

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Nutrição
Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos



Dissertação de Mestrado

Associações da atividade sérica da paraoxanase 1 com o polimorfismo PON1
T(-107)C e a ingestão de nutrientes

Fabíola Goettems dos Santos

Pelotas, março de 2015.

Fabíola Goettems dos Santos

Associações da atividade sérica da paraoxanase 1 com o polimorfismo PON1
T(-107)C e a ingestão de nutrientes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Nutrição e Alimentos da
Faculdade de Nutrição da
Universidade Federal de Pelotas, como requisito
parcial à obtenção do título de Mestre em
Nutrição e Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Augusto Schneider
Co-Orientador: Prof. Dra. Sandra Costa Valle
Prof. Dr. Carlos Castilhos de Barros

Pelotas, 2015

Fabíola Goettems dos Santos

Associações da atividade sérica da paraoxanase 1 com o polimorfismo PON1
T(-107)C e a ingestão de nutrientes

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Nutrição em Alimentos.

Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade Nutrição, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 31 de Março de 2015

Banca examinadora:

Prof. Dr. Augusto Schneider (Orientador).

Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas (2011)

Prof. Dra. Rejane Giacomelli Tavares.

Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica) pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (2005).

Prof. Dr. Paulo Cavalheiro Schenkel.

Doutor em Fisiologia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (2010)

“Dedico este trabalho à Bibiana e Antonio que
são a verdadeira
razão da conclusão dessa dissertação”

Agradecimentos

À minha família, pelo grande incentivo em todos os momentos da minha vida acadêmica.

À minha querida irmã agora Dra., Karinne Emanoela, pela inspiração e incentivo pela busca do conhecimento, pelo carinho infinito, ajuda e amor incondicional mesmo que a 800 km de distância.

À minha querida pequena Bibiana, minha amiga e parceira de todos os momentos que deu à minha vida o sentido do verdadeiro amor.

Ao meu pequeno Antonio que teve participação intensa ao meu lado nesses dois anos de mestrado desde a seleção como uma pequena sementinha até a sua conclusão e que agora é o sorriso do meu dia.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Augusto Schneider por todo ensinamento e paciência na elaboração desse trabalho.

À minha querida amiga Roberta Kulpa, pelos anos de amizade e pelo carinho nesses dois anos de dificuldades.

Às professoras da Escola Criança Amada, pelos cuidados e tamanho carinho com meus dois pequenos em todos os momentos de ausência para que este trabalho pudesse ser finalizado.

Obrigada.

Resumo

SANTOS, Fabíola Goettems. **Associações da atividade sérica da paraoxanase 1 com um polimorfismo e a ingestão de nutrientes em mulheres.** 2015. 40 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

A paraoxanase 1 (PON1) é uma enzima antioxidante ligada à lipoproteína de alta densidade (HDL) que protege as lipoproteínas e as membranas das células da peroxidação. A PON1 sérica é controlada principalmente por fatores genéticos mas estudos sugerem que fatores ambientais também podem modular a atividade da enzima. O objetivo desse estudo foi verificar a frequência dos polimorfismos da PON1 em mulheres relacionados ao consumo alimentar principalmente a ingestão de gorduras, ao perfil lipídico e antropométrico. Participaram do estudo 39 mulheres que responderam um questionário de frequência alimentar. As variáveis estudadas incluíram a atividade sérica da PON1, um polimorfismo na região promotora do gene C(-107)T, ingestão de calorias totais, lipídeos, vitaminas C e E, betacaroteno, idade, IMC, circunferência abdominal e o perfil lipídico. Os resultados obtidos nesse estudo demonstraram a frequência dos polimorfismos da PON1 com uma forte associação linear da presença do alelo favorável C e a atividade da enzima quando não considerado o consumo alimentar. Quando divididas com relação a ingestão de determinados nutrientes, foi possível observar que a presença do alelo favorável mostrou uma forte relação a atividade da enzima sérica apenas em mulheres com baixo consumo de calorias, baixa ingestão de lipídeos totais na dieta, colesterol e gordura saturada e retinol. Por outro lado mostrou uma relação contrária com o aumento da ingestão de ω -3, ao baixo consumo de ω -6 e vitamina C. Não houve associação do genótipo com o perfil lipídico. Pode-se concluir que a atividade enzimática da PON1 é fortemente modulada pela presença do alelo C, porém pode ser modulada também por determinados nutrientes, apresentando uma interação entre o genótipo individual e consumo de determinados nutrientes.

Palavras-chave: paraoxanase 1, perfil alimentar, perfil lipídico, polimorfismo

Abstract

SANTOS, Fabíola Goettems. **Associations of serum paraoxonase 1 activity with a polymorphism and nutrient intake in women.** 2015. 40 f. Dissertation (Master em Nutrição e Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

The paraoxonase 1 is an antioxidant enzyme bound to high-density lipoprotein (HDL) that protects lipoproteins and cell membranes from peroxidation. Serum PON1 is mainly regulated by genetic factors but studies suggest that environmental factors may also modulate enzyme activity. The aim of this study was to determine the frequency of PON1 polymorphisms in women and relate it to food consumption, mainly fat intake, to serum lipid profile and anthropometric measures. The study included 39 women who completed a food frequency questionnaire. The variables studied included serum PON1 activity, a polymorphism in the promoter region of the gene C (-107) T, intake of total calories, lipids, vitamins C and E, beta carotene, age, BMI, and lipid profile. The results of this study demonstrated the frequency of PON1 polymorphisms has a strong linear association between the presence of the favorable allele C and the enzyme activity when not considering individual feed intake. When divided by the intake of some nutrients, it was possible to observe that the presence of the favorable C allele had a strong relationship to enzyme activity, when women had low calorie intake, low intake of total lipids, cholesterol and saturated fat and retinol in the diet. On the other hand we observed the opposite effect in relation to the increased intake of ω -3 and to the low consumption of ω -6 and vitamin C. There was no association between genotype and lipid profile. In sum, it can be concluded that PON1 enzyme activity is strongly modulated by the presence of the C allele, however it can also be modulated by certain nutrients, since an interaction between an individual's genotype and consumption of certain nutrients was observed.

Key-word: paraoxonase 1, food profile, lipid profile, polymorphism

Lista de abreviaturas

CA	Circunferência abdominal
CT	Colesterol total
DNA	Ácido desoxirribonucleico
GLM	General Linear Models
HDL	High density lipoprotein
IMC	Índice de massa corporal
Kg	Kilograma
LDL	Low density lipoprotein
OMS	Organização Mundial da Saúde
PON1	Paraoxonase 1
PON2	Paraoxonase 2
PON3	Paraoxonase 3
QFA	Questionário de Frequência Alimentar
ERO	Espécies reativas de oxigênio
SNP	Single nucleotide polymorphism
TAG	Triacilglicerol ou triglicerídeos
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
UFPEL	Universidade Federal de Pelotas
VCT	Valor calórico total
ω -3	ômega-3
ω -6	ômega-6

Lista de Tabelas

Tabela 1	Características da amostra relacionadas à idade, perfil lipídico antropométrico e ingestão alimentar20
Tabela 2	Associação da frequência dos polimorfismos da PON1 com fatores nutricionais24

Sumário

1 Introdução	11
1.1 Objetivo Geral	14
1.2 Objetivos Específicos	14
2 Materiais e Métodos	15
2.1 Delineamento da População	15
2.2 Consumo alimentar e medidas antropométricas	15
2.3 Coletas de sangue e análises bioquímicas	16
2.4 Atividade da PON1	16
2.5 Extração de DNA e análise do SNP PON1 T(-107)C	17
2.6 Análise estatística	18
3 Resultados e discussão	19
4 Conclusão	25
Referências	26
Anexo A	32
Anexo B	34

1 Introdução

A Paraoxanase 1 (PON1) é uma enzima associada a lipoproteína de alta densidade (HDL) que é sintetizada no fígado. Ela tem função antioxidante capaz de hidrolisar os peróxidos lipídicos catalisando a ruptura dos fosfolípídeos oxidados em lipoproteína de baixa densidade (LDL) (FORTI; DIAMENT, 2006). Ela desempenha um papel importante no metabolismo de lipídeos protegendo contra o desenvolvimento da aterosclerose (MOHAMMADI; HAFRAF, 2012, COSTA et al, 2005). A PON1 localiza-se em uma subfração do HDL que contém as apolipoproteínas apo-I e apo-J. A apo-I tem a função de estabilizar a estrutura da PON1 (KOTA et al. 2013) além disso, a enzima também pode estar ligada à outras apoproteínas como apoA-II e apoE (FORTI; DIAMENT, 2006).

A concentração sérica de PON1 pode ser afetada pela idade do indivíduo, provavelmente pelo aumento do estresse oxidativo associado ao envelhecimento celular (COSTA et al, 2005). Os recém-nascidos já apresentam atividade enzimática da PON1 sendo que a partir do primeiro ano de vida essas concentrações são semelhantes ao de adultos (FERRI, 2009; COSTA, et al. 2003). Parece não haver diferença entre os sexos, mas os níveis de atividade da PON1 podem variar entre pessoas de diferentes etnias, sendo diminuído em algumas patologias (FERRI, 2009). Alguns autores relacionam a baixa atividade da PON1 com aumento no processo de aterosclerose e conseqüentemente de doença cardiovascular (SUEHIRO et al. 2000), diabetes *mellitus*, hipercolesterolemia, falência renal crônica e obesidade. (KOTA et al, 2013; DATOINE; DEBORD; CHARMES, 1998)

Existem mais de 160 polimorfismos descritos no gene da PON1 (MASELLI, 2007). Os mais referenciados são os dois polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP, do inglês *single nucleotide polymorphism*) comuns na região codificante do gene, que correspondem a uma troca de uma Glutamina por uma Arginina na posição 192 (Q192R) (HUMBERT et al, 1993) e outro que corresponde a troca de uma Leucina por uma Metionina na posição 55 (L55M) (BLATER et al. 1997). Ambos foram relacionados com níveis séricos de

atividade da PON1 e relacionados com a propensão a desenvolver doença cardiovascular (BROPHY et al. 2001; CAMPO et al, 2004). Também pode-se relatar o SNP na região do promotor do gene da PON1, conhecido como T(-107)C (rs705379), que parece promover um efeito na expressão do gene e também na atividade sérica enzimática (SUEHIRO et al. 2000). O genótipo (-107)CC está associado a maiores níveis de atividade da enzima e pode estar relacionado a uma diminuição do risco de doença cardiovascular em pessoas mais jovens, o que poderia afetar de maneira mais saudável o processo de envelhecimento, afastando a probabilidade de aparecimento de patologias no sistema cardiovascular (CAMPO et al, 2004).

O envelhecimento tem sido associado com o aumento dos níveis endógenos de espécies reativas de oxigênio (ERO) e diminuição das defesas antioxidantes. Esta situação pode levar a danos oxidativos nas membranas celulares, inativação enzimática, oxidação de proteínas e danos no DNA. (DEAN, et al. 1993; HEADLAM; DAVIS, 2004; ORRENIUS, et al. 2007). Desta maneira, as pessoas que apresentam o genótipo CC podem apresentar algum fator de proteção diferente do genótipo TT relacionado ao estresse oxidativo ao envelhecerem (CAMPO et al, 2004). Assim, a relação com o nível de atividade da PON1 ou a presença de um de seus polimorfismos favoráveis como genótipo (-107)CC favoreceria na proteção contra o estresse oxidativo, principalmente com o avançar da idade.

Inúmeros fatores ambientais, incluindo a dieta, tem sido associados com a modulação da atividade da PON1 (SCHRADER; RIMBACH, 2011; COSTA et al. 2011; KIM, 2013). O consumo de ácidos graxos, colesterol, álcool e vitaminas correspondem a aproximadamente 9% de um total de fatores capazes de modular a atividade da PON1. Os demais fatores estão relacionados a diferença de idade, sexo, tabagismo e fatores genéticos. Porém, existem variações não explicadas totalmente que correspondem a aproximadamente 63% (KIM et al, 2013). O tabagismo tem sido apresentado como um fator importante na diminuição da atividade da PON1 (LEVIEV e JAMES, 2000) e a ingestão moderada de álcool (com uma média de 40g/dia) foi associada com o aumento da atividade da enzima (VAN DER GAAG et al.

1999; SIERSKMA et al. 2002). Entretanto, o consumo de mais de 80g/dia de álcool teria um efeito contrário (RAO et al.2003; MARSILLACH et al.2007).

Em estudo realizado em 2003, Ferré et al. não encontraram associação da atividade da PON1 com a ingestão diária de lipídeos, ácidos graxos saturados, β -carotenos, vitaminas C (ácido acórbico) e E (α -tocoferol). Porém, estudos mais recentes de Kim et al. (2012, 2013) encontraram uma associação positiva entre a ingestão de colesterol e ácidos graxos com a atividade da PON1. Ghaffari et al. (2011) investigaram a suplementação de vitamina E e selênio e Begcevic et al. (2013) que suplementaram vitamina C e Zinco encontraram uma associação positiva da PON1 com a ingestão desses nutrientes em humanos.

Quanto à ingestão de lipídeos, Mohammadi e Rafráf (2012) encontraram uma associação positiva da suplementação de ômega-3 (ω -3) e a atividade da PON1 em mulheres com Síndrome dos Ovários Policísticos. Kim et al.(2012, 2013) também encontraram uma associação positiva em relação a atividade enzimática da PON1 com a ingestão de colesterol e ácidos graxos saturados. Esse resultado parece contraditório pelo fato da PON1 ser considerada uma enzima que previne a oxidação das lipoproteínas, e pelo fato do colesterol e da gordura saturada serem associados à presença de aterosclerose (KOTA et al. 2013). Isto indica que apesar de existirem estudos relacionando a ingestão de nutrientes com a atividade da PON1 ainda existem controvérsias quanto as associações encontradas. Isto pode ser devido a existência de polimorfismos, que interagem de diferentes maneiras de acordo com a dieta ingerida. Assim, é possível que esta interação gene-nutriente possa ajudar a elucidar a relação entre ingestão de nutrientes e atividade sérica da PON1.

1.1 Objetivo Geral

Desta maneira, a fim de poder elucidar esses questionamentos, o objetivo desse estudo foi relacionar o nível de atividade da PON1 e a frequência de seus polimorfismos em mulheres saudáveis e associá-los com perfil lipídico e ingestão de gorduras provenientes da dieta. Assim, a associação de todas essas variáveis, permitirá melhor entender o processo de modulação da PON1 pelos seus polimorfismos e pela alimentação.

1.2 Objetivos Específicos

Caracterizar a população estudada no que diz respeito a:

- a) estado nutricional;
- b) ingestão de colesterol, gorduras saturadas e poliinsaturadas;
- c) atividade arilesterase da PON1;
- d) frequência do polimorfismo genético da PON1 na região -107;
- e) perfil lipídico (HDL, LDL, Triglicerídeos (TAG) e colesterol total (CT));
- f) interação entre os fatores acima citados;

2 Materiais e Métodos

2.1 Delineamento e População

Foi realizado um estudo com delineamento transversal, com 39 pacientes com idade acima de 18 anos, atendidas no ambulatório de Ginecologia da Faculdade de Medicina da UFPEL, no período de maio a novembro de 2014. Foram incluídas no estudo mulheres saudáveis, independente do estado nutricional, que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE- Anexo A).

Foram excluídas do estudo mulheres menores de 18 anos, que fizessem uso de algum medicamento que comprometesse a função vascular e o eixo hipotalâmico-pituitário-gonadal e gestantes (SOYMAN et al, 2011).

No total, 76 mulheres assinaram o termo de consentimento para participarem da pesquisa submetendo-se a responder o questionário de frequência alimentar, fazer a coleta dos dados antropométricos e coleta de saliva. Esses dados foram coletados no momento da entrevista e as pacientes foram encaminhadas posteriormente a realização do exame laboratorial sanguíneo. No entanto, apenas 39 pacientes realizaram o exame sanguíneo sendo incluídas na realização da pesquisa.

2.2 Consumo alimentar e medidas antropométricas

Para análise da ingestão das gorduras totais da dieta foi utilizado um questionário de frequência de consumo alimentar (QFA) (RIBEIRO; CARDOSO, 2002). As medidas antropométricas foram feitas através da mensuração do peso (Kg), altura (m), Índice de Massa Corporal (IMC) e medida da circunferência abdominal (CA) (cm) (WHO, 1995).

O IMC foi verificado mediante a tomada das medidas de peso e altura, aplicação de Quetelét ($IMC = \text{Peso} / \text{altura}^2$) e interpretado conforme a Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 1995). A circunferência abdominal foi obtida para a determinação da obesidade central e aferida

através da medida de aproximadamente dois centímetros acima da cicatriz umbilical, na menor curvatura localizada entre as costelas e a crista ilíaca (WHO, 1995).

2.3 Coletas de sangue e análises bioquímicas

A coleta de sangue foi realizada em um momento posterior a entrevista, onde as participantes foram encaminhadas para o Laboratório de Análises Clínicas Novara localizado na cidade de Pelotas. Foram coletados cerca de 5 mL de sangue por punção venosa, de cada paciente, após jejum de 12 horas, em frascos secos para as taxas bioquímicas. As amostras de sangue foram processadas e o soro imediatamente analisado em equipamento automático. O colesterol total (CT), o HDL e o LDL foram determinados por método colorimétrico enzimático, seguindo as instruções do fabricante. A análise do perfil lipídico seguiu os valores de referência propostos pela Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC, 2013). Parte do soro foi enviado ao laboratório da Faculdade de Nutrição para análise da atividade de PON1 conforme descrito abaixo. Também foi coletado um frasco de sangue total com EDTA para posterior extração de DNA.

2.4 Atividade da PON1

A atividade da PON1 foi mensurada através da medida arilesterase que tem mostrado precisão na representação da atividade da PON1 com baixa contribuição da PON2 e PON3. A atividade arilesterase foi medida a partir da velocidade de formação de fenol através da monitorização do aumento da absorbância na faixa de 270 nm a 25°C. O reagente de trabalho consistiu em Tris/HCl 20mM, pH 8,0, contendo 1 mM de CaCl_2 e 4mM de fenilacetato como substrato. As amostras diluídas 1:3 em tampão Tris/HCl foram adicionadas a solução de trabalho e a mudança na absorbância foi registrada durante 60 seg. Uma unidade de atividade PON1 arilesterase foi considerada igual a 1 mM de fenol formado por minuto. A atividade foi expressa em kU/L, com base no

coeficiente de extinção de fenol. As amostras brancas contendo água foram usadas para corrigir a hidrólise não enzimática (BROWNE, 2007).

2.5 Extração de DNA e análise do SNP PON1T(-107)C

Para extração de DNA genômico, foram usadas as amostras de sangue total. Primeiro as amostras passaram por um processo de sucessivas lavagens para remoção das hemácias. Após, as células foram colocadas em uma solução de lise celular e proteinase K (20mg/ml) incubado a 55°C durante 30 minutos. Após, foram resfriadas até a temperatura ambiente colocando-a em gelo durante 1 minuto e incubada a 95°C por 10 minutos em banho-maria. Foi adicionado solução de precipitação de proteína às células lisadas e colocadas no vortex durante 15 minutos em alta velocidade e foram incubadas no gelo por 5 minutos, centrifugadas em 16000 rpm por 3 minutos. Após, foi adicionado Isopropanol e então etanol 70% e invertendo várias vezes para lavar o *pellet* de DNA e centrifugar em 16000 rpm por 1 minuto. Foi descartado o sobrenadante, escoando o tubo em um pedaço limpo de papel absorvente, tendo o cuidado para que o *pellet* permanecesse no tubo. O DNA foi deixado para secar em temperatura ambiente por 10 a 15 minutos e depois colocado no banho seco. Foi adicionado 30 µl de solução de hidratação do DNA no tubo contendo o *pellet*. Por último, foi incubado a 55°C por 15 minutos para dissolver o DNA em banho seco.

A determinação do polimorfismo foi obtida por reação em cadeia de polimerase (PCR), seguido por digestão com enzima de restrição. A amplificação da região promotora do gene da PON1 onde está localizado o polimorfismo T(-107)C foi feita com o uso dos *primers*: *forward*AGCTAGCTGCGGACCCGGCGGGGAGGAG e *reverse*GGCTGCAGCCCTCACCACAACCC. Foram utilizadas as condições padrão para realização da PCR, com temperatura de anelamento de 67°C. A letra minúscula no *primerforward* indica um erro de pareamento que introduz um sítio de restrição para a enzima *BsrBI* (New England BioLabs, Cambridge,

UK), pois não há sítio de restrição específico cortando a sequência original do DNA. Após a digestão durante 2 horas a 37° C, o alelo C foi identificado pelos fragmentos de 28 e 212pb, enquanto o alelo T resultou no fragmento 240pb não digerido. Os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose de 3%, corados com SYBR Safe (Applied Biosystems).

2.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no software SAS 9.2 utilizando o procedimento GLM. Foi realizada uma análise linear e quadrática da presença de 0, 1 ou 2 alelos favoráveis C com relação ao nível de atividade da PON1 e demais variáveis sanguíneas analisadas. Além disso, para o consumo alimentar a mediana de cada nutriente foi calculada e os indivíduos foram divididos em acima e abaixo da mediana onde a mesma análise acima descrita foi aplicada. Também foi realizado o teste de t para comparar a diferenças entre os níveis de ingestão dentro de cada genótipo. Desta maneira pode ser observada a interação entre o consumo de nutrientes sobre o efeito do genótipo da atividade da PON1 sérica.

3 Resultados e Discussão

Os resultados das determinações laboratoriais do perfil lipídico, glicêmico e antropométrico das participantes estão apresentados na tabela 1. No geral, a média dos níveis de colesterol total e LDL está acima dos limites recomendados segundo a Primeira Diretriz da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre o Consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular (SBC, 2013). A média do IMC foi de 26,8 Kg/m² o que indica um valor classificado como sobrepeso (WHO, 1995). A média da ingestão calórica diária reportada foi de 2.104,6 Kcal/dia, sendo considerado um valor suficiente para a maioria da população (EFSA, 2010), o que pode demonstrar um sub-relato e subestimação das participantes em relação ao consumo de lipídeos. Apesar da ingestão de lipídeos ter sido considerada abaixo da média, houve uma considerável expressão no consumo de ácidos graxos saturados demonstrando talvez uma despreocupação com o consumo de gorduras. Entretanto, as evidências do nosso estudo não pretendem sugerir recomendações dietéticas que possam beneficiar a atividade da PON1.

O percentual de ingestão de lipídeos na dieta reportado foi de 23,7%, o que pode ser considerado um valor baixo (EFSA, 2010). Os níveis de HDL, triglicerídeos (SBC, 2013) e glicose (ADA, 2005) apresentaram média dentro dos limites aceitáveis. A média da ingestão do total de calorias consumidas, percentual de lipídeos, colesterol, ácidos graxos saturados, monossaturados, poliinsaturados, ω -3, ω -6, ω -6: ω -3, vitamina C e retinol estão descritos na tabela 1.

Tabela 1. Características da amostra relacionadas à idade, perfil lipídico, antropométrico e ingestão alimentar.

Parâmetro	Média
n=39	
Idade (anos)	41,2 ± 2,4
HDL-c (mg/dL)	57,7 ± 2,3
LDL-c (mg/dL)	129,4±5,5
CT (mg/dL)	212,8±6,4
TAG (mg/dL)	143,3±11,2
GLI (mg/dL)	88,9±2,5
IMC (kg/m ²)	26,8±0,7
CA (cm)	93,4±1,8
Análise de nutrientes	
VCT (kcal/d)	2104,6±90,6
LIP (%)	23,7±0,8
Retinol (UI/d)	1127,2±291,4
Vit C (mg/d)	185,4±23,3
Colesterol (mg/d)	268,6±14,8
AGM (%)	25,5±0,7
AGP (%)	20,4±0,7
AGS (%)	38,5±0,6
ω-3 (mg/d)	0,7±0,0
ω-6 (mg/d)	10,6±0,9
ω6:ω3	16,1±0,6

HDL-c= highdensitylipoproteincholesterol; LDL-c= lowdensitylipoproteincholesterol; CT= colesterol total; TAG=triglicerídeos; GLI= glicose; IMC= índice de massa corporal; CA= circunferência abdominal; VCT= valor calórico total; LIP=lipídeos; VIT C= vitamina C; AGM= ácidos graxos monoinsaturados; AGP= ácidos graxos poliinsaturados; AGS= ácidos graxos saturados;ω-3= ômega 3; ω-6= ômega 6.

Em relação ao consumo de colesterol, nosso estudo observou que apesar de ser observado um efeito positivo da presença do alelo C nas mulheres que ingerem baixa quantidade de colesterol ($P<0.05$), este efeito é inexistente nas mulheres que ingerem maior quantidade de colesterol (Tabela 2, $P>0.05$). Kudchodkar et al. (2000) também observaram em um estudo com ratos que a ingestão de colesterol reduz a atividade da PON1. Em contrapartida, um estudo realizado por Kim et al (2012) relatou um aumento da atividade da PON1 com o aumento da ingestão de colesterol em humanos. Lixandru et al. (2010) não observou em seu estudo uma relação direta entre a atividade da PON1 e consumo de colesterol. Assim sendo, fica claro que a genética individual pode ser a fonte de controvérsias neste estudo e portanto

mais investigações neste sentido são necessárias para melhor esclarecer este mecanismo.

Foi observado que em mulheres com baixo consumo calórico total existe uma associação positiva da presença do alelo C com a atividade da PON1 (Tabela 2, $P < 0.05$). Porém, quando o consumo de calorias foi alto, não foi observada associação significativa entre a presença do alelo favorável e a atividade de PON1 (Tabela 2, $P > 0.05$). Não foram encontradas indicações da literatura sobre a associação entre consumo calórico total e atividade da PON1, porém é possível que esta relação esteja associada ao consumo total de gorduras na dieta que apresentam sim um efeito sobre a atividade da PON1 (KIM et al, 2013). Neste sentido, foi observado um consumo relativamente baixo de lipídeos na dieta, aproximadamente 23% do total de consumo de calorias diárias, sendo que o ideal seria entre 20-30%. Dentro desse contexto percebe-se que talvez a qualidade dos lipídeos ingeridos não seja adequada, pois os valores do consumo dos ácidos graxos saturados estão acima do recomendado. O percentual do consumo de ácidos graxos saturados foi de 17,6% do VCT, o que é considerado muito acima do recomendado que seria de até 10% (SBC, 2013). Já os percentuais de ingestão de ácidos graxos monoinsaturados foram de 8,4% quando o ideal seria de aproximadamente 15%. A ingestão de ácidos graxos poliinsaturados foi de 8,5% considerada adequada para a população sendo que a orientação seria entre 5-10% da energia total ingerida (SBC, 2013).

Em mulheres com alta ingestão de ácidos graxos saturados não foi observada associação da atividade da PON1 com a presença do alelo C (Tabela 2, $P > 0.05$). No entanto, em mulheres que ingeriram baixa quantidade de ácidos graxos saturados foi observada a esperada associação positiva entre a presença do alelo C e a atividade da PON1 (Tabela 2, $P > 0.05$). Entretanto, quando analisamos o consumo de ω -3 e ω -6 separadamente, o menor consumo de ω -3 e maior de ω -6 apresentou um efeito positivo em relação a atividade da PON1 e presença do alelo C (Tabela 2, $P < 0.05$). Já o baixo consumo de poli e monoinsaturados, e o alto consumo de ω -6 e baixo consumo de ω -3 resultaram na perda da associação entre o alelo C e a atividade da

PON1 (Tabela 2, $P > 0.05$). Esses resultados são contrários ao estudo de KIM et al. (2013) que encontrou uma associação positiva entre o consumo de gordura saturada e atividade de PON1 e de Calabresi et al. (2004), Mohammadi e Rafrat (2012) e Burillo et al. (2012) que observaram um aumento da atividade da enzima após a suplementação de ω -3. Deve ser levado em consideração que o consumo de ω -3 apresentou uma média de 0,4g/dia, estando bem abaixo do recomendado, que seria de 2-4g/dia (SBC, 2013). Como o consumo de ω -3 estava abaixo do ideal, os parâmetros da razão ω -6: ω -3 também ficam comprometidos, sendo aproximadamente 16:1. O aumento dessa razão pode ser consequência das alterações no padrão alimentar da população nos últimos anos onde há um aumento no consumo de cereais, óleos e grãos ricos em ω -6 e um baixo consumo de alimentos ricos em ω -3 (SBC, 2013). Atualmente, essa razão está entre 15:1 e 40:1 na dieta ocidental, o que compromete a promoção à saúde da população (SBC, 2013). A alteração acentuada nas proporções ω 6: ω 3 pode ser a razão destes resultados aparentemente contraditórios quando comparado a populações com maior ingestão de ω -3, ou mesmo em trabalhos experimentais com suplementação de ω -3. É interessante notar que houve um efeito divergente entre os genótipos, sendo que a alta proporção ω 6: ω 3 foi benéfica aumentando a atividade da PON1 para indivíduos do genótipo CC, enquanto que reduziu a atividade da PON1 em indivíduos TT.

Em mulheres com baixa ingestão de vitamina C foi observada uma forte associação positiva entre a presença do alelo C com a atividade enzimática (Tabela 2, $P < 0.05$), que não foi observada em mulheres com uma alta ingestão de vitamina C (Tabela 2, $P > 0.05$). Esses resultados são semelhantes a estudos publicados em 2001 por Kleemola (2002) demonstrando que altas quantidades de vegetais ingeridos na dieta, ricos em vitamina C e E reduziram a atividade sérica da PON1. Ferré et al. (2003) também não encontraram associação entre suplementação de vitamina C, E e betacaroteno na atividade da enzima. Em contra-partida, estudos publicados por Jarvick et al. (2002) que suplementaram vitamina C e E mostraram uma redução da oxidação da molécula de HDL que poderia estar atribuída ao aumento da atividade da PON1. Begcevic et al. (2013) também realizaram estudos com a

suplementação de vitamina C e Zinco revelando aumento da atividade enzimática. Dessa mesma maneira, Ghaffari et al. (2011) encontraram associação positiva ao investigar a atividade da PON1 com a suplementação de vitamina E e selênio. Pode-se concluir com isso, que o papel dos antioxidantes na dieta como moduladores da atividade da PON1 ainda necessita de mais estudos que esclareçam o efeito dessas substâncias diretamente na função enzimática da PON1 (JARVIK et al. 2002). A atividade da PON1 foi associada à presença do alelo C nas mulheres que ingeriram tanto alto quanto baixos níveis de zinco e retinol na dieta (Tabela 2, $P < 0.05$). Indicando, portanto, que estes dois nutrientes não apresentam uma interação positiva com o polimorfismo na posição -107 do gene da PON1.

Embora inúmeros estudos indiquem uma correlação positiva da atividade sérica da PON1 com o HDL (MACKNESS et al, 1996; FERRÉ et al, 2003) e negativa com o LDL, TAG e glicose plasmática (ABBOTT et al, 1995; IKEDA et al, 1998), nossos achados indicam que não há associação entre essas variáveis com os genótipos CC, TC e TT. Esses resultados conferem com um estudo realizado por Phuntuwate et al. (2005) indicando que nenhum dos polimorfismos da PON1 apresentados demonstrou efeito significativo no perfil lipídico das participantes. Os resultados indicam que a modulação do genótipo na atividade da PON1 é direta e não mediada por outras alterações do perfil lipídico que podem sim estar associadas aos nutrientes ingeridos.

A média da atividade enzimática da PON1 foi de 98,4kU/L entre os diferentes genótipos. Foi possível observar ainda que a atividade sérica da PON1 difere entre as participantes que apresentam o mesmo genótipo. Isto indica que não apenas a atividade sérica da PON1 seja influenciada pelo polimorfismo da enzima mas também por outros fatores como estilo de vida e dieta como reportado anteriormente (TOMAS et al. 2001; SUTHERLAND et al. 1999). A frequência dos genótipos para o polimorfismo C(-107)T da PON1 encontrada na população estudada foi de 28,02% para o genótipo TT, 41,02% para o CT e de 30,76% para o CC (Tabela 2).

Nosso estudo apresentou pela primeira vez a distribuição destes genótipos em uma população de mulheres na região sul do país. Essa distribuição foi similar a estudos já reportados em outras populações como nos europeus (JAMES et al, 2000; LEVIEV e JAMES, 2000; CAMPOS et al, 2004) e asiáticos (SUEHIRO et al, 2000), apesar de nestes estudos a frequência para o genótipo CT ter sido um pouco maior da reportada no presente estudo. Em populações afro-descendentes no Brasil o alelo C é mais freqüente e também é responsável pelos níveis mais elevados da PON1 (SANTOS, 2005). Assim como demonstrado por Campos et al. em 2004 em nosso estudo foi observado uma forte associação linear da presença do alelo favorável C com a atividade sérica da PON1 ($P < 0.0001$), sendo as médias de $118,1 \pm 5,8$ kU/L para o genótipo CC, $94,8 \pm 5,1$ kU/L para o CT e $82,0 \pm 6,1$ kU/L para o genótipo TT. Estes dados mais uma vez validam a forte influência do polimorfismo T(-107)C sobre a atividade da PON1 independente da população étnica analisada e perfil de consumo alimentar local (Tabela 2).

Tabela 2. Associação da frequência dos polimorfismos da PON1 com fatores nutricionais.

Parâmetro	Categoria	Genótipo atividade da PON1 (kU/L)			P*
		CC	CT	TT	
	Geral	118,1±5,8	94,8±5,1	82,0±6,1	< 0,0001
VCT	< 2000 Kcal	125,3±6,3	98,4±6,3	76,9±7,5	0,0001
	> 2000 Kcal	108,1±10,3	92,0±7,7	86,4±9,4	0,13
Colesterol	< 249 mg	124,9±6,6	98,6±6,6	76,1±7,8	0,0002
	> 249 mg	108,6±10,0	91,83±7,5	86,9±9,1	0,12
Lipídeos	<25%	120,5±5	90,8±4,5	76,9±7,3	< 0,0001
	> 25%	113,3±13,0	99,2±9,2	83,9±9,2	0,08
Saturados	< 40%	138,1±8,0a	95,4±5,6	73,1±6,0	< 0,0001
	> 40%	108,13±7,0b	94,23±7,0	97,6±9,1	0,40
Monoinsaturados	< 25%	112,5±8,5	99,0±7,9	88,7±8,5	0,06
	> 25%	123,8±8,0	91,5±6,5	74,0±8,8	0,0006
Poliinsaturados	< 20%	116,2±8,2	93,6±12,3	87,4±9,3	0,03
	> 20%	123,8±8,8	95,2±4,4	72,5±7,7	0,0005
ω-3	< 0,7 g/d	128,6±5,9a	95,7±5,5	72,8±7,7	< 0,0001
	> 0,7 g/d	103,4±10b	93,3±7,9	87,3±8,4	0,23
ω-6	< 9,2 g/d	120,1±8,6	95,4±9,2	93,3±12,2	0,09
	> 9,2 g/d	114,2±7,9	94,3±5,3	75,6±6,0	0,0012

ω 6: ω 3	< 15:1	105,2 \pm 8,3a	93,4 \pm 6,4	97,5 \pm 10,1a	0,56
	> 15:1	131,01 \pm 6,6b	97,1 \pm 6,6	73,2 \pm 6,0b	< 0,0001
Vit C	< 125 mg/d	138,2 \pm 8,8	100,1 \pm 5,4	76,8 \pm 5,4	< 0,0001
	> 125 mg/d	111,4 \pm 7,2	89,5 \pm 7,7	96,1 \pm 12,6	0,30
Retinol	< 500 UI/d	122,2 \pm 8,8	101,4 \pm 10,1	85,8 \pm 11,1	0,02
	> 500 UI/d	109,2 \pm 7,5	90,8 \pm 4,8	78,9 \pm 6,1	0,0055

VCT= Valor calórico total; ω -3= ômega 3; ω -6= ômega 6; Vit C= vitamina C; Zn= zinco.

A,b Letras diferentes indicam diferença entre alto e baixo consumo de um nutriente dentro do mesmo genótipo

4 Conclusão

Foi possível concluir que o genótipo encontrado nem sempre será fator decisivo para a presença de determinadas patologias e que a dieta está intimamente relacionada com a modulação da atividade enzimática da PON1 como o consumo excessivo de ácidos graxos saturados e colesterol. Foi demonstrado também que o polimorfismo T(-107)C exerce uma forte influência sobre a atividade sérica da PON1.

Desta maneira, ficou claro que a presença do alelo favorável C da PON1 na população feminina pode ser fortemente favorável se o estilo de vida também se mantiver saudável, com baixa ingestão de calorias e baixo consumo de gorduras saturadas. Do contrário, a genética não será suficiente a tal ponto de influenciar na presença de determinadas patologias.

Referências

ABBOTT, C. A. et al. Serum paraoxonase activity, concentration, and phenotype distribution in diabetes mellitus and its relationship to serum lipids and lipoproteins. *Atherosclerosis, Trombosis and vascular Biology*.15:1812-8, 1995.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care* 28:suplemento 1, janeiro, 2005.

BEGCEVIC, I. et al. Can cranberry extract and vitamin C+Zn supplements affects the in vivo activity of paraoxanase 1, antioxidant potential and lipid satatus? *Clin. Lab*. 59(9-10):1053-60,2013.

BLATTER, M. C. et al. Paraoxonase polymorphism Met-Leu54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme: a possible link between the paraoxonase gene and increased risk of cardiovascular disease in diabetes. *Journal of Clinical Investigation*. 99: 62–66, 1997.

BROWNE, R. W. Accuracy and Biological Variation of Human Serum Paraoxonase1 Activity and Polymorfism (Q192R) by Kinetic Enzyme Assay. *Clinical Chemistry*.53:2; 310-317, 2007.

BROPHY, V. et al. Polymorphisms in the human paraoxonase (PON1) promoter. *Pharmacogenetics*. 11:77-84, 2001.

BURILLO, E. et al. Beneficial effects of omega-3 fatty acids in the proteome of high-density lipoprotein proteome. *Lipids and Health Disease*. 11:116, 2012.

CALABRESI, L. et al. Na Omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrate increase plasma high-density lipoprotein 2 cholesterol and paraoxanase levels in patients with familial combined hiperlipidemia. *Metabolism*. 53(2):153-8,2004.

CAMPO, S. et al. Association between serum paraoxonase (PON1) gene promoter T(-107)C polymorphism, PON1 activity and HDL levels in healthy Sicilian octogenarians. *Experimental Gerontology*. 39 1089-1094, 2004.

COSTA, L. G. et al. Functional Genomics of the paraoxonase 1 (PON1) Polymorphisms: Effects on pesticide sensitivity, cardiovascular disease and drug metabolism. *Annual Review of Medicine*. 54:371-392, 2003.

COSTA, L. G. et al. Modulation of paraoxonase (PON1) activity. *Biochemical Pharmacology*. 69:541–550, 2005.

COSTA, L. G. et al. Pharmacological and dietary modulators of paraoxonase 1 (PON1) activity and expression: the hunt goes on. *Biochemical Pharmacology*. 81:337-334, 2011.

DATOINE, T.F.; DEBORD, J.; CHARMES, J.P. Decrease of serum paraoxonase activity in chronic renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology*. 9:2082-2088, 1998.

DEAN, R. T. et al. Reactive species and their accumulation on radical-damaged proteins. *Trends Biochemical Science*. 18:437-441, 1993.

ECKERSON, H. W. et al. The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *American Journal of Human Genetics*. 35:1126-1138, 1983.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Opinion on principles for deriving and applying Dietary Reference Values. *EFSA Journal*. 8(3):1458, 2010.

FERRÉ, N. et al. Regulation of serum paraoxonase activity by genetic, nutritional and lifestyle factors in the general population. *Clinical Chemistry*. 49:1491-7, 2003.

FERRI, L. A. F. Polimorfismos no gene paraoxonase 1 como preditores de efeitos cardiovasculares em pacientes com doença coronária estável. 2009. 164f. Tese de Doutorado -Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

FORTI, Neusa; DIAMENT, Jayme. Lipoproteínas de alta densidade: aspectos metabólicos, clínicos, epidemiológicos e de intervenção terapêutica. Atualização para os clínicos. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v.87, n.5, p.671-79, 2006.

GHAFFARI, T. et al. Effect of vitamin E and selenium supplement on paraoxonase-1 activity, oxidized low density lipoprotein and antioxidant defense in diabetic rats. *Bio Impacts*. 1(2), 121-128, 2011.

HUMBERT, R. et al. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nature Genetics*. 3:73–76, 1993.

HEADLAM, H. A.; DAVIS, M. J. Markers of protein oxidation: different oxidants give rise to variable yields of bounds and release carbonyl products. *Free Radical Biology and Medicine*. 36:1175-1184, 2004.

IKEDA, Y. et al. Serum paraoxonase activity and its relationship to diabetes complication in patients with non-insulin dependent mellitus. *Metabolism*. 47:598-602, 1998.

JAMES, R.W. et al. Promoter Polymorphism T(-107)C of the paraoxanase PON1 gene is a risk factor for coronary Heart disease in type 2 diabetic patients. *Brief Genetics Report.Diabetes*, vol.49, august 2000.

JARVIK, G. P. et al. Vitamin C and E intake is associated with increase paraoxanase activity. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*.22(8):1329-33, 2002.

KIM, D. S. et al. Dietary cholesterol increases paraoxanase 1 enzyme activity. *Journal of Lipid Research*. 53:2450-2458, 2012.

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

KIM, D. S. Dietary fatty acid intake is associated with paraoxanase 1 activity in a cohort-based analysis of 1,548 subjects. *Lipids in Health disease*. 12:183, 2013.

KLEEMOLA, P. Dietary determinants of serum paraoxanase activity in healthy humans. *Atherosclerosis*. 160:425-32, 2002.

KOTA, S. et al. Implications of serum paraoxonase activity in obesity, diabetes mellitus, and dyslipidemia. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, v.17, n.3, p.402, 2013.

KUDCHODKAR, B. J. et al. Diet fat modulates serum paraoxonase 1 activity in rats. *Journal of nutrition. Biochemical and Molecular Action of Nutrients*. 130:2427-2433, 2000.

LIXANDRU, D. et al. Diet and paraoxonase 1 enzymatic activity in diabetic foot patients from Romania and Belgium: Favorable association

of high flavonoid dietary intake with arylesterase activity. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 56:294-301,2010.

LEVIEV, I.; JAMES, R.W. Promoter polymorphisms of human paraoxanase PON1 gene and serum paraoxanase activities and concentrations. *Journal of the American Heart Association. Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 20:516-521, 2000.

MACKNESS, M. I. et al. Serum Paraoxonase activity in familial hypercholesterolaemia and insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. 86:193-199, 1991-b.

MACKNESS, M.I.; DURRINGTON, P.N. HDL: its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation. *Atherosclerosis*. 115:243-253, 1995.

MACKNESS, M.I. et al. Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Current Opinion in Lipidology*. 7:69-76, 1996.

MARSILLACH, J. N. et al. Serum paraoxonase-1 in chronic alcoholic: relationship with liver disease. *Clinical Biochemistry*. 40:645-650, 2007.

MASELLI, Luciana Morgati Ferreira. Estudos dos polimorfismos das paraoxanases 1 e 2 em pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana e avaliação do potencial de peroxidação lipídica. Tese. Universidade de São Paulo, São Paulo (SP), 2007.

MOHAMMADI, E.; RAFRAF, M. Benefits of Omega-3 Fatty Acids Supplementation on Serum Paraoxonase 1 Activity and Lipids Ratios in Polycystic Ovary Syndrome. *Health promotion Perspectives*, vol. 2, no. 2:197-204, 2012.

ORRENIUS, S. et al. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 47:143-183, 2007.

PHUNTUWATE, W. et al. Paraoxonase 1 status in the Thai Population. *Journal of Human Genetics*. 50:293-300, 2005.

- RAO, M. N. et al. Light, but not heavy alcohol drinking, stimulates paraoxonase by upregulating liver mRNA in rats and humans. *Metabolism*. 52:1287-1294, 2003.
- RIBEIRO, A. B.; CARDOSO. M. A. Construção de um questionário de frequência alimentar como subsídio para programas de prevenção de doenças crônicas não transmissíveis. *Revista de Nutrição*. Campinas. maio/ago. 15(2):239-245, 2002.
- SANTOS, Kátia Gonçalves. O papel dos polimorfismos do DNA relacionados ao estresse oxidativo e à disfunção endotelial na patogênese das complicações crônicas do diabetes mellitus. Tese (Doutor em Ciências)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
- SIERKSMA, A. M. et al. Kinetics of HDL cholesterol and paraoxonase activity in moderate alcohol consumers. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 26:1430-1435, 2002.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA (SBC). Arquivo Brasileiro de Cardiologia. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. (101)(4Supl.3):1-22, 2013.
- SOYMAN, Z. et al. Serum paraoxonase 1 activity, asymmetric dimethylarginine levels and brachial artery flow-mediated dilatation in women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*. March 1 Vol. 95, n. 3, 2011.
- SUEHIRO, T. et al. A polymorphism upstream from the human paraoxonase (PON1) gene and its association with PON1 expression. *Atherosclerosis*. 150:295-298, 2000.
- SCHRADER, C.; RIMBACH, G. Determinants of Paraoxonase 1 Status: Genes, Drugs and Nutrition. *Current Medicinal Chemistry*. v.18, n.36, p.5624-43, 2011;
- SUTHERLAND, W. et al. Reduced postprandial serum paraoxonase activity after a meal rich in used cooking fat. *Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 19: 1340-1347, 1999.

TOMÁS, M. et al. Interaction between the Gkn-Arg 192 variants of the paraoxanase gene and oleic acid intake as a determinant of high-density lipoprotein cholesterol and paraoxanase activity. *Euro J Pharmacol*, 432:121-128, 2001.

VAN DER GAAG, et al. Daily moderate alcohol consumption increase serum paraoxanase activity; a diet controlled, randomized intervention study in middle-aged man. *Atherosclerosis*. 147:405-410, 1999.

World Health Organization (WHO). *Physical status: the use and interpretation of anthropometry*. Geneva; 1995.

Anexo A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE NUTRIÇÃO
Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos

ASSOCIAÇÃO DA ATIVIDADE SÉRICA DA PARAOXONASE 1 COM PATOLOGIAS REPRODUTIVAS E FAIXA ETÁRIA EM MULHERES

Pesquisador responsável: Fabíola Goettems dos Santos

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, Fabíola Goettems Santos, Nutricionista, estou convidando você a participar como voluntária da pesquisa sobre “Associação da atividade sérica da Paraoxonase 1 com patologias reprodutivas e faixa etária em mulheres”.

Você foi selecionado de acordo com suas características referentes à Síndrome dos Ovários Policísticos descritos em seu prontuário no ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital Escola da Universidade Federal de Pelotas. Sua participação não é obrigatória, a qualquer momento, você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição. Se tiver qualquer dúvida, você terá o direito de entrar em contato com o pesquisador ou com o Conselho de Ética da Pesquisa.

Os objetivos deste estudo são: Verificar peso, altura, Índice de Massa Corporal (IMC), circunferência de cintura, atividade sérica da enzima Paraoxonase 1 na amostra de sangue coletada e os polimorfismos genéticos relacionados à patologias do sistema reprodutivo feminino em relação à idade através da coleta de saliva. Esses parâmetros serão analisados com o intuito de relacionar a baixa atividade da enzima PON1 apresentada por essas mulheres. A amostra de sangue e de saliva coletados serão desprezados após a intervenção e análise dos dados. Acreditamos que essa pesquisa seja importante para podermos analisar as características das mulheres que possuem alguma patologia do sistema reprodutivo relacionado com a atividade da paraoxonase e o envelhecimento.

Os riscos relacionados com sua participação são: Invasivo – no momento da coleta do sangue e um certo desconforto na coleta da saliva.

Custo/Reembolso para o participante: ao participar dessa pesquisa, você não arcará com nenhum gasto decorrente de sua participação. Os exames serão totalmente gratuitos e você não receberá nenhuma cobrança ou gratificação em dinheiro ao final do estudo.

Os benefícios relacionados com a sua participação são: Oportunidade de fazer um exame clínico de colesterol HDL, LDL e antropométrico por profissionais da área da saúde e encaminhamento para o Ambulatório de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas se necessário.

Confidencialidade da pesquisa: garantimos que sua privacidade será mantida quanto aos dados envolvidos na pesquisa e somente os dados relacionados diretamente ao estudo serão divulgados em eventos ou publicações científicas sem que haja identificação dos participantes.

Nome e assinatura do pesquisador

Consentimento de participação da pessoa entrevistada

Eu, (nome completo do voluntário), após a leitura deste documento e ter tido a oportunidade de conversar com o pesquisador responsável, para esclarecer todas as minhas dúvidas, acredito estar suficientemente informado, ficando claro para mim que minha participação é voluntária e que posso retirar este consentimento a qualquer momento sem penalidades ou perda de qualquer benefício. Estou ciente também dos objetivos da pesquisa, dos procedimentos aos quais serei submetido, dos possíveis danos ou riscos deles provenientes e da garantia de confidencialidade e esclarecimentos sempre que desejar. Diante do exposto expresse minha concordância de espontânea vontade em participar deste estudo.

Assinatura do voluntário ou de seu representante legal

Assinatura de uma testemunha

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste voluntário para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pela obtenção do TCLE

Dados dos pesquisadores:

Fabíola Goettems Santos –
Telefones: (53) 81119873
Faculdade de Nutrição - Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos
Universidade Federal de Pelotas
Campus Porto
E-mail para contato: fabiola.nutri2011@hotmail.com

Dados do orientador:

Prof. Dr. Augusto Schneider
Faculdade de Nutrição – Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos
Universidade Federal de Pelotas
Campos Porto
E-mail para contato: augustoschneider@gmail.com

Pelotas, fevereiro de 2014

Nome e assinatura do entrevistado

ANEXO B – QUESTIONÁRIO

1. As questões seguintes relacionam-se ao seu hábito alimentar usual no período um mês. Para cada quadro, responda, por favor, a frequência que melhor descreva QUANTAS VEZES você costuma comer cada item e a respectiva UNIDADE DE TEMPO (se por dia, por semana ou no mês). Depois, responda qual a sua PORÇÃO INDIVIDUAL USUAL em relação à porção média indicada. Muitos grupos de alimentos incluem exemplos. Eles são sugestões e você pode não consumir todos os itens indicados.

GRUPO DO LEITE E DERIVADOS	QUANTAS VEZES VOCÊ COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO	CODIF.
Leite integral	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	1 copo peq 150 ml	P M G	_____
Leite desnatado	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	1 copo peq 150 ml	P M G	_____
logurte natural	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	1 copo 200 ml	P M G	_____
logurte "com frutas"	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	1 copo 200 ml	P M G	_____
Queijo fresco ou ricota	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	1 fatia 30 g	P M G	_____
Queijos amarelos	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	1 fatia 20 g	P M G	_____
GRUPO DOS PÃES E CEREAIS MATINAIS	QUANTAS VEZES VOCÊ COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO	CODIF.
Pão francês, forma	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	1 unidade 50 g	P M G	_____
Pão integral, centeio	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	2 fatias 50 g	P M G	_____
Pão doce, queijo, outros	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	2 unid peq. 40g	P M G	_____
Biscoitos ou torradas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	3 unid 21 g	P M G	_____
Requeijão	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	1 colh. Sobr 20 g	P M G	_____
Margarina light	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	1 pta faca 2,5 g	P M G	_____
Margarina comum	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	1 pta faca 2,5 g	P M G	_____
Manteiga	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	2 ptas faca 5 g	P M G	_____
Geléia ou mel	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	1 colh. sopa 15g	P M G	_____
Aveia, granola e outros	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	3 colh. sopa 26 g	P M G	_____
CEREAIS, TUBÉRCULOS E MASSAS	QUANTAS VEZES VOCÊ COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO	CODIF.
Arroz branco	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	1 esc 77,5 g	P M G	_____
Batata, mandioca fritas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	2 colh. sopa 50 g	P M G	_____
Batata, mandioca, outros	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	1 unid 70 g	P M G	_____
Batata doce ou abóbora	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	1 unid. 70 g	P M G	_____
Massas (macarrão, pizza)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	1 prato sobr 95 g	P M G	_____
Salgados e tortas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	1 unidgde 110g	P M G	_____
Farofa, farinha de milho	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	2 colh. sopa 25 g	P M G	_____
GRUPO DAS FRUTAS	QUANTAS VEZES VOCÊ COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO	CODIF.
Laranja, mixirica, pokan	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	1 unid 180g	P M G	_____
Banana	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	1 unid 60 g	P M G	_____
Maçã, pêra	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	1 unidpeq 80 g	P M G	_____
Mamão, papaya	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	½ unid 155 g	P M G	_____
Melancia, melão	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	1 fatia média 90 g	P M G	_____

Uva/abacaxi/goiaba na época	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	1 cacho peq ou 1 unid	P M G	_____
Abacate na época	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	1 xíc chá 130 g	P M G	_____
Manga, caqui, na época	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	4 ped 100 g	P M G	_____
Outras frutas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	1 unid 60 g	P M G	_____
Suco de laranja natural	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	1 copo 200 ml	P M G	_____
Suco de outras frutas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	1 copo 200 ml	P M G	_____
GRUPO DAS LEGUMINOSAS	QUANTAS VEZES VOCÊ COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO	CODIF.
Feijão roxo, carioca	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	1 concha 110 g	P M G	_____
Ervilha, lentilha, outros	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	1 ½ colh. sopa 30g	P M G	_____
Feijoada	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	1 conchch 225 g	P M G	_____
GRUPO DE VERDURAS/ LEGUMES	QUANTAS VEZES VOCÊ COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO	CODIF.
Alface, escarola, agrião, rúcula, almeirão	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	3 folhas (30 g)	P M G	_____
Repolho/acetga/couve-flor	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	3 colh. sopa (45g)	P M G	_____
Couve/brócolos/espinafre	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	3 colh. sopa (45g)	P M G	_____
Cenoura	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	2 colh sopa (25g)	P M G	_____
Tomate	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	1 unpeq (50 g)	P M G	_____
Berinjela	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	2 colh sopa (50 g)	P M G	_____
Beterraba, vagem, chuchu, abobrinha, milho	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	2 colh. sopa (40g)	P M G	_____
Salada de maionese	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	1 pires (90 g)	P M G	_____
Sopas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	1 prato fundo (520g)	P M G	_____
GRUPO DAS CARNES E OVOS	QUANTAS VEZES VOCÊ COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO	CODIF.
Carne bovina	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	1 bife med. 100 g	P M G	_____
Carne de porco	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	1 unidade 165 g	P M G	_____
Bacon, toucinho, torresmo, pururuca	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	1 fatia média 16g	P M G	_____
Carne de frango, chester, peru, outras aves	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	1 filé 100g	P M G	_____
Peixes	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	1 filé 130g	P M G	_____
Miúdos, dobradinha	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	2 pedaços 100 g	P M G	_____
Camarão, frutos do mar	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	1 esc 120 g	P M G	_____
Lingüiça, salsicha	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	1 unid 60 g	P M G	_____
Presunto, mortadela, outros frios	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	1 ½ fatia 22 g	P M G	_____
Ovos	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	1 unid 50 g	P M G	_____

GRUPO DAS BEBIDAS	QUANTAS VEZES VOCÊ COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO	CODIF.
Café	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	½ copo peq 75ml	P M G	-----
Açúcar no café	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	1 colh. sopch 29g	P M G	-----
Adoçante no café	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	3,4 gotas ou 1envelope (0,8 g)	P M G	-----
Chá preto ou mate	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	1 xíc 200 ml	P M G	-----
Chá de ervas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	1 xíc 200 ml	P M G	-----
Água	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	1 copo 200 ml	P M G	-----
Cerveja	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	1lata 350 ml	P M G	-----
Pinga, destilados	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	68 ml ou 1,5 dose	P M G	-----
Vinho	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	2 cálices 100 ml	P M G	-----
Sucos artificiais	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	1 copo gde 300 ml	P M G	-----
Refrigerante diet	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	1 copo gde 300 ml	P M G	-----
Refrigerante normal	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	1 copo gde 300 ml	P M G	-----
GRUPO DE DOCES E MISCELÂNEAS	QUANTAS VEZES VOCÊ COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO	CODIF.
Bolo, tortas, pavês	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	1 fatia 100g	P M G	-----
Chocolates, brigadeiro	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	2 unid./1 peq 30g	P M G	-----
Sorvetes, milk-shake	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	1 unid 80 g	P M G	-----
Pudins, doces com leite	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	1 unid 100 g	P M G	-----
Doces de frutas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	1 colhsop 30 g	P M G	-----
Castanhas e oleaginosas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	½ xícara chá 50g	P M G	-----
Pipoca, Chips, outros	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	½ pacote 50 g	P M G	-----
		QUANTAS VEZES VOCÊ COME	UNIDADE		
Com que frequência você usa gordura ou óleo no preparo de suas refeições?	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			-----
Quantas porções de vegetais (verduras e legumes) você costuma comer, sem incluir saladas ou batatas?	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			-----
Quantas porções de frutas você costuma comer, sem incluir sucos de frutas?	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			-----

2. Por favor, informe qualquer outro alimento ou preparação importante que o(a) Sr.(a) costuma comer ou beber por pelo menos UMA VEZ POR SEMANA que não tenha sido citado aqui (p. ex.: outros tipos de carnes, receitas caseiras, creme de leite, *chantilly*, leite condensado, gelatina e outros doces, risoto etc).

ALIMENTO	FREQÜÊNCIA POR SEMANA	QUANTIDADE CONSUMIDA	CONS	COD

3. Quantas refeições o(a) Sr(a) faz por dia? _____

4. Quantas refeições o(a) Sr(a) faz fora de casa, por semana? _____

5. Em que local você costuma fazer as suas refeições fora de casa?

(1) restaurantes (2) lanches rápidos (3) marmita (4) não faz

6. Que tipo de ÓLEO/GORDURA O Sr.(a) costuma usar no COZIMENTO/PREPARO de refeições?

(0) não usa (1) Margarina (2) Manteiga (3) Azeite de oliva (4) óleo soja/milho/outros
(5) bacon (6) banha (99) não sabe/não cozinha

7. Que tipo de ÓLEO o Sr. (a) costuma usar em saladas?

(0) não usa (1) azeite de oliva (2) óleo soja/milho (3) óleo girassol/canola (99) não sabe/não cozinha

8. Quando o(a) Sr.(a) come carne de boi/vaca ou de porco, você costuma comer a gordura visível?

(1) nunca/raramente (2) algumas vezes (3) sempre

9. Quando o(a) Sr.(a) come carne de frango, você costuma comer a pele?

(1) nunca/raramente (2) algumas vezes (3) sempre

10. O(a) Sr.(a) costuma acrescentar:

- sal na comida depois de pronta? (1) nunca/raramente (2) algumas vezes (3) sempre

- usar pimenta em suas refeições? (1) nunca/raramente (2) algumas vezes (3) sempre

11. Com que frequência o(a) Sr.(a) costuma comer carnes fritas/assadas ou grelhadas?

(1) nunca/raramente (2) algumas vezes (3) sempre (9) não sabe

12. Quando o Sr.(a) come queijo/requeijão, iogurte/sorvete e maionese/molhos para salada, com que frequência esses alimentos são do tipo *light*?

- Queijo/requeijão: (1) sempre (2) algumas vezes (3) raramente ou não come (9) não sabe

- Iogurte/sorvete: (1) sempre (2) algumas vezes (3) raramente ou não come (9) não sabe

- Maionese/molhos: (1) sempre (2) algumas vezes (3) raramente ou não come (9) não sabe