.D.; BEMIS, T.; BRYCHTA, R.; CHEN, K.Y.; COURVILLE, A.; CRAYNER, E.J.; et al. Calorie for calorie, dietary fat restriction results in more body fat loss than carbohydrate restriction in people with obesity. **Cell Metab**, v. 22, n. 3, p. 427–436, 2015.

HINTZE, L. J.; MAHMOODIANFARD, S.; AUGUSTE, C. B.; DOUCET, E. Weight loss and appetite control in women. **Curr Obes Rep**, p. 1-18, 2017.

HU, T.; MILLS, K.T.; YAO, L.; DEMANELIS, K.; ELOUSTAZ, M.; YANCY, W.S.; et al. Effects of low-carbohydrate diets versus low-fat diets on metabolic risk factor: A meta-analysis of randomized controlled clinical trials. **American Journal of Epidemiology**, v. 176, n. 7, p. S44-S54, 2012.

IVANOV, S.; MERLIN, J.; LEE, M. K. S.; MURPHY, A. J.; GUINAMARD, R. R. Biology and function of adipose tissue macrophages, dendritic cells and B cell. **Atherosclerosis**, v. 271, p. 102-110, 2018.

JAACKS, L. M.; VANDEVIJVERE, S.; PAN, A.; MCGOWAN, C. J.; WALLACE, C.; IMAMURA, F.; et al. The Obesity Transition: Stages of the global epidemic. **Lancet Diabetes Endocrinol**, v. 7, n. 3, p. 231–240, 2019.

JAIME, T.J. et al. Effect of calorie restriction on energy expenditure in overweight and obese adult women. **Nutrición Hospitalaria**. v.31, n.6, p.2428-2436, 2015.

JAKICIC, J.M.; WING, R.R.; LANG, W. Bioelectrical impedance analysis to assess body composition in obese adult women: the effect of ethnicity. **Int J ObesRelatMetabDisord.**, London, v.22, n.3, p.243-249, 1998.

JIANG, M.; ZHANG, Y.; FEI, J.; CHANG, X.; FAN, W.; QIAN, X.; et al. Rapid quantification of DNA methylation by measuring relative peak heights in direct bisulfite-PCR sequencing traces. **Laboratory Investigation**, v. 90, p. 282-290, 2010.

JOHANSSON, K.; NEOVIUS, M.; HEMMINGSSON, E. Effects of anti-obesity drugs, diet, and exercise on weight-loss maintenance after a very-low-calorie diet or low-calorie diet: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Am J Clin Nutr**, v. 99, p. 14–23, 2014.

KAWAI, T.; AUTIERI, M. V.; SCALIA, R. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. **Am J Physiol Cell Physiol**. v. 320, p. C375-C391, 2021.

KNOWLER, W.C.; BARRETT-CONNOR, E.; FOWLER, S.E., et al. Diabetes Prevention Program Research Group. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. **N Engl J Med**. v.346, p.393–403, 2002.

KRATZ, M.; COATS, B. R.; HISERT, K. B.; HAGMAN, D.; MUTSKOV, V.; PERIS, E.; et al. Metabolic dysfunction drives a mechanistically distinct proinflammatory phenotype in adipose tissue macrophages. **Cell Metab**, v. 20, p. 614–25, 2014.

LACKEY, D. E.; BURK, D. H.; ALI, M. R.; MOSTAEDI, R.; PARK, J.; et al. Contributions of adipose tissue architectural and tensile properties toward defining

healthy and unhealthy obesity. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 306, p. E233-246, 2014.

LASSAILLY, G.; CAIAZZO, R.; BUOB, D.; PIGEYRE, M.; VERKINDT, H.; LABREUCHE, J.; et al. Bariatric surgery reduces features of non alcoholic steato hepatitis in morbidly obese patients. **Gastroenterology**. v. 149, p. 379-388, 2015.

LAVIE, C. J.; SCHUTTER, A. D.; PARTO, P.; JAHANGIR, E.; KOKKINOS, P.; ORTEGA, F. B.; et al. Obesity and Prevalence of Cardiovascular Diseases and Prognosis—The Obesity Paradox Updated. **Science Direct**, p. 537-547, 2016.

LEE, Y. S.; KIM, J. W.; OSBORNE, O.; OH, D. Y.; SASIK, R.; SCHENK, S.; et al. Increased adipocyte O<sub>2</sub> consumption triggers HIF-1 $\alpha$ , causing inflammation and insulin resistance in obesity. **Cell**, v. 157, p. 1339-1352, 2014.

LEE, Y. S.; WOLLAM, J.; OLEFSKY, J. M. An integrated view of immunometabolism. **Cell**, v. 172. P. 22-40, 2018.

LEÓN-PEDROZA, J. I.; GONZÁLEZ-TAPIA, L. A.; OLMO-GIL, E.; CASTELLANOS-RODRIGUEZ, D. ESCOBEDO, G.; GONZÁLEZ-CHÁVEZ, A. Inflamación sistémica de grado bajo y su relación con el desarrollo de enfermedades metabólicas: de la evidencia molecular a la aplicación clínica. **Cirugía y Cirujanos**, v. 83, n. 6, p. 543-551, 2015.

LIM, U.; SONG, M. A. Dietary and lifestyle factors of DNA methylation. **Methods Mol Biol**, v. 863, p. 359–376, 2012.

LINDHOLM, M. E.; MARABITA, F.; GOMEZ-CABRERO, D.; et al. An integrative analysis reveals coordinated reprogramming of the epigenome and the transcriptome in human skeletal muscle after training. **Epigenetics**. v. 9, p. 1557-1569, 2014.

LIONETT, S.; DANDANELL, S.; DELA, F.; HELGE, J. W. Effect of lifestyle changes on weight loss and weight loss maintenance. **Ugeskr Laeger**, v. 178, n. 44, p. V07160509, 2016.

LIU, T.; ZHANG, L.; JOO, D.; SUN, S.C. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. **Signal Transduct Target Ther**, v. 2, p. 17023, 2017.

LUFT, V. C.; SCHMIDT, M. I.; PANKOW, J. S.; et al. Chronic inflammation role in the obesity-diabetes association: a case-cohort study. **Diabetol Metab Syndr**, v. 5, p. 31, 2013.

LUMENG, C. N.; DEYOUNG, S. M.; BODZIN, J. L.; SALTIEL, A. R. Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. **Diabetes**, v. 56, p. 16-23, 2007.

MAITY, A. & WOLLMAN, R. Information transmission from NFkB signaling dynamics to gene expression. **PLoS Comput Biol**. v. 16, n. 8, p. e1008011, 2020.

MALINOWSKA, A. M.; MLODZIK-CZYZEWSKA, M. A.; CHMURZYNSKA, A. Dietary patterns associated with obesity and overweight: when should misreporters be included in analysis?. *Nutrition*, 2019.

MALTA, D.C. et al. Evolução anual da prevalência de excesso de peso e obesidade em adultos nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal entre 2006 e 2012. **Rev Bras Epidemiol Suppl PeNSE**, Brasília, p. 267-276, 2014.

MARCHESINI, G.; PETTA, S.; GRAVE, R. D. Diet, Weight Loss, and Liver Health in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathophysiology, Evidence, and Practice. **Hepatology**. v. 63, n. 6, 2016.

MARRANZANO, M.; RAY, S.; GODOS, J.; et al. Association between dietary flavonoids intake and obesity in a cohort of adults living in the mediterranean area. **Int J Food Sci Nutr**, v. 69, p. 1020-1029, 2018.

MARTI, A.; CALVO, C.; MARTÍNEZ, A. Consumo de alimentos ultraprocesados y obesidad: una revision sistemática. **Nutr Hosp**, v. 38, n. 1, p. 177-185, 2021.

MARTÍN-NÚÑEZ, G.M.; CABRERA-MULERO, A.; ALCAIDE-TORRES, J.; GARCÍA-FUENTES, E.; TINAHONES, F.J.; MORCILLO, S. No effect of different bariatric surgery procedures on LINE-1 DNA methylation in diabetic and nondiabetic morbidly obese patients. **Surg Obes Relat Dis**, v. 13, p. 442–50, 2017.

MASON, C.; TAPSOBA, J. D.; DUGGAN, C.; WANG, C. Y.; ALFANO, C. M.; MCTIERNAN, A. Eating behaviors and weight loss outcomes in a 12-month randomized trial of diet and/ or exercise intervention in postmenopausal women. **International Journal of Behavioral Nutrition and Physical Activity**, v. 16, p. 113, 2019.

MAURIZI, G.; DELLA GUARDIA, L.; MAURIZI, A.; POLONI, A. Adipocytes properties and crosstalk with immune system in obesity-related inflammation. **J Cell Physiol**, v. 233, n. 1, p. 88-97, 2018.

MAZZIO, E. A.; SOLIMAN, K. F. Basic concepts of epigenetics: impact of environmental signals on gene expression. **Epigenetics**, n. 7, p. 119–130, 2012.

MCARDLE, M. A.; FINUCANE, O. M.; CONNAUGHTON, R. M.; MCMORROW, A. M.; ROCHE, H. M. Mechanisms of obesity-induced inflammation and insulin resistance: insights into the emerging role of nutritional strategies. **Endocrinology**, v. 4, p. 1-23, 2013.

MCLAUGHLIN, T.; ACKERMAN, S. E.; SHEN, L.; ENGLEMAN, E. Role of innate and adaptive immunity in obesity-associated metabolic disease. **J Clin Invest**, v. 127, n. 1, p, 5–13, 2017.

MERRA, G.; GRATTERI, S.; DE LORENZO, A.; BARRUCCO, S.; PERRONE, M.A.; AVOLIO, E.; et al. Effects of very-low-calorie diet on body composition, metabolic state, and genes expression: a randomized double-blind placebo-controlled trial. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 21, n. 2, p.329-345, 2017.

MILAGRO, F. I.; MANSEGO, M. L.; DE MIGUEL, C.; MARTÍNEZ, J. A. Dietary factors, epigenetic modifications and obesity outcomes: Progresses and perspectives. **Molecular Aspects of Medicine**. 2012.

MORCILLO, S.; MACÍAS-GONZÁLEZ, M.; TINAHONES, F. J. The Effect of Metabolic and Bariatric Surgery on DNA Methylation Patterns. **Curr Atheroscler Rep**, v. 19, p. 40, 2017.

MULERO, M. C.; WANG, V. Y. F.; HUXFORD, T.; GHOSH, G. Genome reading by the NF- $\kappa$ B transcription factors. **Nucleic Acids Res**, v. 47, n. 19, p. 9967-9989, 2019.

MURANO, I.; BARBATELLI, G.; PARISANI, V.; LATINI, C.; MUZZONIGRO, G.; CASTELLUCCI, M.; et al. Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice. **J Lipid Res**, v. 49, n. 7, p. 1562-8, 2008.

NICKLAS B.J. et al. Effect of exercise intensity on abdominal fat loss during calorie restriction in overweight and obese postmenopausal women: a randomized, controlled trial. **Am J Clin Nutr**. v.89; p.1043-1052, 2009.

NICOLETTI, C. F.; CORTES-OLIVEIRA, C.; NORONHA, N. Y.; PINHEL, M. A. S.; DANTAS, W. S.; JÁCOME, A.; MARCHINI, J. S.; GUALANO, B.; CRUJEIRAS, A. B.; NONINO, C. B. DNA methylation pattern changes following a short-term hypocaloric diet in women with obesity. **European Journal of Clinical Nutrition**, 2020.

NICOLETTI, C. F.; NONINO, C. B.; OLIVEIRA, B. A. P.; PINHEL, M. A. S.; MANSEGO, M. L.; MILAGRO, F. I.; ZULET, M. A.; MARTINEZ, J. A. DNA methylation and hydroxymethylation levels in relation to two weight loss strategies: Energy-restricted diet or bariatric surgery. **Obes Surg**, n. 26, p. 603-611, 2016.

NILSSON, E.; LING, C. DNA methylation links genetics, fetal environment, and an unhealthy lifestyle to the development of type 2 diabetes. **Clin Epigenetics**, v. 9, p. 105, 2017.

NONINO, C.B. Influence of meal time on salivary circadian cortisol rhythms and weight loss in obese women. **Nutrition**., Ribeirão Preto, v.23, p.385-391, 2007.

OBERLANDER, L.; DISDIER, A. C.; ETILÉ, F. Globalisation and national trends in nutrition and health: a grouped fixed-effects approach to intercountry heterogeneity. **Health Econ**, v. 26, p. 1146–61, 2017.

OLEFSKY, J. M.; GLASS, C. K. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. **Annu Rev Physiol**. v. 72, p. 219-246, 2010.

OLIVEIRA, B. A. P.; PINHEL, M. A. S.; FERREIRA, C. N.; CORTES-OLIVEIRA, C.; QUINHONEIRO, D. C. G.; NORONHA, N. Y.; MARCHINI, J. S.; MARCHRY, A. J.; SALGADO JUNIOR, W.; Nonino, C.B. UCP1 and UCP3 Expression Is Associated with Lipid and Carbohydrate Oxidation and Body Composition. **PLoS One**, v. 11, p. e0150811, 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). *Obesidade: prevenção e controle e epidemia global relatório da consultoria da OMS*. São Paulo: **Editora Roca**; 2004.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. *Global status report on non communicable diseases 2010*. Geneva: WHO; 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. *Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases. Report FAO/WHO Expert Consultation*. WHO Technical Report Series, No. 916 (TRS 916). Geneva: WHO; 2003.

OSBORN, O.; OLEFSKY, J. M. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. **Nat Med**, v. 18, n. 3, p.363–74, 2012.

PENA, S. D. J.; et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. **PLoS One**, San Francisco. v. 6, n. 2, 2009.

PERONA, J. S.; RIO-VALLE, J. S.; RAMÍREZ-VÉLEZ, R.; CORREA-RODRÍGUEZ, M.; FERNÁNDEZ-APARICIO, A.; GONZÁLEZ-JIMÉNEZ, E. Waist circumference and abdominal volume index are the strongest anthropometric discriminators of metabolic syndrome in Spanish adolescents. **Eur J Clin Invest**, v. 49, n. 3, p. e13060, 2019.

PHILLIPS, C. M.; PERRY, I.J. Does Inflammation Determine Metabolic Health Status in Obese and Nonobese Adults? **J Clin Endocrinol Metab**, v. 98, p. E1610–1619, 2013.

PICHÉ, M. E.; TCHERNOF, A.; DESPRÉS, J. P. Obesity phenotypes, Diabetes and Cardiovascular Diseases. **Circulation Research**. v. 126, n. 11, p. 1477-1500, 2020.

PRIEUR, X.; MOK, C. Y.; VELAGAPUDI, V. R.; et al. Differential lipid partitioning between adipocytes and tissue macrophages modulates macrophage lipotoxicity and M2/M1 polarization in obese mice. **Diabetes**. v. 60, p. 797-809, 2011.

RAKYAN, V. K.; DOWN, T. A.; BALDING, D. J.; BECK, S. Epigenome-wide association studies for common human diseases. **Nature reviews. Genetics.** v. 12, n. 8, p. 529-541, 2011.

RAMAGE, S.; FARMER, A.; ECCLES, K. A. MCCARGAR, L. Healthy strategies for successful weight loss and weight maintenance: a systematic review. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 39, 2014.

RAVUSSIN, E.; BEYL, R. A.; POGGIOGALLE, E.; HSIA, D. S.; PETERSON, C. M. Early Time-Restricted Feeding Reduces Appetite and Increases Fat Oxidation but Does Not Affect Energy Expenditure in Humans. **Obesity**, v. 27, n. 8, p. 1244–1254, 2019.

RAY, I.; MAHATA, S. K.; DE, R. K. Obesity: An immunometabolic perspective. **Endocrinol**, v. 7, p. 157, 2016.

RAYMOND, S. U.; LEEDER, S.; GREENBERG, H.M. Obesity and cardiovascular disease in developing countries: a growing problem and an economic threat. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 9, p. 111–6, 2006.

REICHETZEDER, C. Overweight and obesity in pregnancy: their impact on epigenetics. **European Journal of Clinical Nutrition.** v. 75, p. 1710-1722. 2021.

REMELY, M.; LOVRECIC, L.; DE LA GARZA, A. L.; et al. Therapeutic perspectives of epigenetically active nutrients. **Br J Pharmacol**, v. 172, p. 2756–2768, 2015.

RENDO-URTEAGA, T.; GARCÍA-CALZÓN, S.; GONZÁLEZ-MUNIESA, P.; et al. Peripheral blood mononuclear cell gene expression profile in obese boys who followed a moderate energy-restricted diet: differences between high and low responders at baseline and after the intervention. **Br J Nutr**, v. 113, p. 331–342, 2015.

ROHDE, K.; KELLER, M.; POULSEN, L. L. C.; BLÜHER, M.; KOVACS, P.; BÖTTCHER, Y. Genetics and epigenetics in obesity. **Metabolism Clinical and Experimental.** v. 92, p. 37-50, 2019.

RÖNN, T.; VOLKOV, P.; DEVAGARDH, C.; et al. A six months exercise intervention influences the genome-wide DNA methylation pattern in human adipose tissue. **PLoS Genet.** v. 9, p. e1003572, 2013.

ROUMANS, N. J. T.; VINK, R. G.; FAZELZADEH, P.; VAN BAAK, M. A.; MARIMAN, E. C. M. A role for leukocyte integrins and extracellular matrix remodeling of adipose tissue in the risk of weight regain after weight loss. *Am J Clin Nutr*, v. 105, p. 1054-60, 2017.

RUF, W.; SAMAD, F. Tissue factor pathways linking obesity and inflammation. **Hamostaseologie**, v. 35, n. 3, p. 279-283, 2015.

RUSSO, L.; LUMENG, C.N. Properties and functions of adipose tissue macrophages in obesity. **Immunology**, v. 155, p. 407-417, 2018.

SAMBLAS, M.; MILAGRO, F. I.; MARTINEZ, A. DNA methylation markers in obesity, metabolic syndrome, and weight loss. **Epigenetics**, v. 14, n. 5, p. 421-444, 2019.

SCAGLIUSI, F.B.; LANCHÁ-JÚNIOR, A.H. Subnotificação da ingestão energética na avaliação do consumo alimentar. **Rev. Nutr.**, Campinas. v.16, n.4, p.471-481, 2003.

SEIJKENS, T.; KUSTERS, P.; CHATZIGEORGIOU, A.; CHAVAKIS, T.; LUTGENS, E. Immune cell crosstalk in obesity: a key role for costimulation? **Diabetes**, v. 63, n. 12, p. 3982–91, 2014.

SHARMA, A. Transgenerational epigenetics: integrating soma to germline communication with gametic inheritance. **Mech Ageing Dev**, v. 163, p. 15-22, 2017.

SHENKER, N. S.; POLIDORO, S.; VAN-VELDHOVEN, K.; SACERDOTE, C.; RICCERI, F.; BIRRELL, M. A.; et al. Epigenome-wide association study in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-Turin) identifies novel genetic loci associated with smoking. **Human molecular genetics**. v. 22, n. 5, p. 843-851, 2013.

SHOELSON, S. E.; LEE, J.; GOLDFINE, A. B. Inflammation and insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 116, n. 7, p. 1793-1801, 2017.

STUCKLER, D.; MCKEE, M.; EBRAHIM, S.; BASU, S. Manufacturing epidemics: the role of global producers in increased consumption of unhealthy commodities including processed foods, alcohol, and tobacco. **PLoS Med**, v. 9, n. 6, p. 10, 2012.

TANNAHILL, G. M.; CURTIS, A.M.; ADAMIK, J.; PALSSON-MCDERMOTT, E. M.; MCGETTRICK, A. F.; GOEL, G.; et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 beta through HIF-1alpha. **Nature**, v. 496, p. 238-242, 2013.

TAREEN, S. H. K.; KUTMON, M.; DE KOK, T. M.; MARIMAN, E. C. M.; VAN BAAK, M. A.; EVELO, C. T.; ADRIAENS, M. E.; ARTS, I. C. W. Stratifying cellular metabolism during weight loss: an interplay of metabolic flexibility and inflammation. **Scientific Reports**, v. 10, p. 1651, 2020.

THOMSON, R.L. et al. The effect of a hypocaloric diet with and without exercise training on body composition, cardiometabolic risk profile, and reproductive function in overweight and obese women with polycystic ovary syndrome. **J Clin Endocrinol Metab**. Adelaide., v. 93, n. 9, p. 3373-3380, 2008.

TIGBE, W. W.; GRANAT, M. H.; SATTAR, N.; LEAN, M. E. J. Time spent in sedentary posture is associated with waist circumference and cardiovascular risk. **International Journal of Obesity**, v. 41, p. 689–696, 2017.

VALLE, V.S.; BIEHL, C.; MELLO, D.B.; FORTES, M.S.R; DANTAS, E.H.M. Efeito da dieta hipoenergética sobre a composição corporal e nível sérico lipídico de mulheres adultas com sobrepeso. **Rev Nutr**. Campinas, v.23, n.6, p.959-967, 2010.

VAN DIJK, S. J.; TELLAM, R. L.; MORRISON, J. L.; et al. Recent developments on the role of epigenetics in obesity and metabolic disease. **Clin Epigenetics**, v. 7, p. 66, 2015.

VELOSO, H.J.F.; SILVA, A.A.M. Prevalência e fatores associados à obesidade abdominal e ao excesso de peso em adultos maranhenses. **Rev Bras Epidemiol.**, São Paulo, v.13, n.3, p.400-412, 2010.

VERHEGGEN, R. J. H. M.; MAESSEN, M. F. H.; GREEN, D. J.; HERMUS, A. R. M. M.; HOPMAN, M. T. E.; THIJSSSEN A. R. M. A systematic review and meta-analysis on the effects of exercise training versus hypocaloric diet: distinct effects on body weight and visceral adipose tissue. **Obes Rev**, v. 17, n. 8, p. 664-90, 2016.

VIGITEL. Vigitel. Brasil. Vigitel Brasil 2020: Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília: Ministério da Saúde 2021.

VILAR-GOMEZ, E.; MARTINEZ-PEREZ, Y.; CALZADILLA-BERTOT, L.; TORRES-GONZALEZ, A.; GRA-ORAMAS, B.; GONZALEZ-FABIAN, L.; et al. Weightloss through lifestyle modification significantly reduces features of non alcoholic steato hepatitis. **Gastroenterology**, v. 149, p. 367-378.e5, 2015.

VOISIN, S.; EYNON, N.; YAN, X.; BISHOP, D. J. Exercise training and DNA methylation in humans. **Acta Physiol**, v. 213, p. 39-59, 2015.

WANG, X.; CAO, Q.; YU, L.; SHI, HUIDONG, XUE, B.; SHI, HANG. Epigenetic regulation of macrophage polarization and inflammation by DNA methylation in obesity. **JCI Insight**, v. 1, n. 19, p. e87748, 2016.

WEISBERG, S. P.; MCCANN, D.; DESAI, M.; ROSENBAUM, M.; LEIBEL, R.L.; FERRANTE, A. W. J. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **J Clin Invest**, v. 112, p. 1796–808, 2003.

WILLOUGHBY, D.; HEWLINGS, S.; KALMAN, D. Body Composition Changes in Weight Loss: Strategies and Supplementation for Maintaining Lean Body Mass, a Brief Review. **Nutrients**, v. 10, p. 1876, 2018.

WING, R. R.; LANG, W.; WADDEN, T. A.; SAFFORD, M.; KNOWLER, W. C.; BERTONI, A. G. Benefits of Modest Weight Loss in Improving Cardiovascular Risk Factors in Overweight and Obese Individuals With Type 2 Diabetes. **DIABETES CARE**, v. 34, p. 1481-1486, 2011.

WOOD, R.J.; VOLEK, J.S.; LIU, Y.; SHACHTER, N.S.; CONTOIS, J.H.; FERNANDEZ, M.L. Carbohydrate restriction alters lipoprotein metabolism by modifying VLDL, LDL, and HDL subfraction distribution and size in overweight men. **J Nutr**. v.136, n.2, p.384-9, 2006.

WORMSER, D.; KAPTOGE, S.; DI, A. E.; et al. Separate and combined associations of body-mass index and abdominal adiposity with cardiovascular disease: collaborative analysis of 58 prospective studies. **Lancet**, v. 377, n. 9771, p. 1085-1095, 2011.

XUE, J.; SCHMIDT, S.V.; SANDER, J.; DRAFFEHN, A.; KREBS, W.; QUESTER, I.; et al. Transcriptomebased network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. **Immunity**, v. 40, p.274–88, 2014.

YOSHIZAKI, T.; KUSUNOKI, C.; KONDO, M.; YASUDA, M.; KUME, S.; MORINO, K.; et al. Autophagy regulates inflammation in adipocytes. **BiochemBiophys Res Commun**, v. 417, n. 1, p. 352-7, 2012.

*Apêndices*

## APÊNDICES

**APÊNDICE A** - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido das pacientes que realizaram intervenção dietética.



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Você está sendo convidado (a) a participar da pesquisa intitulada **“Marcadores epigenéticos da via inflamatória antes e após intervenção dietética hipocalórica em mulheres com obesidade grau III”** coordenada pela professora Dra. Carla Barbosa Nonino, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo e com participação da aluna de Doutorado Cristiana Cortes de Oliveira. Essa pesquisa irá incluir pacientes com obesidade grau III e magros e apresenta o objetivo de caracterizar e avaliar a relação entre o perfil genético, de exames bioquímicos, peso, circunferência abdominal (CA), Índice de massa corporal (IMC), composição corporal (quantidade de gordura e músculo) e ingestão alimentar antes e após dieta com baixa caloria (1200 kcal/dia) para perda de peso.

Caso você aceite participar, você será incluída em um programa de internação para redução de peso já existente neste serviço. Este programa chamado “Programa de internação” acontece na enfermaria de Nutrologia do HCFMRP, tem duração de 6 semanas e conta com vários profissionais incluindo médicos, nutricionista e enfermeiros que acompanham as pacientes por todo o período de internação.

No primeiro dia da internação serão realizadas as seguintes avaliações:

**1-)** Medidas de peso, altura, circunferência do abdômen.

**2-)** Um exame que verifica sua quantidade de músculo e gordura. Esse exame é chamado Bioimpedância Elétrica, é indolor e não invasivo e realizado com você deitado no leito, com adesivos colados na pele da mão e pé direitos. Para realização desse exame será necessário que você fique em jejum de pelo menos 4 horas. Esse exame tem duração de 3 minutos.

**3-)** Coleta de sangue (uma colher de sopa). Será realizada por enfermeiro por meio de uma picada de agulha. Esse procedimento poderá causar uma pequena mancha arroxeadada no local que desaparece em poucos dias. O sangue será utilizado para verificação de parâmetros bioquímicos e perfil genético (padrão de metilação).

**4-)** Análise da sua alimentação (todos os alimentos que você consome durante um dia) por meio do questionário chamado de Recordatório 24 horas.

Durante as 6 semanas de internação você receberá dieta com baixa caloria (1200 kcal/dia) distribuídas em seis refeições por dia. No último dia de internação todos os procedimentos serão realizados novamente.

Sua participação é voluntária nesta pesquisa e estará ajudando a conhecer a relação existente entre o seu material genético e todas as variáveis analisadas, contribuindo para que novos métodos de tratamento para obesidade sejam adotados.

Queremos deixar claro que será garantido o sigilo da sua identidade e a privacidade das informações coletadas. Esclarecemos que você não receberá nenhum pagamento do pesquisador ou do hospital e que poderá desistir de participar do estudo a qualquer momento, sem que isto prejudique seu atendimento e acompanhamento habitual.

No caso de alterações nos exames você será comunicado e orientado para tratamento, se necessário. Caso ocorra dano decorrente da participação na pesquisa, você terá direito a indenização conforme as leis vigentes no país.

Qualquer dúvida apresentada durante a pesquisa, você poderá entrar em contato conosco pelo telefone (16) 3315-4810 ou pelo email [cristiana.cortes@outlook.com](mailto:cristiana.cortes@outlook.com) ou no Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de medicina de Ribeirão Preto pelo telefone (16) 3602-2228.

Eu, \_\_\_\_\_,  
RG: \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ anos de idade, concordo com minha participação nesta pesquisa e declaro ter compreendido o termo de consentimento acima sendo minha participação inteiramente voluntária.

Ribeirão Preto, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Nome por extenso da participante

\_\_\_\_\_  
Assinatura da participante

\_\_\_\_\_  
Nome por extenso do pesquisador da equipe

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador da equipe

**APÊNDICE B** – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido das pacientes com peso normal.



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**  
**DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Você está sendo convidado (a) a participar da pesquisa intitulada “Marcadores epigenéticos da via inflamatória antes e após intervenção dietética hipocalórica em mulheres com obesidade grau III” coordenada pela professora Dra. Carla Barbosa Nonino, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo e com participação da aluna de Doutorado Cristiana Cortes de Oliveira. Essa pesquisa irá incluir pacientes com obesidade grau III e magros e apresenta o objetivo de caracterizar e avaliar a relação entre o perfil genético, de exames bioquímicos, peso, circunferência abdominal (CA), Índice de massa corporal (IMC), composição corporal (quantidade de gordura e músculo) e ingestão alimentar.

Caso você aceite participar da pesquisa, será agendado um dia para realização das seguintes avaliações:

**1-)** Medidas de peso, altura, circunferência do abdômen.

**2-)** Um exame que verifica sua quantidade de músculo e gordura. Esse exame é chamado Bioimpedância Elétrica, é indolor e não invasivo e realizado com você deitado no leito, com adesivos colados na pele da mão e pé direitos. Para realização desse exame será necessário que você fique em jejum de pelo menos 4 horas. Esse exame tem duração de 3 minutos.

**3-)** Coleta de sangue (uma colher de sopa). Será realizada por enfermeiro por meio de uma picada de agulha. Esse procedimento poderá causar uma pequena mancha arroxeadada no local que desaparece em poucos dias. O sangue será utilizado para verificação de parâmetros bioquímicos e perfil genético (padrão de metilação).

**4-)** Análise da sua alimentação por meio do Recordatório 24 horas (você deve relatar para o pesquisador tudo o que ingeriu nas últimas 24 horas).

Todas as avaliações citadas acima serão realizadas uma única vez no projeto.

Sua participação é voluntária nesta pesquisa e estará ajudando a conhecer a relação existente entre o seu material genético e todas as variáveis analisadas, contribuindo para que novos métodos de tratamento para obesidade sejam adotados.

Queremos deixar claro que será garantido o sigilo da sua identidade e a privacidade das informações coletadas. Esclarecemos que você não receberá nenhum pagamento do pesquisador ou do hospital e que poderá desistir de participar do estudo a qualquer momento, sem que isto prejudique seu atendimento e acompanhamento habitual.

No caso de alterações nos exames você será comunicado e orientado para tratamento, se necessário. Caso ocorra dano decorrente da participação na pesquisa, você terá direito a indenização conforme as leis vigentes no país.

Qualquer dúvida apresentada durante a pesquisa, você poderá entrar em contato conosco pelo telefone (16) 3315-4810 ou pelo email [cristiana.cortes@outlook.com](mailto:cristiana.cortes@outlook.com) ou no Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de medicina de Ribeirão Preto pelo telefone (16) 3602-2228.

Eu, \_\_\_\_\_, RG: \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ anos de idade, concordo com minha participação nesta pesquisa e declaro ter compreendido o termo de consentimento acima sendo minha participação inteiramente voluntária.

Ribeirão Preto, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Nome por extenso da participante

\_\_\_\_\_  
Assinatura da participante

\_\_\_\_\_  
Nome por extenso do pesquisador da equipe

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador da equipe

## APÊNDICE C

**Tabela 6** – Níveis de metilação do DNA de genes relacionados às vias da inflamação de indivíduos com obesidade após intervenção dietética hipocalórica (n=11) e grupo controle (n=24)

*CpGs com menores níveis de metilação em mulheres com obesidade após intervenção*

<b>CpG</b>	<b>Gene</b>	<b>CHR</b>	<b>Região do gene</b>	<b>Níveis metilação após intervenção (<math>\beta</math>)</b>	<b>Níveis metilação Grupo Controle (<math>\beta</math>)</b>	<b><math>\Delta\beta</math></b>	<b>p valor</b>
cg17741993	<i>TNF</i>	6	Corpo	0,45±0,17	0,63±0,06	-0,18	0,0001
cg12601933	<i>TNFRSF1B</i>	1	Corpo	0,76±0,26	0,89±0,01	-0,12	0,0002
cg15208519	<i>TNFRSF1B</i>	1	Corpo	0,73±0,18	0,86±0,02	-0,14	0,0001
cg03422094	<i>TNFRSF8</i>	1	Corpo	0,75±0,26	0,90±0,02	-0,15	0,0005
cg00463840	<i>TNFRSF8</i>	1	5'UTR; Corpo	0,69±0,26	0,88±0,01	-0,19	0,0003
cg22572614	<i>TNFSF10</i>	3	TSS1500	0,73±0,19	0,88±0,02	-0,15	0,0017
cg17279410	<i>TNFRSF11A</i>	18	Corpo	0,68±0,17	0,83±0,03	-0,15	0,0015
cg24258439	<i>TNFRSF11A</i>	18	Corpo	0,65±0,27	0,93±0,01	-0,28	0,0079
cg17267493	<i>TNFSF12;TNFSF13;</i> <i>TNFSF12-TNFSF13</i>	17	Corpo;TSS1500	0,78±0,19	0,90±0,01	-0,12	0,0038
cg05186704	<i>TNFRSF17</i>	16	TSS1500	0,81±0,19	0,96±0,01	-0,15	0,0081
cg22168386	<i>TNFRSF19</i>	13	Corpo	0,67±0,25	0,86±0,12	-0,19	0,0003
cg20326248	<i>TNFRSF19</i>	13	Corpo	0,68±0,23	0,91±0,07	-0,22	0,0005
cg24776343	<i>TNFRSF19</i>	13	Corpo	0,68±0,25	0,91±0,01	-0,23	0,0003
cg14985741	<i>TNFRSF19</i>	13	3'UTR	0,57±0,29	0,83±0,02	-0,27	0,0021

cg01704609	<i>TNFRSF19</i>	13	Corpo	0,61±0,27	0,85±0,03	-0,24	0,0002
cg22168386	<i>TNFRSF19</i>	13	Corpo	0,67±0,25	0,86±0,12	-0,19	0,0003
cg20326248	<i>TNFRSF19</i>	13	Corpo	0,68±0,23	0,91±0,07	-0,22	0,0005
cg18015809	<i>TNFRSF21</i>	6	Corpo	0,80±0,15	0,91±0,01	-0,11	0,0015
cg05617732	<i>TNFRSF21</i>	6	Corpo	0,68±0,27	0,83±0,02	-0,15	0,0100
cg16901727	<i>TNFRSF21</i>	6	Corpo	0,78±0,22	0,96±0,01	-0,18	0,0047
cg02988775	<i>TNFRSF25</i>	1	Corpo	0,69±0,16	0,81±0,03	-0,11	0,0034
cg02302587	<i>IL1F10</i>	2	TSS200;5'UTR	0,62±0,28	0,88±0,01	-0,25	0,0001
cg17664443	<i>IL1RAP</i>	3	5'UTR	0,67±0,21	0,92±0,02	-0,24	0,0036
cg13549904	<i>IL6R</i>	1	3'UTR	0,69±0,19	0,82±0,02	-0,14	0,0007
cg24729879	<i>IL6ST</i>	5	5'UTR	0,43±0,20	0,65±0,03	-0,22	0,0059
cg17067005	<i>IL10</i>	1	Corpo	0,74±0,15	0,90±0,01	-0,16	0,0061
cg23098661	<i>IL17D</i>	13	Corpo	0,76±0,22	0,91±0,01	-0,15	0,0002
cg12363898	<i>IL17RB</i>	3	Corpo	0,62±0,25	0,89±0,01	-0,27	0,0055
cg05440824	<i>CCL2</i>	17	TSS1500	0,57±0,31	0,88±0,02	-0,32	0,0080
cg08575688	<i>CCL20</i>	2	TSS200	0,46±0,16	0,65±0,05	-0,19	0,0027
cg18264219	<i>CCL23</i>	17	TSS1500	0,68±0,23	0,87±0,01	-0,20	0,0008
cg21743830	<i>CCL25</i>	19	1stExon	0,65±0,15	0,80±0,02	-0,14	0,0001
cg23298782	<i>CCL26</i>	7	3'UTR	0,72±0,19	0,93±0,01	-0,21	0,0044
cg26237003	<i>CCL28</i>	5	TSS1500	0,55±0,20	0,82±0,03	-0,26	0,0015
cg08128650	<i>RELA</i>	11	Corpo	0,67±0,20	0,78±0,02	-0,11	0,0030

cg01629940	<i>TRADD</i>	16	Corpo	0,65±0,16	0,81±0,03	-0,16	0,0003
cg15718940	<i>RIPK1</i>	6	3'UTR	0,71±0,28	0,91±0,01	-0,19	0,0011
cg12219838	<i>RIPK1</i>	6	Corpo	0,80±0,21	0,98±0,00	-0,18	0,0030
cg00564714	<i>RIPK2</i>	8	Corpo	0,61±0,24	0,90±0,03	-0,29	0,0026
cg18123581	<i>RIPK2</i>	8	Corpo	0,66±0,21	0,91±0,02	-0,25	0,0035
cg10318258	<i>RIPK3</i>	14	TSS1500	0,61±0,28	0,81±0,03	-0,20	0,0073
cg27175788	<i>RIPK3</i>	14	TSS1500	0,75±0,13	0,88±0,01	-0,14	0,0001
cg11044273	<i>RIPK4</i>	21	Corpo	0,62±0,21	0,85±0,02	-0,23	0,0051
cg07369988	<i>RIPK4</i>	21	Corpo	0,54±0,23	0,78±0,03	-0,23	0,0083
cg05341904	<i>RIPK4</i>	21	Corpo	0,74±0,28	0,93±0,00	-0,19	0,0002
cg22026368	<i>RIPK4</i>	21	Corpo	0,73±0,23	0,89±0,01	-0,15	0,0066
cg19572242	<i>IRAK1</i>	NA	TSS1500	0,35±0,12	0,46±0,03	-0,11	0,0002
cg09520212	<i>IRAK1</i>	NA	TSS1500	0,53±0,14	0,65±0,04	-0,12	0,0024
cg18716706	<i>IRAK2</i>	3	Corpo	0,77±0,22	0,94±0,00	-0,17	0,0006
cg19275895	<i>IRAK2</i>	3	Corpo	0,67±0,22	0,89±0,01	-0,21	0,0002
cg19553158	<i>IRAK2</i>	3	Corpo	0,72±0,28	0,90±0,01	-0,18	0,0001
cg03564661	<i>IRAK3</i>	12	3'UTR	0,57±0,27	0,88±0,03	-0,31	0,0038
cg27465569	<i>IRAK4</i>	12	5'UTR;TSS1500	0,69±0,22	0,81±0,02	-0,12	0,0009
cg08830139	<i>CD14</i>	5	TSS1500	0,42±0,15	0,59±0,05	-0,17	0,0003
cg24944079	<i>TRAF6</i>	11	3'UTR	0,65±0,24	0,90±0,02	-0,25	0,0074
cg11355225	<i>NFKBIB</i>	19	3'UTR; Corpo	0,64±0,24	0,90±0,02	-0,26	0,0049

cg12615753	<i>NFKB1</i>	4	Corpo	0,58±0,29	0,87±0,02	-0,29	0,0053
cg01983105	<i>NFKB1</i>	4	TSS1500	0,66±0,24	0,88±0,02	-0,22	0,0006

*CpGs com maiores níveis de metilação em mulheres com obesidade após intervenção*

<b>CpG</b>	<b>Gene</b>	<b>CHR</b>	<b>Região do gene</b>	<b>Níveis metilação após intervenção (<math>\beta</math>)</b>	<b>Níveis metilação Grupo Controle (<math>\beta</math>)</b>	<b><math>\Delta\beta</math></b>	<b>p valor</b>
cg20617093	<i>TNFSF9</i>	19	Corpo	0,24±0,17	0,07±0,02	0,17	0,0003
cg25324068	<i>TNFSF13;TNFSF12-TNFSF13</i>	17	5'UTR;1stExon;Corpo	0,56±0,23	0,32±0,04	0,24	0,0030
cg16117781	<i>TNFRSF9</i>	1	Corpo	0,35±0,28	0,06±0,03	0,29	0,0009
cg20820107	<i>TNFRSF8</i>	1	5'UTR; Corpo	0,23±0,17	0,12±0,02	0,10	0,0059
cg13462030	<i>TNFRSF10B</i>	8	TSS1500	0,13±0,13	0,03±0,00	0,10	0,0066
cg07720188	<i>TNFRSF19</i>	13	TSS1500	0,43±0,26	0,18±0,04	0,25	0,0059
cg13542817	<i>NFKB2</i>	10	1stExon;TSS1500;5'UTR	0,11±0,13	0,01±0,00	0,10	0,0034
cg20203089	<i>NFKB2</i>	10	5'UTR;1stExon	0,23±0,19	0,04±0,02	0,19	0,0084
cg26847029	<i>CHUK</i>	10	TSS200	0,28±0,23	0,07±0,02	0,21	0,0010
cg04760574	<i>CHUK</i>	10	TSS200	0,16±0,12	0,04±0,00	0,12	0,0024
cg07935264	<i>IL1B</i>	2	TSS200	0,23±0,16	0,13±0,03	0,11	0,0053
cg18773937	<i>IL1B</i>	2	TSS1500	0,24±0,11	0,13±0,03	0,11	0,0001
cg24346686	<i>IL6R</i>	1	TSS1500	0,22±0,15	0,10±0,02	0,11	0,0053
cg01770232	<i>IL6</i>	7	TSS1500	0,28±0,18	0,14±0,03	0,14	0,0090
cg09043153	<i>IL6ST</i>	5	TSS1500	0,24±0,21	0,06±0,00	0,19	0,0047

cg17506742	<i>IL10RB</i>	21	Corpo	0,15±0,17	0,05±0,00	0,10	0,0053
cg16296902	<i>CCL28</i>	5	Corpo	0,20±0,12	0,06±0,02	0,13	0,0063
cg11584277	<i>CCL23</i>	17	1stExon;5'UTR	0,35±0,18	0,17±0,03	0,18	0,0089
cg11250941	<i>SQSTM1</i>	5	5'UTR	0,16±0,26	0,03±0,01	0,13	0,0027
cg01457653	<i>TRADD</i>	16	TSS1500;5'UTR	0,21±0,28	0,04±0,00	0,17	0,0053
cg02314846	<i>ACAA1;MYD88</i>	3	1stExon; Corpo; 5'UTR;TSS1500	0,20±0,21	0,01±0,01	0,19	0,0005
cg08728825	<i>IRAK4</i>	12	1stExon;5'UTR;TSS1500	0,44±0,31	0,13±0,02	0,32	0,0008
cg02911637	<i>TRAF6</i>	11	5'UTR	0,26±0,19	0,06±0,03	0,20	0,0021
cg13542817	<i>NFKB2</i>	10	1stExon;TSS1500; 5'UTR	0,11±0,13	0,01±0,00	0,10	0,0034
cg15649774	<i>NFKBIL1</i>	6	TSS200;5'UTR;TSS1500	0,22±0,22	0,03±0,02	0,19	0,0030
cg10186215	<i>SIRT2;NFKBIB</i>	19	TSS200	0,18±0,13	0,07±0,01	0,11	0,0024
cg19098421	<i>TANK</i>	2	5'UTR	0,22±0,23	0,02±0,01	0,20	0,0002

Valores apresentados em média±desvio padrão; CHR: cromossomo;  $\beta$ : níveis de metilação, sendo que valores negativos indicam redução e valores positivos indicam aumento da metilação; 3'UTR: 3' região não traduzida; 5'UTR: 5' região não traduzida; TSS200: 200 pares de bases do local inicial de transcrição; TSS1500: 1500 pares de bases do local inicial de transcrição; 1stExon: primeiro éxon.

*Anexos*

## ANEXOS

## ANEXO 1 – Aprovação do Comitê de Ética do HCFMRP-USP.



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA  
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



Ofício nº 914/2018  
CEP/MGV

Ribeirão Preto, 05 de abril de 2018.

**Processo HCRP nº 1685/2018**

Prezadas Pesquisadoras,

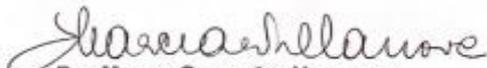
O trabalho intitulado "**MARCADORES EPIGENÉTICOS DA VIA INFLAMATÓRIA ANTES E APÓS INTERVENÇÃO DIETÉTICA HIPOCALÓRICA EM MULHERES COM OBESIDADE GRAU III**" – Projeto de Pesquisa Doutorado – Versão 2 – modificado em 15/03/2018, foi analisado "AD REFERENDUM" pelo Comitê de Ética em Pesquisa e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Biorrepositório denominado "Nutrição e genômica" e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e para Guarda de Material Biológico – Grupo Controle e Grupo Obesidade.**

*De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.*

*Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 466/2012 CNS/MS.*

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente,



**DRA MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA**  
COORDENADORA DO COMITÊ DE ÉTICA EM  
PESQUISA DO HCRP E DA FMRP-USP

Ilustríssimas Senhoras  
**CRISTIANA CORTES DE OLIVEIRA**  
**PROFA DRA CARLA BARBOSA NONINO (ORIENTADORA)**  
Depto. de Clínica Médica

---

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Campus Universitário – Monte Alegre  
14048-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP  
FWA-00002733, IRB-00002185 e Registro PR/CONEP nº 5440  
(16)3602-2225/cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br

**ANEXO 2** – Esquema alimentar padrão de 1200 kcal seguido pelas pacientes hospitalizadas do grupo intervenção.

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA  
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

[www.hcrp.fmrp.usp.br](http://www.hcrp.fmrp.usp.br)



**PLANO ALIMENTAR – 1200 KCAL**

PACIENTE: \_\_\_\_\_

<b>HORÁRIO</b>	<b>ALIMENTO</b>	<b>QUANTIDADE</b>
<b>Café da Manhã 08:00h</b>	Leite desnatado Café Pão francês Margarina	1 copo americano (150 ml) 1 xícara de café 1 unidade 1 colher de chá rasa
<b>Lanche 10:00h</b>	Fruta	1 unidade M ou 1 fatia M
<b>Almoço e Jantar 12:00h e 19:00h</b>	Salada de folha Arroz Feijão Legumes Carne magra Azeite de Oliva Fruta	1 prato de sobremesa 3 colheres de sopa 2 colheres de sopa 2 colheres de sopa 1 bife P (60 g) 1 colher de chá 1 unidade P ou 1 fatia fina
<b>Lanche 15:00</b>	Fruta Bolacha água e sal	1 unidade M ou 1 fatia M 3 unidades
<b>Ceia 21:00</b>	Leite desnatado Fruta	1 copo americano (150 ml) 1 unidade P ou 1 fatia fina

OBS: Não utilizar açúcar, apenas adoçante.

Para cada pessoa, a quantidade de óleo vegetal utilizada para preparar os alimentos não deve ultrapassar 2 colheres de sobremesa por dia OU 1/3 de frasco (300 ml) por mês.

DATA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_