

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



Dissertação

ATIVIDADE DA PARAOXONASE-1:
ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO A POLIMORFISMOS GENÉTICOS, FATORES
BIOQUÍMICOS E NUTRICIONAIS EM CRIANÇAS.

Gabriela de Lemos Uliano

Pelotas, 2015.

GABRIELA DE LEMOS ULIANO

ATIVIDADE DA PARAOXONASE-1:

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO A POLIMORFISMOS GENÉTICOS, FATORES
BIOQUÍMICOS E NUTRICIONAIS EM CRIANÇAS.**

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

Orientador: Prof^a Dra. Sandra Costa Valle

Coorientadores: Prof Dr. Augusto Schneider

Prof^a Dra. Ludmila Muniz

Pelotas, 2015.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

U39a Uliano, Gabriela de Lemos

Atividade da paraoxonase-1: estudo da associação a polimorfismos genéticos, fatores bioquímicos e nutricionais em crianças / Gabriela de Lemos Uliano; Sandra Costa Valle, orientadora; Augusto Schneider, Ludmila Correa Muniz, coorientadores. — Pelotas, 2015.

120 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. PON1. 2. Polimorfismo genético. 3. Crianças. 4. Consumo alimentar. 5. Perfil lipídico. I. Valle, Sandra Costa, orient. II. Schneider, Augusto, coorient. III. Muniz, Ludmila Correa, coorient. IV. Título.

CDD: 641.1

GABRIELA DE LEMOS ULIANO

ATIVIDADE DA PARAOXONASE-1:
ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO A POLIMORFISMOS GENÉTICOS, FATORES
BIOQUÍMICOS E NUTRICIONAIS EM CRIANÇAS.

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Nutrição e Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa:

31 de Março de 2015.

Banca examinadora:

Prof. Dra. Ângela Nunes Moreira

Doutora em Biotecnologia Agrícola pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dra. Janaína Vieira dos Santos Motta

Doutora em Epidemiologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dra. Maria Cecília Formoso Assunção

Doutora em Epidemiologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dra. Sandra Costa Valle (Orientador)

Doutora em Fisiologia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus pais, Marcelo e Maristela, que sempre apoiaram minhas escolhas profissionais e batalharam para que eu e meus irmãos tivéssemos uma educação de qualidade. Pai e mãe, obrigada por estimularem minha curiosidade e minha paixão pela leitura e pelos estudos. Agradeço por me proporcionarem a experiência de viver em meio às análises clínicas desde sempre, e que foram tão importantes para mim nestes últimos dois anos.

Ao meu namorado Bruno, meu grande incentivador que suportou todas as minhas inseguranças e dúvidas nesta etapa. Sempre teve uma palavra de consolo no momento certo: *“Seguí tu intuición”*. Obrigada por não me deixar desistir e por me acompanhar nesta trajetória, tanto nos momentos bons quanto nos mais difíceis. Sem teu apoio talvez isso não fosse possível, te amo!

Minhas amigas que sempre compreenderam meu afastamento, e uma amiga em especial que o mestrado me trouxe de presente. Obrigada Marina Ferrasso por me acolher na tua casa em Pelotas e por me ajudar desde a etapa de seleção até as instruções de como fazer uma boa apresentação em slides! Sou eternamente grata a ti e digo com muita propriedade que és uma das pessoas mais generosas que já conheci.

Agradeço aos professores do Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da UFPEL por terem colaborado com a minha formação, em especial aos meus coorientadores, Ludmila e Augusto, por estarem sempre dispostos a me ajudar e terem contribuído muito com o meu trabalho.

Obrigada às minhas entrevistadoras, em especial Carol e Tainá, por todo o trabalho em equipe realizado sem o qual este estudo não seria viável.

E por último, mas o meu mais sincero agradecimento, à minha orientadora Sandra Valle. Mais que uma orientadora, fosse uma amiga, e diria até uma “mãe” para mim neste período. Aprendi muito contigo e sei o quanto apostasse neste trabalho e respeitasse minha vontade de trabalhar com humanos ao invés de animais. Obrigada por tudo que fizesse por mim e por me orientar não só nesta pesquisa, mas também nas minhas escolhas.

Muito obrigada a todos.

Resumo

ULIANO, Gabriela de Lemos. **Atividade da paraoxonase-1: estudo da associação a polimorfismos genéticos, fatores bioquímicos e nutricionais em crianças.** 2015. 120p. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

A infância é um período vulnerável para o início das lesões endoteliais, as quais podem ser agravadas pela exposição a fatores nutricionais de risco. Por outro lado, está comprovado que uma elevada concentração de lipoproteína de alta densidade (HDL) protege contra o surgimento destas lesões, refletindo em menor risco de desenvolvimento da doença cardiovascular (DCV). A principal enzima antioxidante e antiinflamatória que contribui com a propriedade antiaterogênica atribuída ao HDL é a paraoxonase 1 (PON1). Sua atividade sérica pode ser influenciada por diversos parâmetros incluindo polimorfismos genéticos, fatores nutricionais, estilo de vida, idade, fármacos, estado de saúde e estresse oxidativo. O objetivo deste estudo foi investigar a atividade da PON1 e sua associação a polimorfismos genéticos, fatores bioquímicos e nutricionais em crianças de 5 a 7 anos de idade atendidas em ambulatórios de pediatria de duas cidades do sul do Rio Grande do Sul. Foi realizado um estudo transversal no período de Janeiro de 2014 a Fevereiro de 2015. O consumo alimentar foi avaliado pelo questionário do SISVAN. Medidas de peso, altura e circunferência da cintura da criança foram utilizadas para avaliar o estado nutricional. Uma amostra de sangue foi coletada e utilizada para avaliação do perfil lipídico e da atividade arilesterase da PON1, medida utilizando fenilacetato como substrato. A amostra biológica também serviu para a determinação do polimorfismo PON1 C(-107)T, realizada pela amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida de digestão com enzima de restrição. Os dados coletados foram analisados no programa *Stata* versão 12, assumindo-se um nível de significância de 5%. A mediana da atividade arilesterase da PON1 foi de 89,4kU/L, semelhante entre meninos e meninas. A análise do polimorfismo revelou que o genótipo mais frequente foi o heterozigoto CT (52,1%). O polimorfismo se mostrou em equilíbrio de Hardy-Weinberg. O genótipo CC mostrou valores mais elevados de atividade enzimática do que os apresentados pelo genótipo TT ($p < 0,01$). Níveis desejáveis de HDL relacionaram-se a um incremento significativo da enzima na população total. As concentrações desta lipoproteína foram significativamente maiores apenas nas crianças eutróficas portadoras do genótipo CC em comparação às portadoras do alelo T. Este é o primeiro estudo investigando o consumo alimentar como possível determinante dos níveis enzimáticos da PON1 em crianças. Foi verificado que aquelas que consumiram salada crua regularmente mostraram maiores níveis ($p < 0,01$) de atividade enzimática. A associação entre o genótipo -107CC, consumo regular de salada crua, maior atividade da PON1 e concentração de HDL-C em crianças eutróficas sugere que os fatores genéticos e suas interações com o ambiente estão relacionados a um perfil protetor contra o desenvolvimento de DCV.

Palavras-chave: PON1; polimorfismo genético; crianças; consumo alimentar; estado nutricional; perfil lipídico.

Abstract

ULIANO, Gabriela de Lemos. **Paraoxonase-1 activity: study of association to genetic polymorphisms, biochemical and nutritional factors in children.** 2015. 120p. Dissertation (Master degree em Nutrição e Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

Childhood is a vulnerable period for the start of endothelial lesions, which may be aggravated by exposure to nutritional risk factors. On the other hand, it is proven that an elevated concentration of high density lipoprotein (HDL) protects against the emergence of these lesions, resulting in a lower risk of cardiovascular disease (CVD) development. The main antioxidant and anti-inflammatory enzyme that contributes to the antiatherogenic property attributed to HDL is paraoxonase 1 (PON1). Its serum activity may be influenced by several parameters including genetic polymorphisms, nutritional factors, lifestyle, age, drugs, health status and oxidative stress. The aim of this study was to investigate the serum PON1 activity and its association to genetic polymorphisms, biochemical and nutritional factors in children aged 5-7 years, attending pediatric clinics in two cities in southern Rio Grande do Sul. A cross-sectional study was conducted from January 2014 to February 2015. Dietary intake was assessed by SISVAN questionnaire. Weight, height and waist circumference of the child were used to evaluate nutritional status. A blood sample was collected and used to assess lipid profile and PON1 arylesterase activity, measured using phenylacetate as substrate. The biological sample was also used to determine the polymorphism PON1 C(-107)T, genotyped by PCR amplification followed by restriction digestion. Data were analyzed in *Stata* program version 12, assuming a 5% significance level. The median PON1 arylesterase activity was 89,4kU/L, similar between boys and girls. The polymorphism analysis revealed that the most common genotype was the heterozygous CT (52.1%). The polymorphism was in Hardy-Weinberg equilibrium. The CC genotype showed higher levels of enzyme activity than those presented by TT genotype ($p < 0.01$). Desirable levels of HDL were related to a significant increase of the enzyme in the entire population. These lipoprotein concentrations were significantly higher only in normal weight children carrying the CC genotype compared to those carrying the allele T. This is the first study investigating food consumption as a potential determinant of PON1 enzymatic levels in children. It was verified that those who regularly consumed raw vegetables showed higher levels ($p < 0.01$) of enzyme activity. The association between -107CC genotype, regular consumption of raw vegetables, higher PON1 activity and HDL-C concentration in normal weight children suggests that genetic factors and their interactions with the environment are related to a protective profile against the development of CVD.

Keywords: PON1; genetic polymorphism; children; food consumption; nutritional status; lipid profile.

Sumário

| | |
|--|-----------|
| Introdução | 8 |
| Parte 1 - Projeto de dissertação | 11 |
| 1 Introdução | 19 |
| 1.1 Justificativa | 22 |
| 2 Objetivos | 23 |
| 2.1 Objetivo Geral | 23 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 23 |
| 3 Hipóteses | 24 |
| 4 Revisão bibliográfica | 25 |
| 4.1 Impacto da obesidade na função cardiovascular | 25 |
| 4.2 Lipoproteína de alta densidade (HDL) | 26 |
| 4.3 Paraoxonase-1: características e funções..... | 29 |
| 4.4 Modulação da atividade da paraoxonase-1 | 30 |
| 4.4.1 Inflamação..... | 31 |
| 4.4.2 Estresse oxidativo | 32 |
| 4.4.3 Fatores comportamentais e uso de fármacos | 33 |
| 4.4.4 Fatores nutricionais | 35 |
| 4.4.4.1 Estado nutricional | 35 |
| 4.4.4.2 Dieta | 35 |
| 4.4.5 Fatores genéticos..... | 38 |
| 4.5 Atividade da paraoxonase na infância..... | 38 |
| 5 Materiais e métodos | 41 |
| 5.1 Delineamento | 41 |
| 5.2 População em estudo..... | 41 |
| 5.3 Amostra | 41 |
| 5.3.1 Critérios de inclusão e exclusão | 41 |
| 5.3.2 Cálculo do tamanho amostral..... | 41 |
| 5.4 Logística e Caracterização do local..... | 42 |
| 5.5 Definição do desfecho | 43 |
| 5.5.1 Atividade arilesterase da PON1 | 43 |
| 5.6 Definição das variáveis de exposição | 44 |
| 5.6.1 Polimorfismo genético -107C/T da enzima PON1 | 44 |
| 5.6.2 Antropometria..... | 45 |
| 5.6.3 Determinação dos níveis séricos dos lipídeos..... | 46 |
| 5.6.4 Consumo alimentar | 47 |
| 5.7 Instrumentos..... | 47 |
| 5.8 Seleção e treinamento dos entrevistadores | 48 |
| 5.9 Estudo piloto..... | 48 |
| 5.10 Controle de qualidade | 48 |
| 5.11 Análise dos dados | 49 |
| 5.12 Aspectos éticos | 49 |
| 5.13 Orçamento..... | 50 |

| | |
|--|------------|
| 5.14 Divulgação de resultados | 50 |
| 6 Cronograma de execução | 51 |
| Referências | 52 |
| Parte 2 - Relatório do trabalho de campo..... | 62 |
| 1 Logística do trabalho de campo | 63 |
| 2 Seleção e treinamento dos entrevistadores | 63 |
| 3 Estudo Piloto | 63 |
| 4 Coleta de dados | 64 |
| 4.1 Controle de qualidade dos dados..... | 64 |
| 4.2 Digitação e processamento de dados | 64 |
| 5 Perdas..... | 65 |
| 6 Análises laboratoriais | 65 |
| 7 Modificações do projeto de pesquisa | 65 |
| Parte 3 – Artigos..... | 67 |
| Artigo 1 | 67 |
| Artigo 2 | 84 |
| Conclusões | 99 |
| Referências | 100 |
| Apêndices | 111 |
| Anexos | 119 |

INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a doença cardiovascular (DCV) é a principal causa de morte no mundo, perfazendo 30% das mortes globais, taxa semelhante à encontrada no Brasil (WHO, 2011; SBC, 2007). As DCV têm como características a presença da aterosclerose, acúmulo de placas de gorduras nas artérias que impedem a passagem do sangue, e a elevada associação a comprovados fatores de risco, como a obesidade e a dislipidemia (SBC, 2007).

Deve-se considerar que os primeiros estágios da aterosclerose podem ter início na vida intrauterina ou nos primeiros anos de vida da criança (CARVALHO et al., 2007; REGO; CHIARA, 2006) e, mesmo na infância, a progressão das lesões endoteliais está na dependência de fatores de risco e de suas inter-relações (KELISHADI, 2010).

A elevação dos níveis séricos de colesterol total (CT), triglicerídeos (TG) e da fração das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), além da redução na fração das lipoproteínas de alta densidade (HDL) também estão intimamente associadas às DCV (SPEDM, 2009). Assim, uma alta concentração de HDL protege contra o surgimento e o avanço das lesões endoteliais, com efeito antioxidante, anti-inflamatório e antiaterogênico (SCHRADER; RIMBACH, 2011).

Uma das enzimas que contribui significativamente com a propriedade antiaterogênica atribuída ao HDL é a paraoxonase 1 (PON1) (SCHRADER; RIMBACH, 2011). A PON1 é uma enzima antioxidante que circula no plasma junto às partículas de HDL, contribuindo com suas propriedades antiaterogênicas. A PON1 atua na prevenção do aumento da quantidade de espécies reativas de oxigênio (ERO) e na hidrólise dos peróxidos lipídicos, diminuindo a suscetibilidade do HDL à peroxidação, e no aumento do efluxo de colesterol a partir de macrófagos. Uma redução na atividade da PON1 está relacionada ao aumento do risco de DCV (DURRINGTON; MACKNESS; MACKNESS, 2001).

A atividade sérica da PON1 varia entre indivíduos e é influenciada por fatores genéticos e nutricionais, estilo de vida, idade, uso de fármacos, estado de saúde e estresse oxidativo (SCHRADER; RIMBACH, 2011). Há evidências de que os níveis da PON1 aumentam em crianças a partir do nascimento, estabilizando-se ao redor dos

dois anos de idade e alcançando um platô em torno dos 7 anos, quando observam-se níveis semelhantes aos de adultos (HUEN et al., 2009). Já os dados sobre a associação entre a atividade da PON1 e estado nutricional em crianças são limitados e divergentes (SUMEGOVÁ et al., 2007; KRZYTEK-KORPACKA; PATRYN; HOTOWY, 2013; KONCSOS et al., 2010; RUPÉREZ et al. 2013; GRACÉS et al., 2007).

Dentre as alterações genéticas, o polimorfismo genético caracterizado na região promotora C(-107)T exerce efeitos extremamente significativos na atividade da enzima. Indivíduos portadores do genótipo -107CC apresentam níveis de PON1 até duas vezes mais elevados que aqueles observados nos portadores do alelo -107T (BROPHY et al., 2001). Na população infantil brasileira, a frequência deste polimorfismo ainda é desconhecida.

Hoje está claro que diferentes padrões dietéticos modulam os fatores envolvidos no processo aterosclerótico, incluindo a atividade da PON1 (SANTOS et al., 2013). Estudos em humanos mostraram que dietas ricas em ácidos graxos monoinsaturados aumentaram a atividade pós-prandial da enzima. O contrário ocorreu com uma dieta rica em gordura saturada. Os alimentos ricos em polifenóis estiveram associados de maneira positiva a PON1, aumentando significativamente seus níveis (SCHRADER; RIMBACH, 2011). Além disso, estudos indicam que, mesmo na presença de polimorfismos genéticos implicados em menor expressão da PON1, alguns fatores dietéticos, a exemplo dos antioxidantes, podem estimular sua atividade enzimática (PRÉCOURT et al., 2011).

Sabe-se que as alterações metabólicas ligadas à DCV ocorrem ainda na infância, não somente por influência genética, mas principalmente em decorrência da dislipidemia associada ao excesso de peso e ao consumo de alimentos não saudáveis (SBP, 2012). Nesta faixa etária, potenciais fatores de confusão para avaliação da ação da PON1, como influência hormonal, tabagismo e consumo de álcool ainda não estão presentes. Entretanto, nenhum artigo revisado investigou a atividade da PON1 em crianças e sua associação com fatores genéticos e nutricionais, sendo este um dos aspectos motivadores deste estudo.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo investigar a atividade da PON1 e sua associação a polimorfismos genéticos, fatores bioquímicos e nutricionais

em crianças de 5 a 7 anos de idade atendidas em ambulatórios de pediatria de duas cidades do sul do Rio Grande do Sul. Mediante os dados resultantes desta pesquisa será possível beneficiar a população infantil atendida em nível ambulatorial, propiciando uma conduta nutricional direcionada a fim de protegê-la do dano endotelial e da doença aterosclerótica.

Este volume de dissertação está estruturado em três partes. A primeira refere-se ao projeto de pesquisa com as modificações sugeridas pela banca de qualificação. A segunda parte trata do relatório de trabalho de campo, desenvolvido entre janeiro de 2014 e fevereiro de 2015, e engloba a coleta e análise dos dados. Optou-se por dividir os resultados desta pesquisa em dois artigos iniciais. O primeiro artigo intitulado “Influência do consumo alimentar, estado nutricional e perfil lipídico sobre a atividade da paraoxonase 1 em crianças de 5 a 7 anos de idade.” será submetido ao British Journal of Nutrition. O segundo artigo “Associação entre a atividade enzimática e o polimorfismo C(-107)T do gene da paraoxonase 1, estado nutricional e perfil lipídico em crianças de 5 a 7 anos de idade.” será submetido ao periódico Genes & Nutrition. Ambos serão traduzidos para a língua inglesa antes da submissão e constituem a terceira parte desta dissertação. Por fim, as conclusões desta pesquisa, suas referências, apêndices e anexos.

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



Projeto de Dissertação

ATIVIDADE DA PARAOXONASE-1:
ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO A POLIMORFISMOS GENÉTICOS, FATORES
BIOQUÍMICOS E NUTRICIONAIS EM CRIANÇAS.

Gabriela de Lemos Uliano

Pelotas, novembro de 2013.

GABRIELA DE LEMOS ULIANO

ATIVIDADE DA PARAOXONASE-1:

ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO A POLIMORFISMOS GENÉTICOS, FATORES
BIOQUÍMICOS E NUTRICIONAIS EM CRIANÇAS.

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

Orientador: Prof^a Dra. Sandra Costa Valle

Coorientadores: Prof Dr. Augusto Schneider

Prof^a Dra. Ludmila Muniz

Pelotas, novembro de 2013.

Banca examinadora:

Membros Efetivos: Prof^a Dra. Sandra Costa Valle

Prof^a Dra. Renata Torres Abib

Membro Suplente: Prof Dr. Paulo Cavalheiro Schenkel

Resumo

ULIANO, G. **Atividade da paraoxonase-1: estudo da associação a polimorfismos genéticos, fatores bioquímicos e nutricionais em crianças.** 2013. 59p.

As doenças cardiovasculares (DCV) têm como características a presença da aterosclerose e a elevada associação a fatores de risco, como obesidade e dislipidemias. Estas patologias manifestam-se, em geral, em adultos, porém o processo de disfunção endotelial tem início já na fase intrauterina. A obesidade infantil está geralmente ligada a uma alimentação não saudável, e a relação entre estes fatores pode explicar a alta prevalência de dislipidemia nesta população. Está comprovado que uma alta concentração de lipoproteína de alta densidade (HDL) protege contra o surgimento das lesões endoteliais, com efeito antioxidante, anti-inflamatório e antiaterogênico. Uma das enzimas que contribui significativamente com estas propriedades é a paraoxonase-1 (PON1). A atividade sérica da PON1 varia entre as pessoas sendo influenciada por fatores genéticos, nutricionais, estilo de vida, idade, fármacos, estado de saúde e estresse oxidativo. Apesar da diminuição da capacidade antioxidante na obesidade infantil, dados sobre a associação do estado nutricional e atividade da PON1 em crianças são limitados e divergentes. O objetivo deste estudo é investigar a atividade da PON1 e sua associação a polimorfismos genéticos, fatores bioquímicos e nutricionais, em crianças de 5 a 8 anos de idade atendidas no Ambulatório de Pediatria da Faculdade de Medicina/UFPEL, na cidade de Pelotas – RS. O estudo terá um delineamento transversal e será realizado no período de Janeiro a Junho de 2014. As informações serão coletadas mediante assinatura do termo de consentimento pelo responsável, que deverá responder a um questionário com perguntas sobre saúde e comportamento da criança. Para avaliar a qualidade da alimentação, será aplicado o questionário de consumo alimentar do SISVAN. Serão feitas medidas de peso, altura e circunferência da cintura da criança para avaliar o estado nutricional. O paciente será encaminhado para uma coleta de sangue para avaliação da variável de desfecho através da determinação da atividade arilesterase da PON1, que será dosada no soro. A amostra biológica também servirá para análise do polimorfismo genético -107C/T da enzima PON1 e dos triglicerídeos, colesterol total e suas frações. Os dados coletados serão analisados utilizando-se o software STATA versão 12, assumindo-se um nível de significância de 5%.

Palavras-chave: Paraoxonase-1. Crianças. Estado nutricional. Polimorfismo genético. Consumo alimentar.

Lista de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Constituição da lipoproteína de alta densidade (HDL) | 27 |
| Figura 2 - Interconversão das frações HDL2 e HDL3..... | 28 |
| Figura 3 - Papel da PON1 associada ao HDL na oxidação do LDL | 32 |
| Figura 4 - Cálculo do tamanho de amostra para as diversas exposições | 42 |
| Figura 5 - Recrutamento e fluxograma de coleta de dados..... | 43 |
| Figura 6 - Valores de referência de IMC/idade propostos para a população de 5 a 19 anos pela Organização Mundial da Saúde | 45 |
| Figura 7 - Distribuição em percentis da circunferência abdominal segundo sexo e idade | 46 |
| Figura 8 - Valores de referência lipídica propostos para a população de 2 a 19 anos pela I Diretriz de Prevenção da Aterosclerose na Infância e na Adolescência | 47 |
| Figura 9 - Orçamento do projeto de pesquisa | 50 |
| Figura 10 - Cronograma de atividades | 51 |

Lista de Abreviaturas e Siglas

| | |
|-------------------------------|--|
| apoA-I | Apolipoproteína A |
| apoB | Apolipoproteína B |
| CT | Colesterol Total |
| DCV | Doença Cardiovascular |
| ERO | Espécies Reativas de Oxigênio |
| HDL | Lipoproteínas de Alta Densidade |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de Hidrogênio |
| IBGE | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística |
| IL-6 | Interleucina 6 |
| IMC | Índice de Massa Corporal |
| LCAT | Lecitina-Colesterol Aciltransferase |
| LDL | Lipoproteínas de Baixa Densidade |
| LDL-ox | LDL-oxidado |
| NFKappaB | Fator Nuclear Kappa-B |
| NO | Óxido Nítrico |
| OH | Radical Hidroxila |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| ONOO ⁻ | Radical Peroxinitrito |
| O ₂ ⁻ | Radical Superóxido |
| POF | Pesquisa de Orçamento Familiar |
| PON1 | Paraoxonase-1 |
| QM | Quilomícrons |
| RS | Rio Grande do Sul |
| SAA | Proteína Amiloide Sérica A |
| SBC | Sociedade Brasileira de Cardiologia |
| SBP | Sociedade Brasileira de Pediatria |
| SC | Santa Catarina |
| SISVAN | Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional |
| SPEDM | Sociedade Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo |
| TCLE | Termo de Consentimento Livre e Esclarecido |

| | |
|--------------|--|
| TG | Triglicerídeos |
| TNF α | Fator de Necrose Tumoral |
| UFPEL | Universidade Federal de Pelotas |
| VLDL | Lipoproteínas de Muito Baixa Densidade |

Sumário

| | |
|--|-----|
| 1 Introdução | 19 |
| 1.1 Justificativa | 22 |
| 2 Objetivos | 23 |
| 2.1 Objetivo Geral | 23 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 23 |
| 3 Hipóteses | 24 |
| 4 Revisão bibliográfica | 25 |
| 4.1 Impacto da obesidade na função cardiovascular | 25 |
| 4.2 Lipoproteína de alta densidade (HDL) | 26 |
| 4.3 Paraoxonase-1: características e funções..... | 29 |
| 4.4 Modulação da atividade da paraoxonase-1 | 30 |
| 4.4.1 Inflamação..... | 31 |
| 4.4.2 Estresse oxidativo | 32 |
| 4.4.3 Fatores comportamentais e uso de fármacos | 33 |
| 4.4.4 Fatores nutricionais | 35 |
| 4.4.4.1 Estado nutricional | 35 |
| 4.4.4.2 Dieta | 35 |
| 4.4.5 Fatores genéticos..... | 38 |
| 4.5 Atividade da paraoxonase na infância..... | 38 |
| 5 Materiais e métodos | 41 |
| 5.1 Delineamento | 41 |
| 5.2 População em estudo..... | 41 |
| 5.3 Amostra | 41 |
| 5.3.1 Critérios de inclusão e exclusão..... | 41 |
| 5.3.2 Cálculo do tamanho amostral..... | 41 |
| 5.4 Logística e Caracterização do local..... | 42 |
| 5.5 Definição do desfecho..... | 43 |
| 5.5.1 Atividade arilesterase da PON1 | 43 |
| 5.6 Definição das variáveis de exposição | 44 |
| 5.6.1 Polimorfismo genético -107C/T da enzima PON1 | 44 |
| 5.6.2 Antropometria..... | 45 |
| 5.6.3 Determinação dos níveis séricos dos lipídeos..... | 46 |
| 5.6.4 Consumo alimentar | 47 |
| 5.7 Instrumentos..... | 47 |
| 5.8 Seleção e treinamento dos entrevistadores | 48 |
| 5.9 Estudo piloto..... | 48 |
| 5.10 Controle de qualidade | 48 |
| 5.11 Análise dos dados | 49 |
| 5.12 Aspectos éticos | 49 |
| 5.13 Orçamento..... | 50 |
| 5.14 Divulgação de resultados | 50 |
| 6 Cronograma de execução | 51 |
| Referências | 52 |
| Apêndices..... | 111 |
| Anexos | 119 |

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a doença cardiovascular (DCV) é a principal causa de morte no mundo, perfazendo 30% das mortes globais, taxa semelhante à encontrada no Brasil (WHO, 2011; SBC, 2007). As DCV têm como características a presença da aterosclerose, acúmulo de placas de gorduras nas artérias que impede a passagem do sangue, e a elevada associação a comprovados fatores de risco, como a obesidade e as dislipidemias (SBC, 2007). Estudos recentes indicam que as lesões endoteliais podem desenvolver-se na fase fetal e em fases precoces da vida, contribuindo para a precocidade dos eventos mórbidos (NAPOLI et al., 2012). Evidências epidemiológicas indicam que as manifestações clínicas das DCV, como infartos, aumentaram entre os adultos na faixa etária entre 20 e 40 anos e mostram grande relação com a obesidade (WHO, 2011).

A obesidade é uma doença crônica que está intimamente relacionada ao surgimento de lesões endoteliais e a progressão do processo aterogênico (KELISHADI, 2010). A doença tem etiologia multifatorial e resulta de um balanço energético positivo. Seu desenvolvimento ocorre, na maioria dos casos, pela associação entre fatores genéticos, ambientais e comportamentais. A herança genética na determinação da obesidade parece ser de natureza poligênica, ou seja, as características fenotípicas do indivíduo obeso são resultantes da interação de vários genes (SBP, 2012).

Um dos períodos críticos para o desenvolvimento da obesidade é a infância. O aumento da prevalência do excesso de peso nessa fase é preocupante devido sua associação a complicações metabólicas, cardiovasculares, pulmonares, ortopédicas, psicológicas e algumas formas de câncer. Um ponto relevante da prevalência de gordura corporal excessiva na infância refere-se à precocidade com que podem surgir efeitos danosos à saúde, além das relações existentes entre obesidade infantil e sua persistência até a vida adulta (SBP, 2012).

Em relação à obesidade na infância, de acordo com a Pesquisa de Orçamento Familiar (POF), realizada entre 2008 e 2009 pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), uma em cada três crianças com idade entre 5 e 9 anos está com peso acima do recomendado pela OMS. Para essa faixa etária, estudos nacionais demonstram prevalências de excesso de peso que variam entre 10,8% e 33,8%, em

diferentes regiões do Brasil (SBP, 2012). Schuch e colaboradores (2013) estudando a prevalência de excesso de peso em crianças de 4 a 6 anos, matriculadas em escolas públicas do Rio Grande do Sul (RS) e Santa Catarina (SC), encontraram uma prevalência de obesidade infantil de 14,4% no RS e de 7,5% em SC.

Ainda quanto à relação entre obesidade e o processo aterogênico tem-se que o agravo da disfunção endotelial está fortemente relacionado ao aumento do fluxo endotelial de mediadores inflamatórios provenientes do tecido adiposo, em especial do tecido adiposo visceral, e aos distúrbios no metabolismo das lipoproteínas plasmáticas (AGGOUN, 2007). Deve-se considerar que os primeiros estágios da aterosclerose, as estrias gordurosas, podem ter início na vida intrauterina ou nos primeiros anos de vida da criança (CARVALHO et al., 2007; REGO; CHIARA, 2006).

Mesmo na infância, a progressão das lesões endoteliais está na dependência de fatores de risco e de suas inter-relações (KELISHADI, 2010). O excesso de tecido adiposo, e o subsequente aumento da gordura visceral, verificados na obesidade, desencadeiam resistência insulínica, com amplos efeitos negativos sobre o metabolismo glicídico e lipídico, culminando na aceleração do processo aterosclerótico.

Também estão intimamente associadas às DCV a elevação dos níveis séricos de colesterol total (CT), triglicerídeos (TG) e da fração das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), além de uma redução na fração das lipoproteínas de alta densidade (HDL) (SPEDM, 2009). Nesta situação, níveis de colesterol LDL, composto predominantemente por apolipoproteína B (apoB), estão aumentados quando comparados a níveis de HDL, cujo principal componente antiaterogênico é a apolipoproteína A (apoA-I) (KONTUSH AND CHAPMAN, 2006). Assim, uma baixa concentração de HDL circulante é um fator de risco independente para doença arterial coronariana com consequente aumento de eventos mórbidos como acidente vascular cerebral e infarto agudo no miocárdio (SBC, 2007). Por outro lado, uma alta concentração de HDL protege contra o surgimento e o avanço das lesões endoteliais, com efeito antioxidante, anti-inflamatório e antiaterogênico (SCHRADER; RIMBACH, 2011).

Uma das enzimas que contribui significativamente com a propriedade antiaterogênica atribuída ao HDL é a paraoxonase-1 (PON1) (SCHRADER; RIMBACH,

2011). A PON1 é uma enzima antioxidante que circula no plasma exclusivamente ligada ao HDL, contribuindo com suas propriedades anti-inflamatórias e antiaterogênicas ao prevenir o aumento da quantidade de espécies reativas de oxigênio (ERO), hidrolisar os peróxidos lipídicos, diminuir a suscetibilidade do HDL à peroxidação e aumentar o efluxo de colesterol a partir de macrófagos. Quando a atividade da PON1 está reduzida foi verificado aumento do risco de DCV (DURRINGTON; MACKNESS; MACKNESS, 2001). A atividade sérica da PON1 varia entre indivíduos e é influenciada por diversos parâmetros, incluindo fatores genéticos, nutricionais, estilo de vida, idade, uso de fármacos, estado de saúde e estresse oxidativo (SCHRADER; RIMBACH, 2011).

Dentre as alterações genéticas que influenciam a atividade da enzima, o polimorfismo genético caracterizado na região promotora -107 exerce efeitos extremamente significativos. Indivíduos portadores do alelo -107C apresentam níveis de PON1 até duas vezes mais elevados que aqueles observados nos portadores do alelo -107T (BROPHY et al., 2001).

Em relação à idade, há evidências de que os níveis da PON1 em recém-nascidos são mais baixos quando comparados a adultos. Entretanto, a atividade da enzima em crianças aumenta conforme o avanço da idade, estabilizando ao redor dos dois anos e alcançando um platô em torno dos 7 anos, quando observam-se níveis semelhantes aos de adultos (HUEN et al., 2009).

Hoje está claro que diferentes padrões dietéticos modulam o processo aterosclerótico, fatores de risco cardiovasculares e fatores protetores, a exemplo da atividade da PON1 (SANTOS et al., 2013). Estudos em humanos mostraram que dietas ricas em ácidos graxos mono e poli-insaturados aumentaram a atividade pós-prandial da PON1. O contrário ocorreu quando foi utilizada uma dieta rica em gordura saturada. Os alimentos ricos em polifenóis estiveram associados de maneira positiva a PON1, aumentando significativamente seus níveis (SCHRADER; RIMBACH, 2011). Além disso, estudos indicam que, mesmo na presença de polimorfismos genéticos implicados em menor expressão da enzima, alguns fatores dietéticos, a exemplo dos antioxidantes, podem estimular a atividade enzimática da PON1 (PRÉCOURT et al., 2011).

Embora os fatores dietéticos sejam alvo de inúmeras pesquisas em relação a seu papel protetor na redução de lesões endoteliais e de DCV, nenhum artigo revisado

investigou a associação da atividade da PON1 com aspectos da alimentação e o estado nutricional na infância, sendo este um dos aspectos motivadores deste estudo.

1.1 Justificativa

Um terço das crianças brasileiras apresenta excesso de peso. A obesidade infantil está geralmente ligada ao consumo de marcadores de alimentação não saudável, e a relação entre estes dois fatores pode explicar a alta prevalência de dislipidemia nesta população (SBP, 2012).

Sabe-se que as alterações metabólicas ligadas à DCV ocorrem ainda na infância, principalmente em decorrência dos fatores mencionados. Apesar disto, esta faixa etária encontra-se relativamente livre de potenciais fatores de confusão para avaliação da ação da PON1, como influência hormonal, tabagismo e consumo de álcool. No entanto, dados sobre a associação entre a atividade da PON1 e obesidade em crianças são limitados e divergentes (SUMEGOVÁ et al., 2007; KRZYTEK-KORPACKA; PATRYN; HOTOWY, 2013; KONCSOS et al., 2010; RUPÉREZ et al. 2013; GRACÉS et al., 2007).

A frequência do polimorfismo genético na região promotora -107 ainda não é conhecida na população infantil brasileira. Até o momento, dados sobre a atividade da PON1 em crianças do Brasil e sua associação a fatores de risco para DCV também são escassos. Ainda que a má qualidade da alimentação seja amplamente aceita como principal contribuinte para o desenvolvimento da obesidade em crianças, e que a dieta seja alvo de pesquisa em relação a seu papel protetor na DCV, não há registro de estudo que tenha associado a qualidade da alimentação infantil à atividade da PON1.

Mediante os dados resultantes desta pesquisa será possível identificar alterações em fatores genéticos, suas relações com o estado nutricional, bem como o impacto destes na atividade da PON1. Os resultados poderão beneficiar a população infantil, propiciando uma conduta nutricional direcionada a fim de protegê-la do dano endotelial e da doença aterosclerótica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a atividade da PON1 e sua associação a polimorfismos genéticos, fatores bioquímicos e nutricionais em crianças de 5 a 8 anos de idade atendidas no Ambulatório de Pediatria da Faculdade de Medicina/UFPEL.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a população estudada no que diz respeito a:
 - a) estado nutricional;
 - b) consumo alimentar;
 - c) atividade arilesterase da paraoxonase-1;
 - d) frequência do polimorfismo genético da PON1 na região -107;
 - e) perfil lipídico;
- Descrever as associações entre a atividade da PON1, polimorfismo genético, perfil lipídico, estado nutricional e consumo alimentar entre a população.

3 HIPÓTESES

- A prevalência de excesso de peso será de 30%;
- A maior parte das crianças terá consumido marcadores de dieta de menor qualidade (batata frita, hambúrguer, biscoitos, refrigerante) pelo menos 3 dias na última semana;
- A média da atividade arilesterase da PON1 será de 120 kU/L;
- A frequência do polimorfismo genético será igual para ambos os alelos (0,5);
- A prevalência de dislipidemia será de 25%;
- A média da atividade arilesterase dos portadores do genótipo -107 CC será significativamente maior do que a média dos portadores do genótipo -107 TT;
- A atividade arilesterase da PON1 será maior nas crianças:
 - a) com peso adequado para estatura e idade;
 - b) com melhor qualidade da dieta;
 - c) que apresentem genótipo -107 CC;
 - d) que tenham níveis de HDL elevados.
- Uma menor atividade arilesterase da PON1 será verificada nas crianças:
 - a) com obesidade central;
 - b) com excesso de peso;
 - c) que consumam dieta de menor qualidade;
 - d) que apresentem genótipo -107 TT;
 - e) que apresentem dislipidemia.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica foi realizada através das bases de dados PubMed, Bireme, Lilacs, Scielo. A busca foi realizada utilizando-se como descritores “paraoxonase”, “PON1”, “children” e “obesity”, “polymorphism -107” e “diet”, e suas respectivas traduções para a língua portuguesa. Não houve restrição ao ano de publicação. Primeiramente, os artigos foram selecionados através de seus títulos e, posteriormente, através da leitura de seus resumos. Os artigos dos quais os resumos atendiam as necessidades da pesquisa foram lidos na íntegra e selecionados para comporem a revisão de literatura.

4.1 Impacto da obesidade na função cardiovascular

A aterosclerose representa o processo patológico que tipicamente precede a formação de placas nas paredes arteriais íntima e média. Tais placas são resultado de um acúmulo progressivo de colesterol e de diversos lipídeos nas suas formas nativas e oxidadas, material de matriz extracelular e células inflamatórias. A dislipidemia está intimamente associada à aterosclerose prematura e corresponde a um desequilíbrio entre fatores pró e antiaterogênicos (KONTUSH; CHAPMAN, 2006).

A obesidade está relacionada a distúrbios no metabolismo da glicose, resistência insulínica e disfunção endotelial. Com isso, é importante destacar a associação entre obesidade central e síndrome metabólica como fator de risco cardiovascular. As citocinas secretadas pelos adipócitos, como a interleucina 6 (IL-6), o fator de necrose tumoral (TNF α) e o inibidor do ativador de plasminogênio 1 atuam de maneira importante na atividade inflamatória vascular, predispondo à formação de estrias e placas ateromatosas (AGGOUN, 2007).

Estes produtos liberados principalmente pelo tecido adiposo visceral, ácidos graxos livres e seus metabólitos, entram na circulação portal e banham o fígado, desencadeando respostas que ativam componentes da via inflamatória como o fator nuclear kappa-B (NFKappaB), inibindo a sinalização da insulina. Outro fato importante é que o tecido adiposo visceral possivelmente seja mais insulinoresistente que o subcutâneo por, dentre outros fatores, ser menos vascularizado (SPEDM, 2009).

A resistência insulínica, uma condição patológica na qual a ação da insulina está prejudicada, tem papel central na patogênese da síndrome metabólica (SBP, 2012). Sob o ponto de vista metabólico, esta resistência evidencia-se nas células musculares, hepáticas e adiposas. Neste caso, os níveis de insulina circulante estão frequentemente elevados, pois o pâncreas secreta mais insulina tentando compensar a resistência (RAO, 2001).

A insulina, dentre diversos outros fatores, pode afetar a regulação do metabolismo lipídico. No tecido adiposo, há diminuição da inibição da lipólise e da captação de ácidos graxos livres que, em níveis elevados, inibem a utilização periférica da glicose e aumentam a gliconeogênese hepática, contribuindo assim para a hiperglicemia e consequente resistência insulínica. A hiperinsulinemia também pode ocorrer devido a uma redução na captação de insulina pelo fígado, em resultado a uma exposição a níveis elevados de ácidos graxos (SPEDM, 2009).

Sabe-se ainda que a hiperinsulinemia e a obesidade central contribuem para uma excessiva produção hepática de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), podendo ocasionar uma redução de HDL. A resistência insulínica está ligada ao aumento de TG no fígado, o que inibe a degradação da apoB, a diminuição dos níveis de lipase lipoproteica, aumento da síntese de apolipoproteína C-II e queda na produção de apoA-I (SPEDM, 2009).

A apoB apresenta-se sob duas formas, B-48 e B-100, diferenciadas pelo peso molecular. A apoB-48, sintetizada do intestino, é constituinte dos quilomícrons (QM) e seus remanescentes. A apoB-100, sintetizada no fígado, faz parte das principais frações lipoprotéicas consideradas aterogênicas. Esta proteína representa um fator desencadeante para o processo aterogênico, pois é essencial para a ligação das partículas de LDL aos receptores celulares, permitindo sua entrada nas células (FORTI; DIAMENT, 2007).

4.2 Lipoproteína de alta densidade (HDL)

As lipoproteínas, compostas por lipídeos e proteínas, são divididas em classes, que se diferenciam pelo tamanho, densidade e pela composição tanto lipídica como apoprotéica: quilomícrons (QM), lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL),

lipoproteínas de densidade intermediária (IDL), LDL e HDL. As HDL são constituídas por 50% de apoproteínas (AI em maior quantidade), 20% de colesterol livre e esterificado, 15% de fosfolipídeos e 5% de TG (Fig. 1) (FORTI; DIAMENT, 2006).

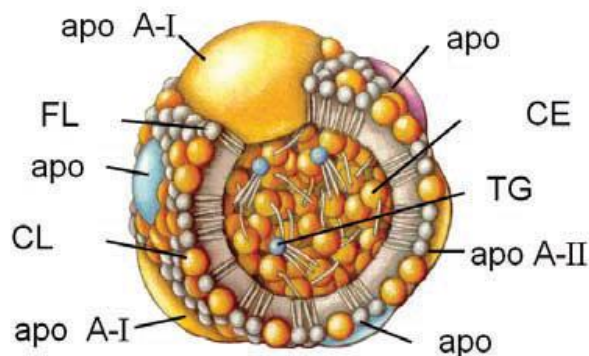


Fig. 1 - Constituição da lipoproteína de alta densidade (HDL). FL= fosfolipídeos; apo = apoproteína; CL= colesterol; CE = colesterol esterificado; TG = triglicérides.

Fonte: FORTI; DIAMENT, 2006, p. 671.

As frações podem ser identificadas em laboratório pela separação das lipoproteínas por ultracentrifugação, eletroforese e ressonância magnética nuclear. Quando fracionadas por ultracentrifugação são normalmente separadas em duas principais subfrações: HDL2 (d 1.063–1.125 g/ml) e HDL3 (d 1.125–1.21 g/ml). A separação por eletroforese resulta em cinco subpopulações distintas de tamanho decrescente: HDL2b, 2a, 3a, 3b e 3c (KONTUSH; CHAPMAN, 2006; FORTI; DIAMENT, 2006).

As apoA-I participam da formação de HDL por três vias. Primeiramente, por meio da captação de colesterol livre e fosfolipídeos das células periféricas, formando a pré- β -HDL. Sob a influência da lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT), o colesterol livre é esterificado, formando a HDL madura, esférica, rica em colesterol esterificado. Ainda sob a ação da LCAT, a HDL madura transforma-se em HDL3 (mais densa e ainda mais rica em colesterol esterificado); posteriormente, sob a ação da proteína de transferência de fosfolipídeo, adquirindo fosfolipídeos, forma-se a HDL2 (menos densa). É conveniente lembrar que, na parede arterial e no plasma, existe interconversão entre HDL2 e HDL3 (Fig.2) (FORTI; DIAMENT, 2006).

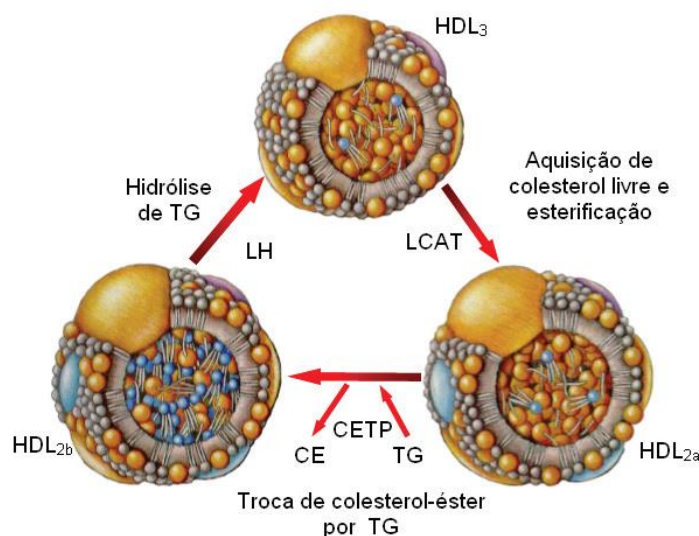


Fig. 2 - Interconversão das frações HDL2 e HDL3. HDL = lipoproteína de alta densidade; TG = triglicerídeos; LH = lipase hepática; LCAT = lecitina-colesterol aciltransferase; CETP = proteína de transferência do colesterol esterificado; CE = colesterol esterificado.

Fonte: FORTI; DIAMENT, 2006, p. 672.

A segunda via ocorre por meio da secreção, pelo fígado e intestino, de partículas discóides contendo apoA-I, fosfolípidos e colesterol livre, que são transformadas, sob a ação da LCAT, em HDL maduras. A terceira e última via acontece por meio da ação da lipase lipoprotéica sobre as lipoproteínas ricas em TG, liberando fragmentos contendo fosfolípidos, colesterol livre e pequenas apoproteínas (KONTUSH; CHAPMAN, 2006; FORTI; DIAMENT, 2006).

As partículas de HDL diferem das lipoproteínas aterogênicas apoB por sua capacidade de exercer inúmeras atividades biológicas antiaterogênicas. Especialmente por possuir apoA-I, essas partículas podem mediar o efluxo de colesterol agindo como aceptores primários e assim, facilitar o transporte reverso de colesterol da parede arterial e tecidos periféricos para o fígado. O HDL ainda protege o LDL do estresse oxidativo, tem ação anti-inflamatória nas células da parede arterial, além de possuir atividade antiapoptótica, vasodilatadora, antitrombótica e anti-infecciosa. Estas propriedades antioxidantes do HDL estão atribuídas em grande parte a presença de apolipoproteínas e enzimas associadas, principalmente a apoA-I e a PON1 (KONTUSH; CHAPMAN, 2006; DUNET et al., 2011).

4.3 Paraoxonase-1: características e funções

A paraoxonase-1 é uma esterase cálcio-dependente, sintetizada principalmente no fígado, que circula no plasma ligada ao HDL agindo como antioxidante. A enzima é membro de uma família gênica composta por três genes (PON1, PON2, PON3) localizada no cromossomo humano 7. O gene da PON1 exibe 9 exons e codifica uma proteína de 354 aminoácidos (PRIMO-PARMO et al., 1996).

A PON1 foi a primeira da família a ser descoberta em 1946, no entanto, o interesse pela enzima aumentou quando Mackness e seus colaboradores (2003) realizaram um estudo longitudinal prospectivo e revelaram que uma baixa atividade enzimática é fator de risco independente para eventos coronarianos em homens com alta predisponibilidade para DCV devido à doença preexistente ou outros fatores de risco.

A PON1 contribui com as propriedades antiaterogênicas e anti-inflamatórias do HDL prevenindo o aumento da quantidade de ERO ao hidrolisar os peróxidos lipídicos (prevenindo as partículas LDL de sofrer modificação oxidativa), diminuir a suscetibilidade do HDL à peroxidação, e aumentar o efluxo de colesterol a partir de macrófagos. Níveis reduzidos de atividade da PON1 refletem aumento do dano endotelial e, conseqüentemente, do risco de DCV (DURRINGTON; MACKNESS; MACKNESS, 2001).

A associação da PON1 com HDL, mais especificamente com a apoA-I, é um pré-requisito para a estabilidade da atividade sérica da enzima. Entretanto, a apoA-I não é necessária para a secreção e ligação da PON1 com o HDL, uma vez que a enzima também pode estar ligada à apoA-II, apoE e apoJ. O HDL é um ótimo receptor fisiológico para a PON1 em termos de estimulação da secreção enzimática e estabilização do peptídeo secretado (FORTI; DIAMENT, 2006).

O tamanho e o formato da partícula de HDL parecem ser cruciais para a ligação da PON1. *In vivo*, a enzima se apresenta preferencialmente associada a partículas grandes, porém pode estar junto a partículas pequenas e densas através de ultracentrifugação. Como consequência, as partículas de HDL são heterogêneas quanto sua atividade antioxidante, sendo maior conforme aumenta a densidade: HDL2b < HDL2a < HDL3a < HDL3b < HDL3c. Portanto, o HDL3 atua de maneira mais potente ao

proteger o LDL da oxidação *in vitro* quando comparado ao HDL2 (KONTUSH; CHANTEPIE; CHAPMAN, 2003).

Ligada ao HDL, a PON1 circula no plasma, onde exerce sua atividade enzimática com uma ampla gama de substratos. Originalmente, a enzima foi identificada por hidrolisar organofosfatos. O nome se refere à habilidade da PON1 para degradar paraoxon, o metabólito tóxico do pesticida parathion. Além desta atividade organofosfatase, a enzima exibe ainda atividade arilesterase e lactonase, de acordo com o substrato hidrolisado (DURRINGTON; MACKNESS; MACKNESS, 2001).

Os polimorfismos genéticos da enzima, em especial a mutação Q192R, afetam a eficiência catalítica dos substratos paraoxon e clorpirifós-oxon. Portanto, o uso de fenilacetato ou diazoxon como substratos fornece uma melhor indicação de níveis gerais de atividade da PON1 (COSTA et al., 2005).

A atividade sérica da PON1 é importante para a proteção dos fosfolípidos do LDL contra oxidação. A retenção do LDL na parede arterial torna esta lipoproteína um importante substrato para oxidação. Diversos sistemas oxidativos contribuem potencialmente para a oxidação do LDL *in vivo*, entre eles NAD(P)H oxidases, xantina oxidase, mieloperoxidase, óxido nítrico sintase desacoplada, lipoxigenases e também a cadeia mitocondrial de transporte de elétrons (MADAMANCHI; HAKIM; RUNGE, 2005; MUELLER et al., 2005).

Partículas de LDL oxidado (LDL-ox) exibem múltiplas propriedades aterogênicas, bem como atividades pró-inflamatórias, imunogênicas, apoptóticas e citotóxicas. As atividades pró-inflamatórias incluem ação quimiotactante nos monócitos circulantes, indução da expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, promoção da diferenciação de monócitos em macrófagos, indução da síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas de macrófagos e ainda, inibição da motilidade dos macrófagos. Como resultado, a oxidação do LDL propaga o processo inflamatório da parede arterial, acelerando a aterogênese (CHISOLM; STEINBERG, 2000).

4.4 Modulação da atividade da paraoxonase-1

A atividade sérica da PON1 difere consideravelmente entre indivíduos e populações sendo influenciada por diversos parâmetros incluindo fatores genéticos,

nutricionais, comportamentais, ambientais, idade, uso de fármacos e estado de saúde (SCHRADER; RIMBACH, 2011).

4.4.1 Inflamação

Inflamação é uma resposta corporal sistêmica com objetivo de reduzir agentes tóxicos ou nocivos e reparar dano tecidual. A inflamação crônica representa um grande fator de risco para DCV (RIDKER et al., 2004).

Um aspecto essencial da resposta inflamatória envolve a ativação de células fagocíticas que atuam na defesa do hospedeiro. Infecções locais e sistêmicas, lesões da parede arterial e retenção excessiva de LDL podem potencializar a ativação de macrófagos na parede arterial, provocando assim a produção excessiva de espécies pró-oxidantes (KONTUSH; CHAPMAN, 2006).

A atividade anti-inflamatória do HDL é ilustrada por sua capacidade de reduzir a expressão de moléculas de adesão induzida por citocinas em células endoteliais e de inibir a adesão de monócitos a estas células. Esta capacidade está relacionada à presença de apoA-I, apoA-II, apoA-IV, e de espécies moleculares distintas de fosfolípidos. A ação anti-inflamatória também envolve a hidrólise de lípidos oxidados por enzimas associadas ao HDL, especialmente a PON1 (KONTUSH; CHAPMAN, 2006).

Estas enzimas associadas podem estar depletadas ou apresentando alterações funcionais sob condições inflamatórias, em doenças metabólicas que envolvam baixos níveis de HDL e na DCV prematura, provavelmente devido à substituição de PON1 por SAA – proteína amiloide sérica A, na indução da resposta inflamatória (NAVAB et al., 1997; VAN LENTEN et al., 2001).

A SAA é uma proteína que desempenha importante função biológica durante processos inflamatórios, quando se associa ao HDL, deslocando a apoA-I. Tanto na inflamação de fase aguda quanto em processos crônicos, como no caso da aterosclerose, a SAA tem seus níveis plasmáticos permanentemente aumentados (SANDRI, 2008).

4.4.2 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre fatores pró-oxidantes e antioxidantes, onde os primeiros prevalecem. Este desequilíbrio ocorre quando há uma produção excessiva de espécies reativas de oxigênio pelos sistemas biológicos. Estas espécies que incluem radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila ($\cdot OH$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), junto a espécies reativas de nitrogênio como óxido nítrico (NO) e o radical peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$), desempenham um papel importante na biologia vascular (ROBERTS; SINDHU, 2009).

Se os sistemas antioxidantes celulares não neutralizam as ERO, elas podem reagir com macromoléculas e desencadear o processo de peroxidação lipídica, causando dano ao DNA, à proteína e alterações celulares. Este processo implica em diversos estados patogênicos, dentre eles, inflamação e aterosclerose (ROBERTS; SINDHU, 2009).

Os lipídeos e as lipoproteínas também são afetados pelas ERO. Assim, o estresse oxidativo está associado à peroxidação lipídica das lipoproteínas e das células arteriais, incluindo os macrófagos. Estes “macrófagos oxidados” possuem uma maior capacidade de converter LDL na sua forma nativa em LDL-ox. As partículas pequenas e densas de LDL são mais sensíveis à oxidação quando compradas às partículas maiores (FUHRMAN; VOLKOVA; AVIRAM, 2002).

O mecanismo provável pelo qual a PON1 protege as lipoproteínas e a célula arterial da oxidação é a hidrólise de peróxidos lipídicos, como ésteres de colesterol oxidados específicos e fosfolipídeos (Fig. 3) (AŞKAR; BÜYÜKLEBLEBICI, 2012).

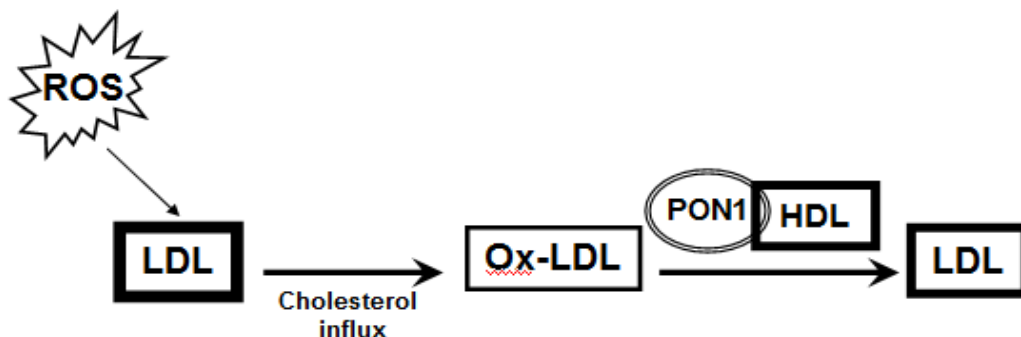


Fig 3. Papel da PON1 associada ao HDL na oxidação do LDL.

Fonte: AŞKAR; BÜYÜKLEBLEBICI, 2012, p.151.

A PON1 mostrou-se eficiente em utilizar não só peróxidos lipídicos, como também H_2O_2 . Por estas propriedades, pode-se dizer que esta enzima tem atividade semelhante à peroxidase (AVIRAM et al., 1998).

4.4.3 Fatores comportamentais e uso de fármacos

Diversos fatores comportamentais como tabagismo, consumo de álcool e a prática de atividade física vêm sendo associados a modificações nos níveis séricos de PON1.

O tabagismo é um potente fator de risco modificável que demonstra o maior impacto na DCV. Tanto o uso do tabaco quanto a fumaça do cigarro levam ao estresse oxidativo induzindo à inflamação sistêmica e disfunção endotelial. Estudos comprovam que o fumo reduz significativamente a atividade da enzima (RAINWATER et al., 2009; JAMES; LEVIEV; RIGHETTI, 2000; THYAGARAJAN et al., 2008; SENTI et al., 2003).

Em relação ao consumo moderado de álcool, as evidências de que este exerce um papel protetor na DCV acarretam a necessidade de estudos sobre a possibilidade de seu efeito na modulação da PON1. Doses moderadas de bebida alcoólica, em especial o vinho tinto, elevam a atividade plasmática da enzima. Isto pode ser atribuído em parte ao aumento concomitante do HDL, uma vez que ambos estão intimamente relacionados. Por outro lado, o consumo excessivo de álcool mostra efeitos opostos, reduzindo significativamente os níveis de PON1 comparados aos de indivíduos que não bebem (RAO et al., 2003).

A prática regular de atividade física tem efeitos positivos sobre o sistema cardiovascular. Ela induz a perda de excesso de peso, aumenta a sensibilidade à insulina, diminui a concentração de fibrinogênio no plasma e também a pressão sanguínea. Seu papel na melhoria do perfil lipídico sérico aparece principalmente pelo aumento do HDL e uma diminuição nas taxas de VLDL e TG. Apesar desta constatação, dados sobre o papel da atividade física na modulação da PON1 ainda são contraditórios. A maioria dos autores mostra que indivíduos fisicamente ativos têm níveis mais elevados de PON1 quando comparados àqueles que são sedentários (SENTI et al., 2003).

Um possível mecanismo do impacto da atividade física regular sobre nível de atividade da PON1 seria a estimulação dos sistemas antioxidantes endógenos, resultando na redução do estresse oxidativo. Exercícios aeróbicos diários exercem outros efeitos benéficos sobre o endotélio vascular que têm impacto favorável na biodisponibilidade do óxido nítrico, reduzindo a trombogenicidade, e a inflamação (OTOCKA-KMIECIK; ORŁOWSKA-MAJDAK, 2009).

O contrário pode ser notado em indivíduos que praticam exercícios de alta intensidade. Ao realizar exercício extenuante, o consumo de oxigênio em humanos aumenta em até 20 vezes. Além de fornecer energia para os músculos em trabalho, ERO são gerados de forma excessiva. Isto pode aumentar o estresse oxidativo, expondo o endotélio aos efeitos negativos destas substâncias (OTOCKA-KMIECIK; ORŁOWSKA-MAJDAK, 2009).

Muitos estudos investigando a modulação da PON1 envolvem também fármacos, particularmente aqueles capazes de alterar o metabolismo das lipoproteínas, utilizados para tratamento dos níveis elevados de colesterol plasmático, como estatinas e fibratos. Os metabólitos da atorvastatina e do genfibrozil têm ação antioxidante contra a peroxidação das lipoproteínas, portanto eles preservariam a atividade da PON1 (OTOCKA-KMIECIK; ORŁOWSKA-MAJDAK, 2009).

Os resultados sobre o impacto do uso destes medicamentos na regulação da PON1 são contraditórios. A maioria dos estudos comprova que as estatinas têm efeitos indiretos benéficos tanto através da ação redutora do colesterol quanto pela diminuição do estresse oxidativo. Esta diminuição seria a causa mais provável da ligação das estatinas com o aumento da atividade da PON1 (PRÉCOURT et al., 2011). Já alguns estudos em animais e *in vitro* forneceram resultados contrastantes, onde as estatinas reduziram a atividade da PON1 (GOUEDARD et al., 2003).

Achados importantes revelam ainda que os polimorfismos genéticos teriam influência sobre a ação destes fármacos. Deakin, Guernier e James (2007) mostraram que pacientes hipercolesterolêmicos homozigotos para o alelo C na posição -107 respondem ao tratamento com sinvastatina, ao contrário daqueles homozigotos para o alelo T.

Outros fármacos utilizados no tratamento e prevenção das DCV tiveram seus efeitos avaliados. A aspirina elevou significativamente os níveis da PON1, possivelmente por seu efeito anti-inflamatório. O orlistat, usado no combate à obesidade e melhora do perfil lipídico, também mostrou influência benéfica na atividade da PON1 (BLATTER-GARIN et al., 2003; AUDIKOVSKY et al., 2001).

4.4.4 Fatores nutricionais

4.4.4.1 Estado nutricional

Atualmente está bem demonstrado que a obesidade é um preditor independente de risco cardiovascular e mortalidade. Ferreti e seus colaboradores (2005), em estudo de caso-controle, verificaram que o valor médio da atividade da PON1 isolada a partir de plasma de mulheres obesas foi cerca de 4 vezes menor do que o valor encontrado entre o grupo controle, formado por mulheres com Índice de Massa Corporal (IMC) normal. Uma correlação negativa significativa foi estabelecida entre atividade da PON e IMC em pacientes obesos sugerindo que os indivíduos com maior IMC têm uma menor atividade enzimática.

Uma recente revisão sobre a relação da atividade sérica desta enzima com a obesidade, publicada por Kota e colegas (2013), leva a concluir que a obesidade está associada a uma redução de 50-60% na atividade da PON1, acompanhada por queda significativa dos níveis de HDL e aumento de LDL, refletindo um maior potencial aterosclerótico.

Apesar destes resultados, um estudo de caso-controle em uma população mexicana avaliando a atividade da enzima em um grupo de peso normal e outro de obesos, constatou que não houve diferença entre as atividades da PON1 nos dois grupos de estudo (MARTÍNEZ-SALAZAR et al., 2011).

4.4.4.2 Dieta

Hoje está claro que diferentes padrões dietéticos modulam alguns aspectos do processo aterosclerótico e fatores de risco cardiovasculares, como níveis lipídicos no plasma, resistência à insulina e metabolismo glicídico, pressão arterial, fenômenos

oxidativos, função endotelial e inflamação vascular (SANTOS et al., 2013). Consequentemente, alterações na atividade sérica da PON1 têm sido relatadas de acordo com o consumo de certos nutrientes, o que levanta a hipótese de uma possível modulação dietética dessa enzima.

A atividade da PON1 é modificada especialmente pelo consumo de ácidos graxos, sendo gorduras mono e poli-insaturadas as maiores responsáveis pelo aumento da atividade enzimática. Quatro grupos de ratos foram alimentados com dieta controle, dieta suplementada com trioleína, com tripalmitina ou com óleo de peixe. A dieta com trioleína aumentou significativamente a atividade da PON1, enquanto que aquela com óleo de peixe causou uma diminuição significativa na atividade enzimática. A dieta enriquecida em tripalmitina teve efeito similar à do grupo controle (KUDCHODKAR et al., 2000).

Segundo estudo de revisão sobre os determinantes dos níveis da PON1, estudos em humanos mostraram que dietas adicionadas de azeite de oliva ou ricas em ácidos graxos mono e poli-insaturados aumentaram a atividade pós-prandial da enzima. O contrário ocorreu quando utilizada uma dieta rica em gordura saturada, confirmando que o consumo de gordura saturada e *trans* está relacionado à elevação do LDL e aumento de risco cardiovascular (SCHRADER; RIMBACH, 2011).

Em uma intervenção com 32 voluntários, de Roos (2002) verificou que substituir a gordura saturada por gordura *trans* na dieta de pessoas saudáveis resultou em diminuição do HDL e da atividade da PON1. A atividade da enzima foi maior ao fim de 4 semanas de consumo de uma dieta com 22,9% de energia proveniente de gordura saturada quando comparada a uma dieta onde 9,3% da energia de gorduras saturadas foi substituída por gordura hidrogenada.

Refeições ricas em óleo de cozinha reutilizado, simulando alimentos servidos em restaurantes de *fast food*, induziram uma diminuição na atividade pós-prandial da PON1 em homens após 4 horas. Este efeito durou até 8 horas após a refeição ter sido realizada (SUTHERLAND et al., 1999).

A baixa incidência de doenças cardiovasculares em países banhados pela bacia do Mediterrâneo, onde o azeite de oliva é a principal fonte de gordura da dieta, motivou outro estudo de revisão que sugere por evidências acumuladas que o HDL e a apoA-I,

podem ser aumentados pelo consumo de azeite de oliva virgem (M LOU-BONAFONTE et al., 2012).

A composição lipídica da dieta modula muitos constituintes das lipoproteínas e desta maneira influencia de modo considerável os níveis de PON1. Enquanto a dieta aterogênica pode não afetar diretamente a enzima, isto pode ocorrer indiretamente por meio de estresse oxidativo, o que reduz os transportadores da PON1.

O impacto dos alimentos e de suas propriedades antioxidantes na modulação enzimática também foi estudado. Vários estudos em animais e humanos examinaram os efeitos da vitamina C (ácido ascórbico) e vitamina E (α -tocoferol) indicando efeito protetor na atividade da paraoxonase, especialmente em relação à vitamina C. Estas observações poderiam ser explicadas por uma melhora na defesa antioxidativa, resultando na proteção da PON1. (COSTA; GIORDANO; FURLONG, 2011; SCHRADER; RIMBACH, 2011). Dentre os alimentos ricos em compostos antioxidantes, a romã foi o que se associou de maneira mais positiva com a enzima (SCHRADER; RIMBACH, 2011).

Mesmo que grandes estudos epidemiológicos tenham demonstrado repetidamente que pessoas com dietas ricas em frutas e vegetais reduziram o risco cardiovascular, Kleemola e colegas (2002) concluíram que a atividade da PON1 foi negativamente correlacionada com o consumo de vegetais, fibras solúveis e betacaroteno. Corroborando com este achado, Rantala e colaboradores (2002) administraram para um grupo de mulheres por cinco semanas uma dieta rica em vegetais e, após três semanas de intervalo, introduziram outra pobre em vegetais pelo mesmo período. No outro grupo a ordem das dietas foi invertida. Ao avaliar a diferença entre o efeito de ambas, os autores verificaram que houve redução da atividade enzimática após o consumo da dieta rica em vegetais. Entretanto, a variação genética parece ter um impacto sobre a resposta a uma dieta rica em vegetais, já que a redução na atividade da PON1 foi mais importante em mulheres que carregam o genótipo 192R e 55L.

4.4.5 Fatores genéticos

Há poucas informações na literatura sobre a regulação da expressão do gene PON1. Mais de 160 polimorfismos já foram descritos neste gene, alguns em regiões codificantes, outros em introns ou ainda em regiões reguladoras, necessitando serem mais adequadamente caracterizados. Amplamente investigados e descritos na literatura estão dois polimorfismos comuns na região codificante do gene, com substituição dos aminoácidos Glutamina (Q) por Arginina (R) na posição 192 e de Leucina (L) por Metionina (M) na posição 55. (COSTA et al., 2005).

Estudos de genotipagem da PON1 realizados em uma população saudável estabeleceram que os polimorfismos são frequentes e têm um forte impacto na expressão gênica e nas concentrações séricas da enzima, em especial aquele encontrado na região promotora -107. Este polimorfismo contribui em até 25% das variações na expressão da PON1 em adultos de raça branca e o alelo -107C proporciona níveis de PON1 até duas vezes mais elevados que aqueles observados com o alelo -107T. A distribuição da frequência deste polimorfismo é aproximadamente igual (0.5) para ambos os alelos na população. Outros polimorfismos nas regiões promotoras -162 e -909 podem ter efeitos menos significativos sobre a expressão gênica e estão em forte desequilíbrio com o polimorfismo na região -107 (HUEN et al., 2010; HOLLAND et al., 2006; JAMES et al., 2000; BROPHY et al., 2001).

Apesar desta constatação, os resultados referentes ao polimorfismo na posição -107 são contraditórios. Najafi, Gohari e Firoozrai (2009) encontraram que os portadores do alelo -107C apresentam um risco elevado de DCV ao passo que Campo e colaboradores (2004) relataram um risco aumentado para portadores da variante -107T.

4.5 Atividade da paraoxonase na infância

A PON1 está intimamente relacionada à inibição de processos oxidativos. Esta descoberta indica que a determinação da atividade da enzima pode ser benéfica para crianças expostas a fatores de risco para DCV, a fim de protegê-las da aterosclerose no futuro (SUMEGOVÁ et al., 2007).

Há evidências que os níveis da PON1 em recém-nascidos são mais baixos quando comparados a adultos e que a atividade da enzima em crianças aumenta

conforme o avanço da idade. Em estudo que acompanhou nove crianças longitudinalmente, os níveis da enzima atingiram o platô, comparáveis com a média de adultos, entre 6 e 24 meses de idade (COLE et al., 2003). Huen et al. (2007, 2009) porém afirmam que a atividade da PON1 continua a aumentar após os 2 anos de idade tendendo a assemelhar-se aos níveis na vida adulta aos 7 anos de idade. Além disso, os polimorfismos da PON1 modificam o efeito da idade na atividade da enzima.

Em relação aos fatores genéticos, alguns estudos desenvolvidos em populações infanto-juvenis do continente europeu e da região do Vale do Salinas nos Estados Unidos objetivaram genotipar e identificar a frequência de polimorfismos genéticos. Além disso, buscaram descrever a atividade da PON1 e associar esta atividade aos polimorfismos, idade, estado nutricional e marcadores bioquímicos (HUEN et al., 2009, 2010, 2013; HOLLAND et al., 2006; GARCES et al., 2007, 2008; SUMEGOVÁ et al., 2007; KONCSOS et al., 2010; KARIKAS et al., 2006; RUPÉREZ et al., 2013; KRZYTEK-KORPACKA; PATRYN; HOTOWY, 2013). Os autores mostram que a frequência para o polimorfismo na região promotora -107 foi muito semelhante para ambos os alelos. A atividade arilesterase da PON1 foi significativamente maior nos portadores do genótipo -107 CC do que naqueles portadores do alelo T (HUEN et al., 2009, 2010; HOLLAND et al., 2006).

Já dados sobre a relação entre PON1 e obesidade, especialmente em crianças, são divergentes. Sumegová et al. (2007) não comprovaram relação direta entre a atividade enzimática e o excesso de peso, porém mostraram que o aumento do IMC é um fator de risco para a redução da capacidade antioxidante total e, estaria ligado ao dano oxidativo e consequente desenvolvimento de doenças associadas. Já Krzystek-Korpacka, Patryn e Hotowy (2013), estudando crianças polonesas, verificaram que a redução da atividade da PON1 esteve mais associada à obesidade central do que a obesidade diagnosticada por IMC elevado. Koncsos e colaboradores (2010) também encontraram uma redução significativa da atividade da enzima em crianças obesas quando comparadas às que tinham peso normal.

Em recente pesquisa, Rupérez et al. (2013) conduziram um estudo de caso-controle investigando diferentes atividades da PON1 e polimorfismos genéticos correlacionando esses dados com obesidade infantil e marcadores plasmáticos em uma

população pré-púbere da Espanha. Nenhuma das atividades da PON1 diferiu significativamente entre as crianças obesas e aquelas com peso normal. Apenas o polimorfismo rs854566 sugeriu um papel protetor em respeito à obesidade.

Por outro lado, o estudo das Quarto Províncias, que analisa fatores de risco para DCV em crianças, coletou dados de mais de 1200 crianças espanholas entre 6 e 8 anos com altos níveis de HDL e verificou que a atividade da PON1 era significativamente mais elevada em obesos do que na população pré-púbere com peso normal (GARCÉS et al., 2007).

Apesar da íntima relação da PON1 com HDL, estudos que investigaram esses dados na população infantil não encontraram associações significativas entre atividade da enzima e níveis séricos de lipídeos (GARCÉS et al., 2008; SUMEGOVÁ et al., 2007). Entretanto, Rupérez et al. (2013) ao realizarem estudo caso-controle com um grupo de crianças obesas e outro com peso normal, mostraram que colesterol total, HDL e apoA-I estavam significativamente correlacionados de maneira positiva à atividade arilesterase da PON1.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Delineamento

O presente estudo terá um delineamento transversal.

5.2 População em estudo

A população do estudo será composta por crianças de 5 a 8 anos de idade, atendidas no Ambulatório de Pediatria da Faculdade de Medicina/UFPEL, na cidade de Pelotas – RS, no período de Janeiro a Junho de 2014.

5.3 Amostra

A amostra será composta por crianças de 5 a 7 anos de idade, atendidas no Ambulatório de Pediatria da Faculdade de Medicina/UFPEL, que atenderem aos critérios de inclusão no período da coleta de dados, conforme cálculo amostral.

5.3.1 Critérios de inclusão e exclusão

Serão incluídas no estudo crianças de 5 a 8 anos incompletos, de ambos os sexos, independente do estado nutricional, atendidas no Ambulatório de Pediatria da Faculdade de Medicina/UFPEL, no período de Janeiro a Junho de 2014.

Serão excluídas do estudo aquelas que apresentarem diagnóstico médico de doenças hepáticas, paralisia cerebral, displasia óssea ou neoplasias. Também serão excluídas as crianças portadoras de necessidades especiais (físicas ou motoras) e alterações genéticas, como Síndrome de Down e talassemia.

5.3.2 Cálculo do tamanho amostral

O cálculo do tamanho da amostra partiu da revisão de literatura e foi realizado no programa aberto online de estatísticas epidemiológicas OpenEpi - Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, versão 3.01. Considerou-se um nível de confiança de 95% e o cálculo amostral foi realizado individualmente para cada variável de interesse, conforme dados fornecidos pela revisão, por diferença de média entre os grupos (Fig. 4). Além disso, foram acrescentados 10% para eventuais perdas e recusas

e 15% para controlar fatores de confusão. Desta forma, para obtenção de poder amostral de 80% foi estimada a necessidade de inclusão de 84 pacientes no estudo.

| Variável/ Exposição | Atividade arilesterase da PON1 | | Relação Não exposto/ exposto | N | n ^a |
|------------------------|-----------------------------------|------------------------|------------------------------------|----|----------------|
| | Exposto | Não exposto | | | |
| Polimorfismo | TT 103,3 ± 23,7 | CC 138,5 ± 30,3 | 1,5 28,3%/18,4% | 20 | 26 |
| Obesidade | Obeso 136,1 ± 24,9 | Normal 159,2 ± 33 | 1,75 82/47 | 53 | 68 |
| Sexo | Masculino 77,3 ± 2,3 | Feminino 85,8 ± 3,7 | 0,75 27/36 | 4 | 6 |
| Obesidade central | Sim 135,2 ± 28,9 | Não 157,6 ± 32,8 | 2 104/52 | 66 | 84 |

^a Número total de crianças incluindo 10% para perdas e recusas e 15% para controle de fatores de confusão.

Figura 4 - Cálculo do tamanho de amostra para as diversas exposições.

5.4 Logística e caracterização do local

O estudo será desenvolvido no Ambulatório de Pediatria vinculado a Faculdade de Medicina/UFPEL, localizado no bairro Fragata, na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul. O Ambulatório de Pediatria é parte integrante do Ambulatório Central da faculdade, que atende também diversas outras especialidades como cardiologia, cardiologia infantil, cirurgia, clínica geral, endocrinologia, nefrologia, oncologia, além de ser referência no atendimento de AIDS.

O Ambulatório de Pediatria realiza atendimentos diariamente em dois turnos, de segunda a sexta-feira, com uma média de 35 atendimentos por dia.

Toda criança encaminhada ao Ambulatório de Pediatria no período da coleta de dados, será avaliada quanto aos critérios de inclusão e exclusão. Após esta triagem, os responsáveis devidamente esclarecidos e que autorizarem a participação das crianças no estudo, deverão assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Apêndice A). Em seguida, os responsáveis responderão a questionários contendo informações relativas a dados sociodemográficos, de saúde, comportamento (Apêndice B) e consumo alimentar da criança (Anexo A). Algumas informações contidas nos

questionários poderão ser utilizadas para ajustes posteriores nas análises. Dados não contemplados na entrevista serão coletados diretamente no prontuário.

Nesta mesma ocasião, serão realizadas medidas antropométricas e solicitada a coleta de sangue em laboratório de análises clínicas. A amostra sanguínea coletada no laboratório será analisada para determinação das variáveis bioquímicas de exposição, sendo o soro preservado a fim de analisar a atividade arilesterase da PON1. O material também será utilizado para extração do DNA genômico e identificação do polimorfismo genético. A análise da atividade enzimática e a pesquisa do polimorfismo genético serão feitas no Laboratório de Nutrição Experimental da Faculdade de Nutrição/UFPEL.

O recrutamento e fluxograma de coleta de dados estão caracterizados na Fig. 5.

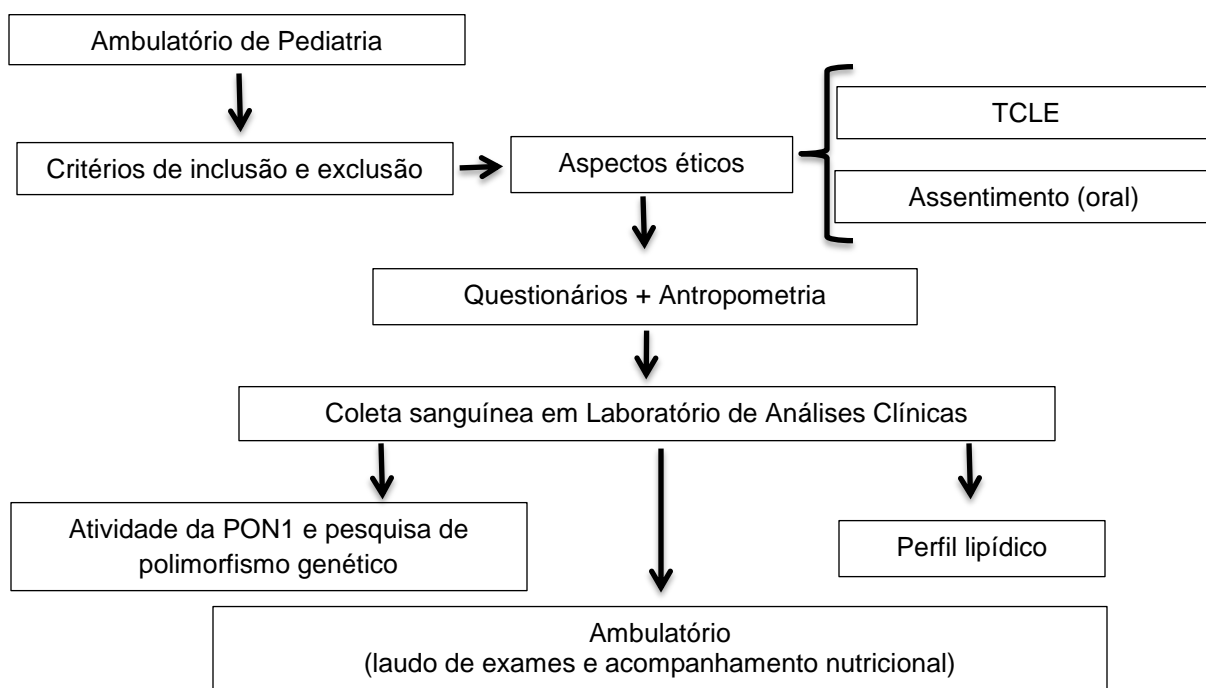


Figura 5 - Recrutamento e fluxograma de coleta de dados.

5.5 Definição do desfecho

5.5.1 Atividade arilesterase da PON1

O soro obtido será mantido a -20°C até a análise. A atividade arilesterase da PON-1 será medida a partir da velocidade de formação de fenol através do aumento da absorbância a 270nm, temperatura de 25°C , em espectrofotômetro. As amostras serão

diluídas 1:3 em 20mM de Tampão Tris/HCl, pH 8,0, contendo 1mM de CaCl_2 . A solução reagente será de tampão Tris/HCl, pH 8,0, contendo 1mM de CaCl_2 , a qual será adicionado 1mM de fenilacetato. A reação será determinada após 20 segundos de retenção e a absorbância será medida por 60 segundos. Uma unidade de atividade arilesterase da PON1 será considerada igual a 1 μM de fenol/minuto e expressa em kU/L, com base no coeficiente de extinção de fenol. Amostras em branco contendo água serão utilizadas para corrigir a hidrólise não enzimática.

5.6 Definição das variáveis de exposição

5.6.1 Polimorfismo genético -107C/T da enzima PON1

Para extração de DNA genômico, o sangue coletado (300 μL de sangue total) será adicionado de tampão de quebra de hemácias (Tris-HCl 10mM, pH 7,6, 109,54g de sacarose, 1,01g de MgCl_2 e 10ml de Triton X-100) e centrifugado por 2 minutos a 7000 rpm. O processo será repetido por até 3 vezes para remover a hemoglobina. O sedimento será adicionado de 400 μL do tampão para quebra de núcleo mais 5 μL de proteinase K (20mg/mL) com homogeneização e incubação da mistura por 1 hora a 55° C, visando a completa digestão das células lisadas. Em seguida, serão adicionados 100 μL de NaCl saturado (5M) e 600 μL de clorofórmio e a solução será centrifugada. O sobrenadante, com o DNA, será adicionado de 800 μL de etanol, previamente resfriado a -20°C, centrifugado e reidratado com 50 μL de TE Buffer. O DNA será quantificado em espectrofotômetro e sua integridade avaliada em gel de agarose 0,8%.

A determinação do polimorfismo será obtida por reação em cadeia de polimerase, seguido por digestão com enzima de restrição. A amplificação da região promotora do gene da PON1 onde está localizado o polimorfismo T(-107)C será feita com o uso dos *primers*: *forward* 5'AGCTAGCTGCGGACCCGGCGGGGAGGaG3' e *reverse* 5'GGCTGCAGCCCTCACCACAACCC3'. Serão utilizadas as condições padrão para realização da PCR, com temperatura de anelamento de 67°C.

A letra minúscula no *primer forward* indica um erro de pareamento que introduz um sítio de restrição para a enzima *BsrBI* (New England Bio Labs, Cambridge, UK), pois não há sítio de restrição específico cortando a sequência original do DNA. Após a

digestão, o alelo C será identificado pelos fragmentos de 28 e 212 pb, enquanto o alelo T resultará no fragmento 240 pb não digerido. Os fragmentos de DNA serão separados por eletroforese em gel de agarose de 3%, corados com SYBR Safe (Applied Biosystems) (CAMPO et al., 2004).

5.6.2 Antropometria

As medidas antropométricas de peso e estatura serão coletadas para realização do cálculo do IMC. A circunferência da cintura será aferida para obtenção da variável obesidade central. As medidas serão coletadas por nutricionistas/acadêmicos de Nutrição treinados, sempre com os mesmos equipamentos.

As crianças serão pesadas e medidas usando roupas leves, descalças, com os braços caídos ao longo do corpo e olhando para frente. A avaliação do estado nutricional das crianças será realizada por meio do índice IMC-para-idade em escore-z. Para tanto, será utilizada como referência a proposta da OMS, de 2007, para crianças e adolescentes de 5 a 19 anos. Os pontos de corte utilizados para classificação do estado nutricional estão relacionados na Fig. 6.

| Diagnóstico nutricional | Escore-z | Percentil |
|--------------------------------|--------------------|----------------------|
| Magreza acentuada | < -3 | < 0,1 |
| Magreza | ≥ -3 e < -2 | $\geq 0,1$ e < 3 |
| Eutrofia | > -2 e $\leq +1$ | ≥ 3 e ≤ 85 |
| Sobrepeso | $> +1$ e $\leq +2$ | > 85 e ≤ 97 |
| Obesidade | $> +2$ e $\leq +3$ | > 97 e $\leq 99,9$ |
| Obesidade grave | $> +3$ | $> 99,9$ |

Figura 6 - Valores de referência de IMC/idade propostos para a população de 5 a 19 anos pela Organização Mundial da Saúde.

Fonte: ONIS, et al. 2007.

A circunferência da cintura será obtida através da medida da linha da cintura, no ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca. O referencial a ser utilizado para comparação é o proposto por Freedman (1999) (Fig. 7).

| Idade (anos) | BRANCOS | | | | | | NEGROS | | | | | |
|-----------------|-----------|----|----|-----------|----|----|-----------|----|-----|-----------|----|-----|
| | Meninos | | | Meninas | | | Meninos | | | Meninas | | |
| | Percentil | | | Percentil | | | Percentil | | | Percentil | | |
| | n | 50 | 90 | n | 50 | 90 | n | 50 | 90 | n | 50 | 90 |
| 5 | 28 | 52 | 59 | 34 | 51 | 57 | 36 | 52 | 56 | 34 | 52 | 56 |
| 6 | 44 | 54 | 61 | 60 | 53 | 60 | 42 | 54 | 60 | 52 | 53 | 59 |
| 7 | 54 | 55 | 61 | 55 | 54 | 64 | 53 | 56 | 61 | 52 | 56 | 67 |
| 8 | 95 | 59 | 75 | 75 | 58 | 73 | 54 | 58 | 67 | 54 | 58 | 65 |
| 9 | 53 | 62 | 77 | 84 | 60 | 73 | 53 | 60 | 74 | 56 | 61 | 78 |
| 10 | 72 | 64 | 88 | 67 | 63 | 75 | 53 | 64 | 79 | 49 | 62 | 79 |
| 11 | 97 | 68 | 90 | 95 | 66 | 83 | 58 | 64 | 79 | 67 | 67 | 87 |
| 12 | 102 | 70 | 89 | 89 | 67 | 83 | 60 | 68 | 87 | 73 | 67 | 84 |
| 13 | 82 | 77 | 95 | 78 | 69 | 94 | 49 | 68 | 87 | 64 | 67 | 81 |
| 14 | 88 | 73 | 99 | 54 | 69 | 96 | 62 | 72 | 85 | 51 | 68 | 92 |
| 15 | 58 | 73 | 99 | 58 | 69 | 88 | 44 | 72 | 81 | 54 | 72 | 85 |
| 16 | 41 | 77 | 97 | 58 | 68 | 93 | 41 | 75 | 91 | 34 | 75 | 90 |
| 17 | 22 | 79 | 90 | 42 | 66 | 86 | 31 | 78 | 101 | 35 | 71 | 105 |

Fonte: Freedman et al (1999)

Figura 7 - Distribuição em percentis da circunferência abdominal segundo sexo e idade.

5.6.3 Determinação dos níveis séricos dos lipídeos

Serão coletados cerca de 5mL de sangue por punção venosa, de cada indivíduo, após jejum de 12 horas, em frascos secos para as taxas bioquímicas. As amostras de sangue serão processadas e o soro imediatamente analisado em equipamento automático. O colesterol total, o HDL, o LDL e os triglicerídeos serão determinados por método colorimétrico enzimático, seguindo as instruções do fabricante. A análise será realizada em parceria com um Laboratório de Análises clínicas, localizado na cidade do estudo.

A análise do perfil lipídico seguirá os valores de referência propostos na I Diretriz de Prevenção da Aterosclerose na Infância e na Adolescência, desenvolvida pela Sociedade Brasileira de Cardiologia (2005), que estão descritos na Fig. 8. Serão consideradas dislipidêmicas, as crianças que apresentarem pelo menos um fator de risco aterogênico, ou seja, no mínimo um valor de lipídeo alterado.

| Lipídeos | Desejáveis (mg/dL) | Limítrofes (mg/dL) | Aumentados (mg/dL) |
|------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Colesterol Total | <150 | 150-169 | ≥ 170 |
| LDL-Colesterol | <100 | 100-129 | ≥ 130 |
| HDL-Colesterol | ≥45 | | |
| Triglicerídeos | <100 | 100-129 | ≥ 130 |

Figura 8 - Valores de referência lipídica propostos para a população de 2 a 19 anos pela I Diretriz de Prevenção da Aterosclerose na Infância e na Adolescência.

Fonte: SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2005.

5.6.4 Consumo alimentar

O consumo alimentar será avaliado utilizando-se o formulário de marcadores do consumo alimentar adotado pelo Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional (SISVAN), proposto pelo Ministério da Saúde do Brasil (Anexo A). A partir deste formulário é possível conhecer o consumo de dez itens/grupos alimentares (salada crua, legumes e verduras cozidos, frutas, feijão, leite ou iogurte, batata frita e salgados, embutidos, bolachas e salgadinhos, doces e refrigerante) nos sete dias anteriores ao da entrevista. Os cinco primeiros serão considerados alimentos marcadores de alimentação saudável e os cinco últimos, marcadores de alimentação não saudável.

5.7 Instrumentos

O peso das crianças será aferido utilizando balança plataforma digital da marca Welmy, com capacidade para 200kg e precisão de 100g. Para obter a medida da altura será utilizado estadiômetro acoplado à balança, com capacidade de 200cm e precisão de 0,5cm. A circunferência da cintura será aferida com fita métrica inextensível.

As exposições serão coletadas através de questionários padronizados (Apêndice B e Anexo A) com questões abertas e fechadas sobre características comportamentais, familiares e biológicas.

O material biológico coletado será acondicionado em dois tubos. O primeiro tubo será utilizado para análise dos lipídeos séricos e determinação da atividade arilesterase da PON1. O outro tubo, adicionado de EDTA, servirá para extração de DNA e identificação do polimorfismo genético.

5.8 Seleção e treinamento dos entrevistadores

Haverá uma seleção de entrevistadores para a realização do trabalho de campo. Esses entrevistadores deverão ser alunos do curso de Nutrição, cursando no mínimo o 6º semestre e terem disponibilidade de dois turnos livres por semana. Os alunos receberão treinamento de 20h e, ao término deste, deverão estar aptos a coletar dados de prontuário, realizar antropometria, aplicar questionários sobre dados de identificação e consumo alimentar do paciente e encaminhá-lo para a coleta de amostra biológica para exames laboratoriais. O treinamento será coordenado pelas pesquisadoras do estudo, com objetivo principal de explicar a pesquisa e a logística do trabalho a ser desenvolvido.

5.9 Estudo Piloto

Com o objetivo de testar os instrumentos de coleta de dados e a logística do trabalho de campo será realizado um estudo piloto no Ambulatório de Nutrição/UFPEL, com crianças a partir de 5 anos de idade.

5.10 Controle de qualidade

A qualidade dos dados será assegurada por um conjunto de medidas adotadas previamente ao trabalho de campo. As pesquisadoras realizarão ainda reuniões semanais com a equipe de entrevistadores para acompanhamento do trabalho e esclarecimento de dúvidas relativas ao preenchimento dos questionários. Os questionários serão revisados com dupla digitação de dados, seguida por avaliação e análise de consistência dos dados digitados. Além disso, será mantido contato telefônico com 10% dos responsáveis para checar a duração da aplicação dos questionários e o tratamento dos entrevistadores com as crianças e seus acompanhantes. Haverá uma planilha para controle das crianças já entrevistadas, a fim de evitar questionários duplicados decorrentes de duas entradas de dados da mesma criança.

5.11 Análises dos dados

Os dados coletados serão analisados utilizando-se o software STATA versão 12. Os resultados das análises biológicas serão expressos através de média e desvio padrão. Inicialmente, a normalidade nos dados será testada com a aplicação do teste *Shapiro-Wilk*. Para os dados que apresentarem distribuição normal a comparação entre duas ou mais variáveis será realizada, respectivamente, por meio do Teste *t de Student* ou ANOVA de 1 via, seguido do post-hoc de *Tukey*. Já para os dados não paramétricos serão aplicados os testes estatísticos equivalentes para análises entre dois ou mais grupos, U de *Mann Whitney* e *Kruskal Wallis*. O nível de significância adotado será de $p < 0,05$.

5.12 Aspectos Éticos

O projeto será submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa, via Plataforma Brasil. Antes do início das avaliações, os responsáveis legais pelas crianças selecionadas, e que concordarem em participar do estudo, receberão um termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice A), devendo este ser obrigatoriamente preenchido pelos pais ou respectivos responsáveis, autorizando o uso dos dados da criança. O assentimento da criança será respeitado e obtido oralmente.

O sigilo e a confiabilidade das informações coletadas serão preservados, ficando o material com os dados sob a guarda da pesquisadora. Os participantes receberão uma cópia do TCLE e poderão fazer quaisquer perguntas antes, durante ou depois da pesquisa, com direito a retirar a participação a qualquer momento, sem qualquer prejuízo ou impedimento ao atendimento da criança no ambulatório.

A coleta de sangue poderá trazer desconforto para a criança. Por isso, foi escolhido um laboratório de referência na cidade, com profissionais técnicos experientes, responsáveis e treinados para esse procedimento dentro das técnicas estabelecidas.

As crianças que apresentarem alterações que representem fator de risco para DCV nas variáveis coletadas serão encaminhadas para intervenção nutricional no Ambulatório de Nutrição da Faculdade de Nutrição/UFPEL.

5.13 Orçamento

As análises bioquímicas de perfil lipídico serão realizadas em parceria com um Laboratório de Análises Clínicas, localizado na cidade do estudo, e financiadas por apoio a projetos de pesquisa. As análises de biologia molecular serão custeadas com verba do PPGNA (Fig. 9).

| Material | Valor unitário (R\$) | Valor total (R\$) |
|---|----------------------|-------------------|
| Análises de Biologia molecular | 961,63 | 961,63 |
| Análise do perfil lipídico | 14,08 | 1408,00 |
| Material de expediente (folhas, canetas, toner) | 200,00 | 200,00 |
| Valor total (R\$) | 1175,71 | 2569,63 |

Figura 9 - Orçamento do projeto de pesquisa.

5.14 Divulgação de resultados

O produto final deste projeto será divulgado na forma de dissertação de mestrado e como artigo para publicação em revista científica.

6 CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO

| FASES | 1° sem. 2013 | 2° sem. 2013 | 1° sem. 2014 | 2° sem. 2014 |
|--|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Revisão Bibliográfica | | | | |
| Qualificação do projeto | | | | |
| Treinamento da equipe | | | | |
| Estudo piloto | | | | |
| Acompanhamento da equipe | | | | |
| Coleta dos dados | | | | |
| Digitação e sistematização dos dados | | | | |
| Análise dos resultados | | | | |
| Elaboração da dissertação e redação de artigos | | | | |
| Defesa da dissertação | | | | |

Figura 10 - Cronograma de atividades.

REFERÊNCIAS

AGGOUN, Yacine. Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. **Pediatric Research**, v.61, n.6, p.653–9, 2007.

AŞKAR, Tünay; BÜYÜKLEBLEBICI, Olga. Paraoxonase: A New Biochemical Marker of Oxidant- Antioxidant Status in Atherosclerosis. In: *Oxidative Stress - Molecular Mechanisms and Biological Effects*. InTech: Lushchak, 2012. p.145-54. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/oxidative-stress-molecular-mechanisms-and-biological-effects>> Acesso em: 5 set 2013.

AUDI KOVSZKY, M.; PADOS, G.; SERES, I.; HARANGI, M.; FÜLÖP, P.; KATONA, E., et al. Changes in lipid profile and paraoxonase activity in obese patients as a result of orlistat treatment. **Orvosi Hetilap**, v.142, n.50, p.2779–83, 2001.

AVIRAM, M.; ROSENBLAT, M.; BISGAIER, C. L.; NEWTON, R. S.; PRIMO-PARMO, S. L.; LA DU, B. N. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. **The Journal of Clinical Investigation**, v.101, n.8, p.1581, 1998.

BLATTER-GARIN, M.; KALIX, B.; DE PREE, S.; JAMES, R. Aspirin use is associated with higher serum concentrations of the anti-oxidant enzyme, paraoxonase-1. **Diabetologia**, v.46, n.4, p.594–5, 2003.

BROPHY, V.; JAMPSA R.; CLENDENNING J.; MCKINSTY L.; JARVIK G.; FURLONG C. Effects of 50 regulatory-region polymorphisms on paraoxonase-gene (PON1) expression. **The American Journal of Human Genetics**, v.68, p.1428-36, 2001.

CAMPO, S.; SARDO, M.; TRIMARCHI, G.; BONAIUTO, M.; CASTALDO, M.; FONTANA, L., et al. The paraoxonase promoter polymorphism (-107)T>C is not associated with carotid intima-media thickness in Sicilian hypercholesterolemic patients. **Clinical Biochemistry**, v.37, n.5, p.388-94, 2004.

CARVALHO, D.; PAIVA, A.; MELO, A.; RAMOS, A.; MEDEIROS, J.; MEDEIROS, C., et al. Perfil lipídico e estado nutricional de adolescentes. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v.10, n.4, p. 491-8, 2007.

CHISOLM, Guy M.; STEINBERG, Daniel. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. **Free Radical Biology and Medicine**, v.28, n.12, p.1815-26, 2000.

COLE, T.; JAMPSA, R.; WALTER, B.; ARNDT, T.; RICHTER, R.; SHIH, D., et al. Expression of human paraoxonase (PON1) during development. **Pharmacogenetics and Genomics**, v.13, n.6, p.357-64, 2003.

COSTA, L.; GIORDANO, G.; FURLONG, C. Pharmacological and dietary modulators of paraoxonase 1 (PON1) activity and expression: the hunt goes on. **Biochemical Pharmacology**, v.81, n.3, p.337-44, 2011.

COSTA, L.; VITALONE, A.; COLE, T.; FURLONG, C. Modulation of paraoxonase (PON1) activity. **Biochemical Pharmacology**, v.69, p.541–50, 2005.

DE ROOS, N.; SCHOUTEN, E.; SCHEEK, L.; VAN TOL, A.; KATAN, M. Replacement of dietary saturated fat with *trans* fat reduces serum paraoxonase activity in healthy men and women. **Metabolism**, v.51, n.12, p.1534-37, 2002.

DEAKIN, Sara; GUERNIER, Sophie; JAMES, Richard W. Pharmacogenetic interaction between paraoxonase-1 gene promoter polymorphism C-107T and statin. **Pharmacogenetics and Genomics**, v.17, n.6, p.451-57, 2007.

DUNET, V.; RUIZ, J.; ALLENBACH, G.; IZZO, P.; JAMES, R.; PRIOR, J. Effects of paraoxonase activity and gene polymorphism on coronary vasomotion. **EJNMMI Research**, v.1, n.1, p.1-7, 2011.

DURRINGTON, P.; MACKNESS, B.; MACKNESS, M. Paraoxonase and Atherosclerosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v.21, p.473-80, 2001.

FERRETTI, G.; BACCHETTI, T.; MORONI, C.; SAVINO, S.; LIUZZI, A.; BALZOLA, F., et al. Paraoxonase activity in high-density lipoproteins: A comparison between healthy and obese females. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.90, p.1728–33, 2005.

FORTI, Neusa; DIAMENT, Jayme. Apolipoprotein B and A-I: cardiovascular risk factor? **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v.53, n.3, p.276-82, 2007.

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.

FREEDMAN, D.; SERDULA, M.; SRINIVASAN, S.; BERENSON, G. Relation of circumferences and skinfold thicknesses to lipid and insulin concentrations in children and adolescents: the Bogalusa Heart Study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.69, n.2, p.308-17, 1999.

FUHRMAN, Bianca; VOLKOVA, Nina; AVIRAM, Michael. Oxidative stress increases the expression of the CD36 scavenger receptor and the cellular uptake of oxidized low-density lipoprotein in macrophages from atherosclerotic mice: protective role of antioxidants and of paraoxonase. **Atherosclerosis**, v.161, n.2, p.307-16, 2002.

GARCÉS, C.; LOPEZ-SIMON, L.; RUBIO, R.; BENAVENTE, M.; CANO, B.; ORTEGA, H., et al. High-density lipoprotein cholesterol and paraoxonase 1 (PON1) genetics and serum PON1 activity in prepubertal children in Spain. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v.46, n.6, p.809–13, 2008.

GARCÉS, C.; LÓPEZ-SIMÓN, L.; RUBIO, R.; BENAVENTE, M.; CANO, B.; VITURRO, E., et al. Análisis de la actividad paraoxonasa (PON1) y de los polimorfismos PON1 192 y PON1 55 en la población prepuberal del Estudio Cuatro Provincias. **Clínica e Investigación en Arteriosclerosis**, v.19, n.6, p.287-92, 2007.

GOUÉDARD, C.; KOUM-BESSON, N.; BAROUKI, R.; MOREL, Y. Opposite regulation of the human paraoxonase-1 gene PON-1 by fenofibrate and statins. **Molecular Pharmacology**, v.63, n.4, p.945-56, 2003.

HOLLAND, N.; FURLONG, C.; BASTAKI, M.; RICHTER, R.; BRADMAN, A.; HUEN, K., et al. Paraoxonase polymorphisms, haplotypes, and enzyme activity in Latino mothers and newborns. **Environmental Health Perspectives**, v.114, n.7, p.985–91, 2006.

HUEN, K.; HARLEY, K.; BECKMAN, K.; ESKENAZI, B.; HOLLAND, N. Associations of PON1 and genetic ancestry with obesity in early childhood. **PloS one**, v.8, n.5, p.e62565, 2013.

HUEN, K.; HARLEY, K.; BRADMAN, A.; ESKENAZI, B.; HOLLAND, N. Longitudinal changes in PON1 enzymatic activities in Mexican–American mothers and children with

different genotypes and haplotypes. **Toxicology and applied Pharmacology**, v.244, n.2, p.181-9, 2010.

HUEN, K.; HARLEY, K.; BROOKS, J.; HUBBARD, A.; BRADMAN, A.; ESKENAZI, B., et al. Developmental Changes in PON1 Enzyme Activity in Young Children and Effects of PON1 Polymorphisms. **Environmental Health Perspectives**, v.117, n.10, 2009.

JAMES, Richard W.; LEVIEV, Ilia; RIGHETTI, Alberto. Smoking is associated with reduced serum paraoxonase activity and concentration in patients with coronary artery disease. **Circulation**, v.101, n.19, p.2252-57, 2000.

JAMES, R.; LEVIEV, I.; RUIZ, J.; PASSA, P.; FROGUEL, P.; GARIN, M-C. Promoter polymorphism T(-107)C of the paraoxonase PON1 gene is a risk factor for coronary heart disease in type 2 patients. **Diabetes**, v.49, p.1390–93, 2000.

KARIKAS, G.; KRIEBARDIS, A.; SAMARA, I.; SCHULPIS, K.; PAPACHRISTODOULOU, M.; FYTOU-PALLIKARI, A. Serum homocysteine levels and paraoxonase 1 activity in preschool aged children in Greece. **Clinical Chemical Laboratory Medicine**, v.44, n.5, p.623-7, 2006.

KELISHADI, Roya. Inflammation-induced atherosclerosis as a target for prevention of cardiovascular diseases from early life. **The Open Cardiovascular Medicine Journal**, v.4, p.24–29, 2010.

KLEEMOLA, P.; FREESE, R.; JAUHIAINEN, M.; PAHLMAN, R.; ALFTHAN, G.; MUTANEN, M. Dietary determinants of serum paraoxonase activity in healthy humans. **Atherosclerosis**, v.160, p.425–32, 2002.

KONCSOS, P.; SERES, I.; HARANGI, M.; ILLYÉS, I.; JÓZSA, L.; GÖNCZI, F., et al. Human paraoxonase-1 activity in childhood obesity and its relation to leptin and adiponectin levels. **Pediatric research**, v.67, n.3, p.309-13, 2010.

KONTUSH A.; CHANTEPIE S.; CHAPMAN M. J. Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v.23, p.1881-88, 2003.

KONTUSH, Anatol; CHAPMAN, M. John. Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis. **Pharmacological Reviews**, v.58, n.3, p.342-74, 2006.

KOTA, S.; MEHER, L.; JAMMULA, S.; KRISHNA, S.; MODI, K. Implications of serum paraoxonase activity in obesity, diabetes mellitus, and dyslipidemia. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v.17, n.3, p.402, 2013.

KRZYTEK-KORPACKA, M.; PATRYN, E.; HOTOWY, K. Paraoxonase-1 Activity in Overweight and Obese Children and Adolescents: Association with Obesity-Related Inflammation and Oxidative Stress. **Advances and Clinical Experimental Medicine**, v.22, n.2, p.229–36, 2013.

KUDCHODKAR, B.; LACKO, A.; DORY, L.; FUNGWE, T. Dietary fat modulates serum paraoxonase 1 activity in rats. **Journal of Nutrition**, v.130, p.2427–33, 2000.

M LOU-BONAFONTE, J.; FITO, M.; COVAS, M.; FARRAS, M.; OSADA, J. HDL-related mechanisms of olive oil protection in cardiovascular disease. **Current Vascular Pharmacology**, v.10, n.4, p.392-409, 2012.

MACKNESS, B.; DURRINGTON, P.; MCELDOFF, P.; YARNELL, J.; AZAM, N.; WATT, M., et al. Low paraoxonase activity predicts coronary events in the Caerphilly Prospective Study. **Circulation**, v.107, p.2775-79, 2003.

MADAMANCHI, N.; HAKIM, Z.; RUNGE, M. Oxidative stress in atherogenesis and arterial thrombosis: the disconnect between cellular studies and clinical outcomes. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.3, n.2, p.254-67, 2005.

MARTÍNEZ-SALAZAR, M.; ALMENARES-LÓPEZ, D.; GARCÍA-JIMÉNEZ, S.; SÁNCHEZ-ALEMÁN, M.; JUANTORENA-UGÁS, A.; RÍOS, C., et al. Relationship between the paraoxonase (PON1) L55M and Q192R polymorphisms and obesity in a Mexican population: a pilot study. **Genes & Nutrition**, v.6, n.4, p.361-68, 2011.

MUELLER, C.; LAUDE, K.; MCNALLY J.; HARRISON D. Redox mechanisms in blood vessels. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v.2, p.274–8, 2005.

NAJAFI, Mohammad; GOHARI, Ladan Hosseini; FIROOZRAI, Mohsen. Paraoxonase 1 gene promoter polymorphisms are associated with the extent of stenosis in coronary arteries. **Thrombosis Research**, v.123, n.3, p.503-10, 2009.

NAPOLI, C.; CRUDELE, V.; SORICELLI, A.; AL-OMRAN, M.; VITALE, N.; INFANTE, T., et al. Primary Prevention of Atherosclerosis: A Clinical Challenge for the Reversal of Epigenetic Mechanisms? **Circulation**, v.125, n.19, p.2363-73, 2012.

NAVAB, M.; HAMA, S.; VAN LENTEN, B.; FONAROW, G.; CARDINEZ, C.; CASTELLANI, L., et al. Mildly oxidized LDL induces an increased apolipoprotein J/paraoxonase ratio. **Journal of Clinical Investigation**, v.99, n.8, p.2005–19, 1997.

ONIS, M.; ONYANGO, A.; BORGHI, E.; SIYAM, A.; NISHIDA, C.; SIEKMANN, J. Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. **Bulletin of the World Health Organization**, v.85, n.9, p.660-7, 2007.

OTOCKA-KMIECIK, Aneta; ORŁOWSKA-MAJDAK, Monika. The role of genetic (PON1 polymorphism) and environmental factors, especially physical activity, in antioxidant function of paraoxonase. **Journal cover**, v.67, 2013.

Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF 2008-2009): Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil. IBGE, 2010.

PRÉCOURT, L. P.; AMRE, D.; DENIS, M. C.; LAVOIE, J. C.; DELVIN, E.; SEIDMAN, E., et al. The three-gene paraoxonase family: physiologic roles, actions and regulation. **Atherosclerosis**, v.214, n.1, p.20-36, 2011.

PRIMO-PARMO, S.; SORENSON, R.; TEIBER, J.; LA DU, B. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. **Genomics**, v.33, n.3, p.498-507, 1996.

RAINWATER, D.; RUTHERFORD, S.; DYER, T.; RAINWATER, E.; COLE, S.; VANDEBERG, J., et al. Determinants of variation in human serum paraoxonase activity. **Heredity**, v.102, n.2, p.147-54, 2008.

RANTALA, M.; SILASTE, M.; TUOMINEN, A.; KAIKKONEN, J.; SALONEN, J.; ALFTHAN, G., et al. Dietary modifications and gene polymorphisms alter serum

paraoxonase activity in healthy women. **The Journal of Nutrition**, v.132, n.10, p.3012-17, 2002.

RAO, Goutham. Insulin resistance syndrome. **American Family Physician**, v.63, n.6, p.1159–63, 2001.

RAO, M.; MARMILLOT, P.; GONG, M.; PALMER, D.; SEEFF, L.; STRADER, D., et al. Light, but not heavy alcohol drinking, stimulates paraoxonase by upregulating liver mRNA in rats and humans. **Metabolism**, v.52, n.10, p.1287-94, 2003.

RÊGO, Ana Lúcia Viégas; CHIARA, Vera Lucia. Nutrição e excesso de massa corporal: fatores de risco cardiovascular em adolescentes. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.19, n.6, 2006.

RIDKER P.; BROWN N.; VAUGHAN D.; HARRISON D.; MEHTA J. Established and emerging plasma biomarkers in the prediction of first atherothrombotic events. **Circulation**, v.109, IV-6–IV-19, 2004.

ROBERTS, Christian K.; SINDHU, Kunal K. Oxidative stress and metabolic syndrome. **Life sciences**, v.84, n.21, p.705-12, 2009.

RUPÉREZ, A. I.; LÓPEZ-GUARNIDO, O.; GIL, F.; OLZA, J.; GIL-CAMPOS, M.; LEIS, R., et al. Paraoxonase 1 activities and genetic variation in childhood obesity. **British Journal of Nutrition**, p.1-9, 2013.

SANDRI, Silvana. **Amilóide sérica A: efeitos biológicos sobre células mononucleares**. 2008. 164p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. Departamento de Análise Clínicas e Toxicológicas. São Paulo.

SANTOS, R.; GAGLIARDI, A.; XAVIER, H.; MAGNONI, C.; CASSANI, R.; LOTTENBERG, A., et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz sobre o consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.100, Supl.3, 40p. 2013.

SCHRADER, C.; RIMBACH, G. Determinants of Paraoxonase 1 Status: Genes, Drugs and Nutrition. **Current Medicinal Chemistry**. v.18, n.36, p.5624-43, 2011;

SCHUCH, Ilaine et al. Excess weight in preschoolers: prevalence and associated factors. **Jornal de pediatria**, v.89, n.2, p.179-188, 2013.

SENTÍ, M.; TOMÁS, M.; ANGLADA, R.; ELOSUA, R.; MARRUGAT, J.; COVAS, M., et al. Interrelationship of smoking, paraoxonase activity, and leisure time physical activity: a population-based study. **European Journal of Internal Medicine**, v.14, n.3, p.178-84, 2003.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. I Diretriz de prevenção da aterosclerose na infância e na adolescência. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v.85, Suplemento VI, 2005.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. IV Diretriz brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose. Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v.88, Suplemento I, 2007.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA. **Obesidade na infância e adolescência**: manual de orientação. Sociedade Brasileira de Pediatria. Departamento Científico de Nutrologia. 2.ed. São Paulo: SBP, 2012. 142p.

SOCIEDADE PORTUGUESA DE ENDOCRINOLOGIA, DIABETES E METABOLISMO. GEIR - Grupo de Estudos da Insulino-Resistência. Manual sobre Insulino-Resistência. Editora: Helena Cardoso, 3 ed., 190p. 2009. Disponível em: <http://www.spedm-geir.org/site/download/manualinsulino_resistencia3edicao.pdf> Acesso em: 19 set 2013.

SUMEGOVÁ, K.; NAGYOVA, Z.; WACZULIKOVA, I.; ZITNANOVA, I.; DURACKOVA Z. Activity of paraoxonase 1 and lipid profile in healthy children. **Physiological Research**, v.56, n.3, p.351-7, 2007.

SUTHERLAND, W.; WALKER, R.; DE JONG, S.; VAN RIJ, A.; PHILLIPS, V.; WALKER, H. Reduced postprandial serum paraoxonase activity after a meal rich in used cooking fat. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v.19, n.5, p.1340-47, 1999.

THYAGARAJAN, B.; JACOBS, D.; CARR, J.; ALOZIE, O.; STEFFES, M.; KAILASH, P., et al. Factors associated with paraoxonase genotypes and activity in a diverse, young, healthy population: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) study. **Clinical Chemistry**, v.54, n.4, p.738-46, 2008.

VAN LENTEN, B.; WAGNER, A.; NAYAK, D.; HAMA, S.; NAVAB, M.; FOGELMAN, A. High-density lipoprotein loses its anti-inflammatory properties during acute influenza A infection. **Circulation**, v.103, n.18, p.2283-88, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cardiovascular Diseases (CVDs). Fact Sheet nº 317; 2011. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>> Acesso em: 08 jul 2013.

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



Relatório de trabalho de campo

ATIVIDADE DA PARAOXONASE-1:
ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO A POLIMORFISMOS GENÉTICOS, FATORES
BIOQUÍMICOS E NUTRICIONAIS EM CRIANÇAS.

Gabriela de Lemos Uliano

Pelotas, 2015.

Sumário

| | |
|---|----|
| 1 Logística do trabalho de campo | 63 |
| 2 Seleção e treinamento dos entrevistadores | 63 |
| 3 Estudo Piloto | 63 |
| 4 Coleta de dados | 64 |
| 4.1 Controle de qualidade dos dados..... | 64 |
| 4.2 Digitação e processamento de dados | 64 |
| 5 Perdas..... | 65 |
| 6 Análises laboratoriais | 65 |
| 7 Modificações do projeto de pesquisa | 65 |

1 Logística do trabalho de campo

O trabalho de campo iniciou em novembro de 2013 e foi concluído em fevereiro de 2015, sendo coordenado pela mestranda, que realizou as seguintes atividades:

- Submissão do Projeto Geral para o Comitê de Ética e Pesquisa;
- Formatação dos questionários;
- Seleção e treinamento das entrevistadoras;
- Estudo piloto;
- Administração dos insumos e materiais biológicos da pesquisa;
- Treinamento em técnicas bioquímicas e de biologia molecular;
- Análises laboratoriais.

2 Seleção e treinamento dos entrevistadores

Para a realização do trabalho de campo houve uma seleção de entrevistadores, junto ao curso de Nutrição da UFPEL. Esses entrevistadores deveriam ser alunos de Nutrição, cursando no mínimo o 6º semestre e com disponibilidade de no mínimo um turno livre por semana. No total, 10 alunas participaram do projeto. As alunas receberam treinamento de 20 horas e, ao término deste, estavam aptas a coletar dados de prontuário, realizar antropometria, aplicar questionários sobre dados de identificação e consumo alimentar do paciente e encaminhá-lo para a coleta de amostra biológica para exames laboratoriais. O treinamento foi coordenado pelas pesquisadoras do estudo, com objetivo principal de explicar a pesquisa e a logística do trabalho a ser desenvolvido. As entrevistadoras receberam certificado conforme as horas trabalhadas.

3 Estudo Piloto

O estudo piloto serviu, basicamente, para testar o entendimento do questionário pela população e para avaliar o desempenho das entrevistadoras no manuseio dos questionários. O estudo piloto foi realizado no Ambulatório de Nutrição/UFPEL, com crianças a partir de 5 anos de idade, na segunda semana de janeiro de 2014. Observou-se a necessidade da elaboração de um encaminhamento próprio para facilitar a identificação dos pacientes pelo laboratório (Apêndice C) e de material de

orientação para os pacientes que apresentaram alterações nos resultados dos exames laboratoriais (Apêndice D).

4 Coleta de dados

A coleta de dados foi realizada no período de 22 de janeiro a 30 de outubro de 2014. Diariamente, as entrevistadoras se apresentaram nos ambulatórios portando crachá de identificação e vestindo jaleco. Periodicamente, eram realizadas reuniões entre todos os integrantes da pesquisa com o objetivo de fazer um balanço da coleta de dados (número de entrevistas, perdas e recusas), resolver problemas e encaminhar novas ações.

As entrevistas foram realizadas individualmente com os pacientes, mediante o assentimento oral da criança e a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido pelo responsável.

4.1 Controle de qualidade dos dados

A qualidade dos dados foi assegurada por um conjunto de medidas adotadas previamente ao trabalho de campo. As pesquisadoras realizaram ainda reuniões periódicas com a equipe de entrevistadores para acompanhamento do trabalho e esclarecimento de dúvidas relativas ao preenchimento dos questionários. Os questionários foram revisados com dupla digitação de dados, seguida por avaliação e análise de consistência dos dados digitados. Além disso, foi mantido contato telefônico com 10% dos responsáveis para checar a duração da aplicação dos questionários e o tratamento dos entrevistadores com as crianças e seus acompanhantes. Uma planilha para controle das crianças já entrevistadas foi mantida no local de coleta, a fim de evitar questionários duplicados decorrentes de duas entradas de dados da mesma criança.

4.2 Digitação e processamento de dados

Esta etapa foi realizada utilizando-se do programa Microsoft Excel 2010 com os questionários sendo duplamente digitados. Em seguida, estas digitações eram comparadas e corrigidas. Ao final, os dados foram transportados para o pacote estatístico STATA versão 12.0, onde foram analisados.

5 Perdas

Foram consideradas perdas os indivíduos que não completaram o processo de coleta e análises de dados. O total de perdas para a amostra de 120 indivíduos foi de 39 (32,5%) pacientes. Dentre os motivos para as perdas encontram-se crianças que não compareceram ao laboratório para coleta de sangue (n=34) e amostras em quantidade insuficiente para análise da atividade enzimática (n=5). Ao final do processo de coleta de dados 81 crianças foram incluídas nas análises.

6 Análises laboratoriais

As análises laboratoriais foram realizadas entre março de 2014 e fevereiro de 2015, concomitantemente com a coleta dos dados. Antes do início das análises, a mestranda passou por treinamento no laboratório de Nutrigenômica da UFPEL.

As amostras de sangue e soro foram coletadas em um laboratório de análises clínicas com sede localizada na cidade de Pelotas e posto de coleta na cidade de Pinheiro Machado. Primeiramente, o soro era analisado para determinação do perfil lipídico na sede do laboratório. As amostras eram recolhidas periodicamente, identificadas e armazenadas a -20°C no laboratório da UFPEL, onde a mestranda realizou as análises da atividade enzimática e do polimorfismo genético.

O soro foi utilizado para a dosagem da atividade sérica da PON1. Após esta primeira dosagem, as amostras foram novamente processadas em duplicata e analisadas, todas com a mesma solução tampão, para obtenção da média da atividade enzimática de cada paciente.

Das 81 crianças avaliadas, 73 foram avaliadas para o polimorfismo genético. O DNA genômico foi extraído do sangue coletado e quantificado em espectrofotômetro. A determinação do polimorfismo foi obtida por reação em cadeia da polimerase (PCR), seguido por digestão com enzima de restrição. Os fragmentos de DNA foram então separados por eletroforese em gel de agarose.

7 Modificações do projeto de pesquisa

O Ambulatório de Pediatria da FAMED/UFPEL, local de pesquisa inicial, passou por uma reforma estrutural durante o período de coleta de dados e com isso foi

deslocado para outro endereço. Com esta mudança, os atendimentos foram significativamente reduzidos, dificultando a obtenção do número mínimo de sujeitos a serem pesquisados, conforme cálculo de amostra do projeto de pesquisa.

Neste sentido, foi necessário ampliar o local de pesquisa e o período de coleta de dados. O local escolhido foi o ambulatório de pediatria da Secretaria Municipal de Saúde de Pinheiro Machado, localizado no município de Pinheiro Machado, que também realiza atendimentos pelo Sistema Único de Saúde. A escolha deste segundo local considerou as características da população e a facilidade de acesso aos pacientes, visto que a mestrande trabalhava no local. A expansão da pesquisa para outro ambulatório não demandou alterações no projeto, visto que os procedimentos se mantiveram inalterados. Os dados foram coletados até outubro de 2014.

ARTIGO 1

Influência do consumo alimentar, estado nutricional e perfil lipídico sobre a atividade da paraoxonase 1 em crianças de 5 a 7 anos de idade.

Gabriela L. Uliano^{1*}, Ludmila Correa Muniz¹, Augusto Schneider¹, Sandra C. Valle¹

¹Faculdade de Nutrição, UFPEL - Universidade Federal de Pelotas, Rua Gomes Carneiro, n°1, Campus Universitário Porto, Pelotas, RS, Brasil.

* Autor correspondente: G. Uliano, 55 53 91389301, email gabiuliano@hotmail.com

Título breve: Atividade da PON1 em crianças

Palavras-chave: PON1: Crianças: Consumo alimentar: Estado nutricional: Perfil lipídico

Este artigo será traduzido para a língua inglesa e submetido à revista British Journal of Nutrition.

Resumo

A infância é um período vulnerável para o início das lesões endoteliais, as quais podem ser agravadas pela exposição a fatores nutricionais de risco. Por outro lado, a paraoxonase 1 (PON1) protege contra a lesão endotelial e o aumento de sua atividade reflete em redução da doença cardiovascular (DCV). Este trabalho teve como objetivo avaliar a relação entre a atividade da PON1 e o consumo alimentar, estado nutricional e perfil lipídico em crianças. Foi realizado um estudo transversal com 81 crianças de ambulatórios de pediatria de dois municípios do sul do Brasil. Avaliou-se a frequência de consumo de dez grupos alimentares nos sete dias anteriores à entrevista, o IMC para idade calculado em escore-z, o perfil lipídico sérico e a atividade arilesterase da PON1, medida utilizando fenilacetato como substrato. A atividade da enzima foi semelhante entre meninos e meninas. As crianças que consumiram salada crua ≥ 5 dias na semana mostraram maior atividade enzimática ($p=0,003$). Níveis desejáveis de HDL relacionaram-se a um incremento significativo da enzima e essa correlação foi positiva e moderada entre as crianças eutróficas ($r=0,318$ e $p=0,03$). Conclui-se que o consumo regular de salada crua e níveis desejáveis de HDL, em especial quando associados ao peso adequado, resultaram em níveis mais elevados de atividade da PON1 em crianças. Este é o primeiro estudo abordando a associação entre o consumo alimentar e os níveis enzimáticos nesta população. A medida da PON1 pode colaborar com a identificação do risco cardiovascular já na infância, propiciando uma conduta nutricional direcionada.

Introdução

A infância e a adolescência são períodos particularmente vulneráveis aos efeitos dos fatores de risco cardiovasculares e o posterior desenvolvimento de aterosclerose⁽¹⁾. A doença cardiovascular (DCV) é a principal causa de mortalidade nos países ocidentais e está relacionada ao processo aterosclerótico que tem início já nas primeiras décadas de vida, geralmente evoluindo de forma assintomática, sem manifestações clínicas até a idade adulta⁽²⁾. Um estudo conduzido em população norte-americana, utilizando ultrassom intravascular, detectou lesões ateroscleróticas nas artérias coronárias de 17% dos indivíduos estudados com idade entre 12 e 19 anos, comprovando estes dados⁽³⁾.

Mesmo na infância, a progressão das lesões endoteliais está na dependência de fatores de risco e de suas inter-relações⁽⁴⁾. Evidências enfatizam os efeitos negativos da ingestão excessiva de gorduras saturadas, trans e colesterol, bem como da ingestão de carboidratos, obesidade e inatividade física sobre o aumento do risco de DCV na vida adulta⁽⁵⁾. Por outro lado, o consumo regular de frutas e vegetais tem se mostrado um fator protetor ao desenvolvimento de doenças crônicas, incluindo a aterosclerose⁽⁶⁻⁹⁾.

Um dos efeitos favoráveis atribuídos a estes alimentos é a capacidade, conferida pelo seu teor de substâncias antioxidantes, de proteger a partícula de LDL frente o dano oxidativo, prevenindo assim o desenvolvimento do processo aterosclerótico^(3 10). Em contraste, dietas ricas em gordura aumentam a captação de oxigênio e a produção de radicais livres, induzem a peroxidação lipídica, o prejuízo a moléculas biológicas, como lipídios e proteínas, e a oxidação da partícula de LDL. Os nutrientes derivados destes grupos de alimentos ainda podem exercer efeito direto sobre os sítios catalíticos de enzimas antioxidantes e interferem diretamente no equilíbrio entre a formação e a eliminação endógena de substâncias citotóxicas⁽¹¹⁾. Esse equilíbrio é um ponto chave no desenvolvimento de múltiplas doenças, em especial de DCV. Há evidências de que a paraoxonase 1 (PON1), enzima antioxidante associada à partícula de HDL, previne a peroxidação lipídica tanto do LDL, quanto do próprio HDL⁽¹²⁾. A redução da atividade da PON1 reflete aumento do dano endotelial e, conseqüentemente, do risco de DCV⁽¹³⁾.

A PON1 (PON1; EC 3.1.8.1) é uma enzima expressa essencialmente no fígado. O nome se refere à habilidade em degradar paraoxon, o metabólito tóxico do pesticida parathion. Além desta atividade organofosfatase, a enzima exibe atividade arilesterase (fenilacetato) e lactonase (lactonas), de acordo com o substrato hidrolisado⁽¹²⁾. A atividade sérica da PON1 varia entre indivíduos sendo influenciada por diversos parâmetros, incluindo polimorfismos genéticos, estado nutricional, dieta, estilo de vida, idade e estado de saúde⁽¹⁴⁾.

Alterações na atividade sérica desta enzima têm sido relatadas de acordo com o consumo de certos nutrientes, o que levanta a hipótese de uma possível modulação dietética. A atividade da PON1 é modificada especialmente pelo consumo de gorduras sendo que os ácidos graxos monoinsaturados, juntamente com o colesterol dietético, aparecem como os maiores responsáveis por seu aumento⁽¹⁴⁻¹⁶⁾. Vários estudos também examinaram os efeitos das vitaminas C e E, indicando que a vitamina C exerce efeito protetor em relação à atividade da enzima. Entretanto, estes resultados são controversos⁽¹⁶⁻¹⁷⁾. Mesmo que grandes estudos epidemiológicos tenham demonstrado que pessoas com dietas ricas em frutas e vegetais apresentam menor risco cardiovascular^(6,7), dois estudos em populações finlandesas relataram que a alta ingestão de vegetais, possivelmente ricos em vitaminas antioxidantes, esteve negativamente correlacionada com a atividade sérica da PON1⁽¹⁸⁻¹⁹⁾.

Embora estes fatores dietéticos sejam alvo de inúmeras pesquisas em relação a seu papel protetor nas lesões endoteliais e DCV, a maioria dos estudos que avaliaram a atividade da PON1 em crianças relata sua associação apenas com o estado nutricional e variáveis bioquímicas. Até hoje não há relatos abordando o consumo alimentar como possível determinante dos níveis enzimáticos nesta população.

Com base nestas informações, o presente estudo teve como objetivo determinar a atividade arilesterase da PON1 e investigar sua relação com o consumo alimentar, o estado nutricional e o perfil lipídico de crianças atendidas em ambulatórios de pediatria de duas cidades do sul do Rio Grande do Sul, Brasil.

Metodologia

No período de janeiro a outubro de 2014 foi realizado um estudo transversal com crianças com idades entre 5 e 7 anos, de ambos os sexos, atendidas no Ambulatório de Pediatria da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), na cidade de Pelotas - RS, e no Ambulatório de Pediatria da Secretaria Municipal de Saúde de Pinheiro Machado - RS. Foram excluídas as crianças que apresentaram diagnóstico médico de doenças hepáticas, paralisia cerebral, displasia óssea ou neoplasias e aquelas portadoras de necessidades especiais (físicas ou motoras) e alterações genéticas, como Síndrome de Down e talassemia.

O cálculo do tamanho da amostra foi realizado no programa Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, versão 3.01 (OpenEpi). Para tanto, foram utilizados os seguintes parâmetros e estimativas: diferença de média da PON1 segundo sexo, estado nutricional e circunferência da cintura; poder de 80%; nível de confiança de 95%; acréscimo de 10% para

compensar possíveis perdas e recusas e 15% para fatores de confusão. Dessa forma, a amostra final necessária foi de 84 crianças.

Durante a coleta de dados, todas as crianças encaminhadas aos ambulatórios de pediatria tiveram seu prontuário examinado, sendo convidadas a participar do estudo aquelas que não possuíam qualquer critério de exclusão. Após esta triagem, os responsáveis devidamente esclarecidos e que autorizaram a participação das crianças no estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O assentimento da criança foi obtido oralmente e respeitado antes do início das avaliações.

Na sequência, os responsáveis responderam a um questionário contendo informações relativas ao sexo, idade e consumo alimentar da criança. Nesta mesma ocasião foi realizada a aferição de medidas antropométricas e solicitada a coleta de sangue em laboratório de análises clínicas. A amostra sanguínea coletada no laboratório foi utilizada para determinação das variáveis bioquímicas, sendo o soro preservado a fim de analisar a atividade arilesterase da PON1, definida como desfecho do estudo.

O protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina da UFPEL (504.362/2013).

Antropometria

Dados de peso e altura foram coletados utilizando uma balança plataforma digital (Welmy®) com capacidade de 150kg e precisão de 100g, e estadiômetro acoplado com capacidade de 200cm e precisão de 0,5cm. Para avaliação do estado nutricional utilizou-se o Índice de Massa Corporal (IMC) para idade em escore-z, segundo recomendação da Organização Mundial da Saúde de 2007⁽²⁰⁾, através do programa AnthroPlus⁽²¹⁾. Crianças cujo IMC-para-idade estava entre $>+1DP$ e $\leq +2DP$ foram classificadas com sobrepeso. Já aquelas com IMC-para-idade $>+2DP$ foram consideradas obesas.

A circunferência da cintura (cm) foi aferida com fita métrica inextensível. As crianças com circunferência da cintura acima do percentil 90 foram classificadas com obesidade central, conforme proposto por Freedman⁽²²⁾. As medidas antropométricas foram coletadas duas vezes, por entrevistadores treinados, sendo utilizada nas análises a média entre as duas medidas.

Consumo alimentar

O consumo alimentar foi avaliado utilizando-se o formulário de marcadores do Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional (SISVAN), proposto pelo Ministério da Saúde do Brasil para indivíduos maiores de 5 anos de idade⁽²³⁾. Este formulário possibilita conhecer, nos sete dias

anteriores ao da entrevista, o consumo de dez itens/grupos alimentares: salada crua, legumes e verduras cozidos (V&L cozidos), frutas, feijão, leite e iogurte, batata frita e salgados fritos (frituras), embutidos e hambúrgueres, bolachas e salgadinhos industrializados (salgadinhos), bolachas doces e chocolates (doces) e refrigerante. O consumo alimentar foi considerado regular se ≥ 5 dias na última semana.

Análises bioquímicas

Após jejum de 12 horas, amostras de 7ml de sangue foram coletadas em laboratório de análises clínicas, entre 8:00h e 10:00h da manhã. As amostras foram centrifugadas e o soro foi imediatamente utilizado para verificação dos lipídeos séricos. O colesterol total (CT) (Biosystems, RJ, BR), o colesterol ligado às lipoproteínas de alta densidade (HDL-C) (Biosystems, RJ, BR), e os triglicerídeos (TAG) (Doles, GO, BR) foram determinados por método colorimétrico enzimático, seguindo as instruções do fabricante. O LDL-C foi calculado pela fórmula de Friedewald: $LDL-C = CT - HDL-C - (TAG/5)$. Foram considerados adequados os valores de referência propostos na I Diretriz de Prevenção da Aterosclerose na Infância e na Adolescência, desenvolvida pela Sociedade Brasileira de Cardiologia⁽²⁴⁾.

Determinação da atividade da paraoxonase 1

Para a mensuração da atividade arilesterase da PON1, as amostras de soro foram congeladas e mantidas a -20°C até posterior análise. A atividade arilesterase da PON1 foi medida em duplicata, utilizando fenilacetato como substrato. A atividade enzimática foi calculada a partir da velocidade de formação de fenol através do aumento da absorbância a 270nm, temperatura de 25°C , em espectrofotômetro (FEMTO®). As amostras foram diluídas 1:3 em 20mM de Tampão Tris/HCl (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA), pH 8,0, contendo 1mM de CaCl_2 (Vetec Chemical Co, RJ, BR). A solução reagente foi composta pelo tampão, ao qual foi adicionado 1 mM de fenilacetato (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA). A reação foi determinada após 20 segundos de retenção e a absorbância medida por 60 segundos. Considerou-se uma unidade de atividade arilesterase da PON1 igual a $1\mu\text{M}$ de fenol/minuto e esta foi expressa em kU/L, com base no coeficiente de extinção de fenol. Amostras em branco contendo água deionizada foram utilizadas para corrigir a hidrólise não enzimática.

Análises estatísticas

Os dados coletados foram duplamente digitados no Microsoft Excel 2010 e analisados no programa *Stata* versão 12.0 (Stata Corp., College Station, USA). Inicialmente, a normalidade dos

dados foi testada a partir do teste *Shapiro-Wilk*. A descrição das variáveis foi realizada usando frequências absolutas e relativas para variáveis categóricas. Para variáveis numéricas utilizou-se média e desvio padrão (DP) e mediana e amplitude interquartil (p25-p75) no caso de variáveis assimétricas. A avaliação do desfecho segundo as principais exposições categóricas foi realizada por meio do teste *Mann-Whitney* ou *Kruskal-Wallis*, dependendo da natureza das variáveis. O grau de associação entre as variáveis bioquímicas e a atividade da PON1 foi avaliado por meio do coeficiente de correlação de *Spearman*. Adotou-se um nível de significância de 5%.

Resultados

De uma amostra inicial de 120 crianças, 39 (32,5%) não completaram integralmente o processo de coleta de dados e foram consideradas como perdas. Dentre os motivos para as perdas encontram-se o não comparecimento ao laboratório para coleta de sangue (n=34) e amostras coletadas em quantidade insuficiente para o conjunto de análises bioquímicas previamente definidas (n=5). Das 81 crianças avaliadas, 41 (50,6%) eram do sexo masculino. A mediana da atividade arilesterase da PON1 foi de 89,4kU/L, sendo semelhante entre meninos e meninas (87,6kU/L e 89,6kU/L, respectivamente; p=0,49). Em relação à idade, a mediana da atividade enzimática foi de 87,6kU/L nas crianças de 5 anos, de 91,1kU/L nas crianças de 6 anos e de 85,9kU/L naquelas com 7 anos de idade (p=0,75, dados não apresentados em tabelas e figuras). As demais características antropométricas e bioquímicas avaliadas estão apresentadas na Tabela 1.

A Tabela 2 mostra a atividade enzimática segundo o estado nutricional para o total de crianças avaliadas e estratificada por sexo. O estado nutricional mostrou-se associado de forma significativa com os valores enzimáticos apenas no sexo feminino, onde aparentemente meninas com sobrepeso apresentam maior atividade da PON1. Os valores de circunferência da cintura não se mostraram associados com a atividade enzimática (dados não apresentados em tabelas e figuras).

O consumo alimentar interferiu nos níveis enzimáticos, conforme apresentado na Tabela 3. As crianças que consumiram salada crua regularmente tiveram atividade da PON1 significativamente maior (102,6kU/L) do que aquelas que consumiram esses alimentos menos de 5 dias na semana (85,5kU/L). O consumo de frituras não foi incluído nas análises visto que apenas uma criança relatou ter consumido este tipo de alimento regularmente.

As correlações entre as concentrações dos lipídeos séricos e a atividade da PON1 também foram investigadas. As concentrações de CT (r=0,277 e p=0,01), HDL-C (r=0,262 e p=0,01) e LDL-C (r=0,238 e p=0,03) correlacionaram-se positivamente, porém de maneira fraca com a atividade da enzima (Figura 1). Já a correlação da atividade enzimática com a concentração de HDL-C foi positiva e moderada entre os meninos (r=0,374 e p=0,01), em comparação com as

meninas ($r=0,196$ e $p=0,22$), e entre os pacientes eutróficos ($r=0,318$ e $p=0,03$) quando comparados com os obesos ($r=0,178$ e $p=0,45$). Os pacientes com níveis desejáveis de HDL-C para a faixa etária estudada ($\geq 45\text{mg/dL}$) mostraram maior atividade enzimática que aqueles com $\text{HDL-C} < 45\text{mg/dL}$ ($91,1\text{kU/L}$ e $78,1\text{kU/L}$, respectivamente; $p=0,03$, dados não apresentados em tabelas e figuras).

Discussão

Ainda que a má qualidade da alimentação seja amplamente aceita como principal contribuinte para o desenvolvimento da obesidade em crianças, e que a dieta seja alvo de pesquisa em relação ao seu papel protetor na DCV, pouco se sabe sobre a atividade sérica da PON1 em crianças, sobretudo sua relação com o consumo alimentar.

A mediana da atividade da PON1 neste estudo foi de $89,4\text{kU/L}$, e como esperado, similar em ambos os sexos. Estes valores estão próximos dos encontrados em populações infantis de estudos que avaliaram a atividade arilesterase e utilizaram fenilacetato como substrato^(25 26), porém mais elevados do que os apresentados em crianças da Turquia⁽²⁷⁾. Na coorte mexicana CHAMACOS, os autores observaram que a média da atividade da PON1 nas crianças aos 5 anos foi de $84,0 \pm 22,3\text{U/L}$, aumentando para $121,5 \pm 30,3\text{U/L}$ aos 7 anos. Além disso, os autores não verificaram diferença entre os gêneros⁽²⁸⁾.

A maioria dos estudos sobre a PON1 conduzidos em populações infantis tem como foco a relação entre a atividade enzimática e o estado nutricional. Neste estudo, a associação entre a atividade enzimática e o estado nutricional foi verificada somente no sexo feminino. Muitos autores sugerem que há uma redução na atividade da enzima em crianças e adolescentes obesos quando comparados àqueles com peso normal^(25 27 29-31). Entretanto, dois trabalhos que avaliaram crianças pré-púberes e outro avaliando adolescentes mostraram que a atividade enzimática era significativamente mais elevada em crianças obesas do que naquelas com peso normal^(32 33 34).

Estas divergências entre os dados podem ser explicadas por dois principais fatores. Primeiramente, os estudos utilizaram diferentes substratos para avaliação da atividade da PON1, sendo mais comum a medida da atividade com paraoxon (atividade paraoxonase) ou fenilacetato (atividade arilesterase). Em segundo lugar, a maioria das populações investigadas foi composta por crianças e adolescentes e não podem ser totalmente definidas como pré-púberes.

Condições de ingestão calórica excessiva e obesidade podem estar relacionadas ao estresse oxidativo e, nesta situação, ativar os sistemas antioxidantes. Quando o equilíbrio oxidante-antioxidante está comprometido, várias mudanças adversas ocorrem no organismo predispondo ao dano endotelial⁽³⁵⁾. Apesar de ser evidente que a obesidade e o desenvolvimento das DCV estão

relacionados aos hábitos alimentares, não foram encontrados registros de estudos prévios que tenham relacionado a atividade da PON1 ao consumo alimentar em crianças.

Alterações na atividade sérica da enzima têm sido relatadas de acordo com o consumo de certos nutrientes em adultos. Há evidências de que o consumo de colesterol e das vitaminas C e E esteja positivamente relacionado à PON1, contribuindo com aproximadamente 6% de sua variação enzimática⁽¹⁵⁾. No presente estudo, crianças com consumo regular de salada crua tiveram maior atividade da enzima. Esta elevação poderia ser explicada por uma melhora na defesa antioxidativa em resposta ao conteúdo de carotenoides destes alimentos, resultando na proteção da PON1⁽¹⁶⁾. Corroborando com estes resultados, dados mostraram que o consumo de frutas e vegetais por pacientes diabéticos elevou o nível sérico de carotenoides influenciando os níveis enzimáticos da PON1⁽³⁶⁾.

Os alimentos ricos em polifenóis seriam também responsáveis por um aumento na expressão gênica da PON1 e na ligação da enzima ao HDL-C. Esses resultados mostram que além das propriedades antioxidantes, os polifenóis estariam envolvidos em um mecanismo molecular com efeitos benéficos na prevenção de DCV^(37 38).

Estudos realizados com populações infantis e que relacionaram a dieta com a atividade enzimática limitam-se a duas intervenções. A primeira, conduzida em um pequeno número de crianças húngaras com excesso de peso, mostrou que, após 2 semanas de um programa de exercícios físicos e dieta hipocalórica rica em fibras, não houve alteração da atividade arilesterase⁽³⁹⁾. O segundo estudo, realizado na Turquia com crianças e adolescentes, mostrou que, após 6 meses de dieta de restrição calórica, houve uma melhora nos níveis enzimáticos de crianças com excesso de peso, aproximando-se dos níveis de PON1 das crianças eutróficas⁽⁴⁰⁾.

Por outro lado, nossos resultados diferem de estudos que avaliaram a relação entre o consumo de vegetais e a atividade da PON1 em adultos e mostraram uma baixa atividade da enzima associada com uma alta ingestão de vegetais^(18 19). Possivelmente, outros fatores tais como o genótipo e estilo de vida, tenham interferido nestes resultados.

Observou-se também correlações significativas entre os níveis de colesterol total, HDL-C e a atividade da PON1. A relação com o HDL-C foi mais forte em crianças eutróficas e isto pode ser devido à presença de produtos de peroxidação lipídica circulantes em pacientes obesos^(41 42). A atividade da PON1 nas crianças com concentrações desejáveis de HDL-C foi significativamente maior do que naquelas com HDL-C baixo. O incremento do número de partículas de HDL e, consequentemente, de ApoA-I e J podem estar implicados nesse aumento. Também foi verificada uma relação positiva entre os níveis da enzima e de CT e LDL-C. Outros estudos confirmam estes

resultados mostrando correlação positiva e significativa entre a atividade da PON1 com CT, LDL-C, HDL-C e APOA-I^(15 43 44).

Uma possível limitação do estudo refere-se ao próprio método de avaliação dietética. Se, por um lado, o uso do questionário de frequência de consumo alimentar resumido apresenta vantagens sobre versões ampliadas, por outro lado ele pode levar a uma subestimação do consumo de alguns alimentos, o que pode ter ocorrido no caso das frituras.

Conclusão

Os resultados mostram que o consumo regular de salada crua esteve associado a uma maior atividade da PON1 em crianças, o que poderia influenciar a capacidade antioxidante da enzima, melhorando seu potencial antiaterogênico já nesta faixa etária. A relação entre a atividade enzimática e o estado nutricional requer maiores investigações, pois foi verificada diferença somente para o sexo feminino. A maior atividade da PON1 observada em crianças com maior concentração de HDL-C sugere uma relação já evidenciada em outros trabalhos. A dosagem da atividade da PON1 é rápida e de baixo custo. Esta análise pode servir como alternativa para o acompanhamento do risco cardiovascular já na infância e, junto à anamnese nutricional, basear a conduta dos profissionais na prevenção e tratamento dos fatores de risco para DCV. Dada a importância desta enzima, mais estudos avaliando as interações gene-ambiente, especialmente as ligadas ao consumo alimentar, são necessários para melhor elucidar os determinantes da atividade enzimática da PON1.

Suporte financeiro

Esta pesquisa contou com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-MEC/BR).

Conflito de interesses

Nenhum.

Autoria

Contribuição dos autores: G.L.U foi responsável por todas as etapas do trabalho, realizou revisão de literatura, coleta e análise de dados, mensuração da atividade enzimática e redação do artigo; L.C.M orientou a análise dos dados e colaborou na redação do artigo; A.S contribui com mensuração da atividade enzimática; S.C.V orientou todas as etapas do estudo e revisou a versão final do artigo.

TABELAS

Tabela 1. Características demográficas, antropométricas e bioquímicas de crianças entre 5 e 7 anos de idade, Pelotas, RS, Brasil, 2015. (*n* 81)

(Valores em média e desvio padrão; mediana e amplitude interquartil)

| Variável | Média | DP |
|------------------------------------|----------------|----------------|
| Idade (anos) | 5,9 | 0,8 |
| Altura (cm) | 117,4 | 7,6 |
| CT (mg/dL) | 156,7 | 32,0 |
| HDL-C (mg/dL) | 51,6 | 13,8 |
| LDL-C (mg/dL)* | 90,2 | 29,7 |
| | Mediana | p25-p75 |
| Peso (kg) | 23,7 | 20,5-26,6 |
| Circunferência da cintura (cm)* | 57,0 | 53,0-63,0 |
| IMC (kg/m ²) | 16,7 | 15,1-18,9 |
| TAG (mg/dL) | 63,0 | 52,0-83,0 |
| Atividade arilesterase PON1 (kU/L) | 89,4 | 67,5-103,7 |

CT, colesterol total; HDL-C, colesterol HDL; LDL-C, colesterol LDL; IMC, Índice de Massa Corporal; TAG, triglicerídeos; PON1, paraoxonase1.

* Informação ignorada para uma criança.

Tabela 2. Atividade arilesterase da PON1 segundo estado nutricional, para todas as crianças de 5 a 7 anos de idade avaliadas e estratificado por sexo, Pelotas, RS, Brasil, 2015. (*n* 81)

(Número de sujeitos e porcentagens; valores em mediana e amplitude interquartil)

| | Estado nutricional | | | | | | | | | valor-p* |
|---------|--------------------|---------|------------|-----------|---------|------------|-----------|---------|------------|----------|
| | Eutrofia | | | Sobrepeso | | | Obesidade | | | |
| | n(%) | Mediana | p25-p75 | n(%) | Mediana | p25-p75 | n(%) | Mediana | p25-p75 | |
| Todos | 46(56,8) | 82,6 | 64,2-96,1 | 15(18,5) | 103,7 | 76,9-113,0 | 20(24,7) | 96,0 | 79,7-102,1 | 0,02 |
| Meninas | 22(55,0) | 78,8 | 64,4-90,4 | 7(17,5) | 105,9 | 98,2-132,0 | 11(27,5) | 94,9 | 81,7-102,4 | 0,01 |
| Meninos | 24(58,5) | 85,5 | 62,5-102,8 | 8(19,5) | 98,4 | 68,1-109,5 | 9(22,0) | 100,4 | 66,5-101,8 | 0,58 |

*Teste de Kruskal-wallis

Tabela 3. Atividade arilesterase da PON1 segundo a frequência de consumo alimentar em crianças de 5 a 7 anos de idade, Pelotas, RS, Brasil, 2015. (*n* 81)

(Número de sujeitos e porcentagens; valores em mediana e amplitude interquartil)

| Consumo alimentar | n (%) | PON1 | | valor-p* |
|------------------------|-----------|---------|------------|----------|
| | | Mediana | p25-p75 | |
| Salada crua | | | | |
| <5 dias/semana | 65 (80,2) | 85,5 | 65,0-101,4 | 0,003 |
| ≥5 dias/semana | 16 (19,8) | 102,6 | 92,5-120,8 | |
| V&L cozidos | | | | |
| <5 dias/semana | 71 (87,7) | 87,6 | 66,9-103,4 | 0,36 |
| ≥5 dias/semana | 10 (12,3) | 93,9 | 78,7-129,4 | |
| Frutas | | | | |
| <5 dias/semana | 36 (44,4) | 85,9 | 64,3-101,9 | 0,47 |
| ≥5 dias/semana | 45 (55,6) | 90,4 | 69,1-105,3 | |
| Leite e iogurte | | | | |
| <5 dias/semana | 9 (11,1) | 72,3 | 66,5-85,5 | 0,08 |
| ≥5 dias/semana | 72 (88,9) | 90,8 | 67,6-105,4 | |
| Feijão | | | | |
| <5 dias/semana | 20 (24,7) | 85,9 | 68,2-101,4 | 0,74 |
| ≥5 dias/semana | 61 (75,3) | 90,4 | 66,9-104,1 | |
| Embutidos | | | | |
| <5 dias/semana | 74 (91,4) | 90,2 | 67,5-103,7 | 0,94 |
| ≥5 dias/semana | 7 (8,6) | 85,9 | 66,9-113,0 | |
| Salgadinhos | | | | |
| <5 dias/semana | 48 (59,3) | 90,8 | 68,2-102,1 | 0,97 |
| ≥5 dias/semana | 33 (40,7) | 87,6 | 66,6-109,2 | |
| Doces | | | | |
| <5 dias/semana | 54 (66,7) | 89,6 | 67,5-101,8 | 0,66 |
| ≥5 dias/semana | 27 (33,3) | 87,6 | 66,9-109,2 | |
| Refrigerante | | | | |
| <5 dias/semana | 75 (92,6) | 89,4 | 67,5-104,1 | 0,95 |
| ≥5 dias/semana | 6 (7,4) | 88,0 | 65,0-100,9 | |

PON1, paraoxonase 1; V&L, verduras e legumes. *Teste de Mann-Whitney.

FIGURAS

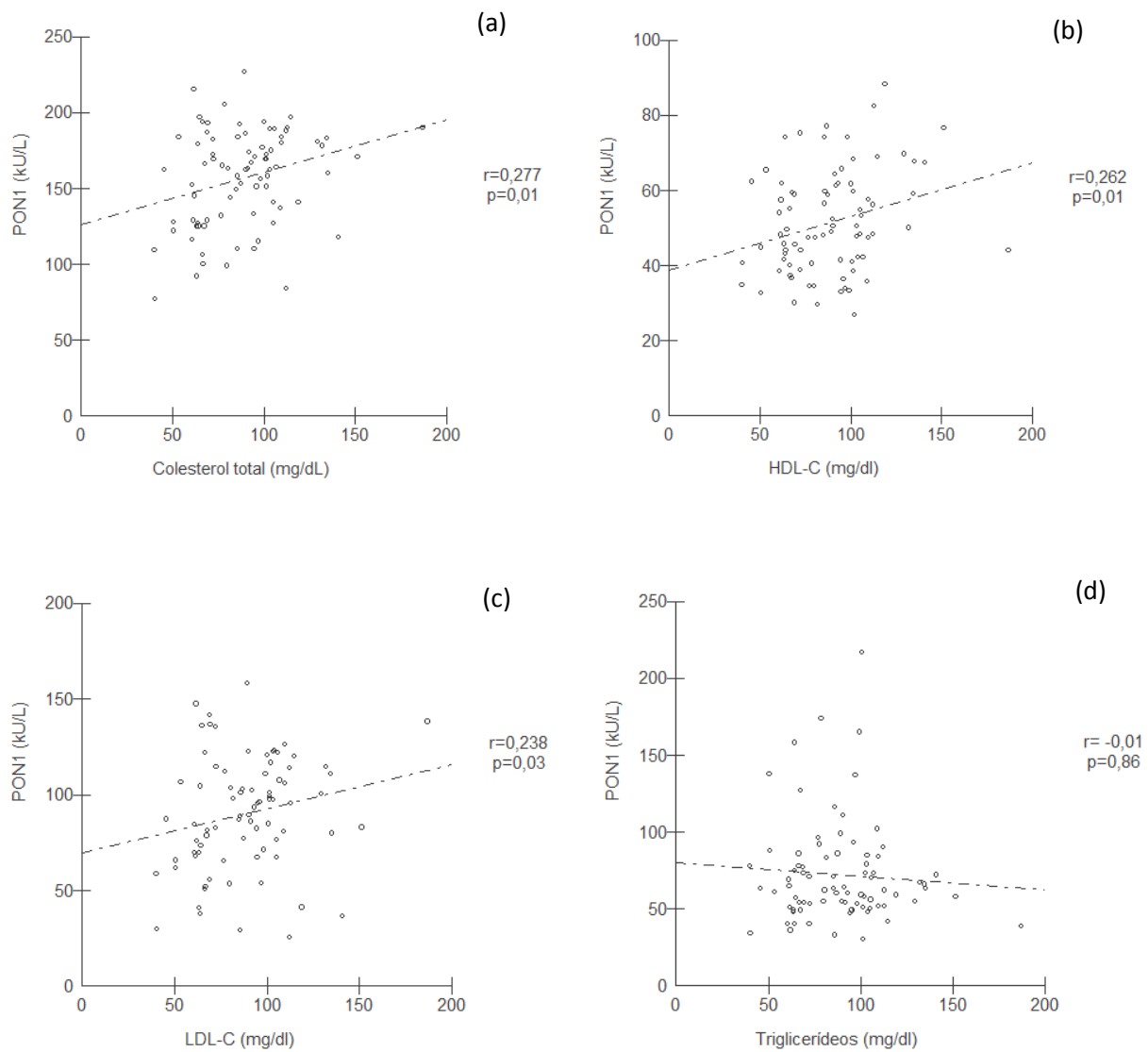


Figura 1. Atividade arilesterase da PON1 e sua relação com os parâmetros do perfil lipídico de crianças de 5 a 7 anos de idade. Pelotas, RS, Brasil, 2015 (n 81): (a) CT; (b) HDL-C; (c) LDL-C; (d) Triglicerídeos. HDL-C, colesterol HDL; LDL-C, colesterol LDL. Correlação de *Spearman*.

Referências

1. Magnussen CG, Koskinen J, Chen W *et al.* (2010) Pediatric metabolic syndrome predicts adulthood metabolic syndrome, subclinical atherosclerosis, and type 2 diabetes mellitus but is no better than body mass index alone: the Bogalusa Heart Study and the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Circulation* 122(16):1604-11.
2. Guardamagna O, Abello F, Cagliero P *et al.* (2012) Impact of nutrition since early life on cardiovascular prevention. *Italian journal of pediatrics* 38:73.
3. Tuzcu EM, Kapadia SR, Tutar E *et al.* (2001) High prevalence of coronary atherosclerosis in asymptomatic teenagers and young adults: evidence from intravascular ultrasound. *Circulation* 103(22):2705-10.
4. Kelishadi R. (2010) Inflammation-induced atherosclerosis as a target for prevention of cardiovascular diseases from early life. *The open cardiovascular medicine journal* 4:24-9.
5. Daniels SR, Greer FR. (2008) Lipid screening and cardiovascular health in childhood. *Pediatrics* 122(1):198-208.
6. Panagiotakos DB, Pitsavos C, Kokkinos P *et al.* (2003) Consumption of fruits and vegetables in relation to the risk of developing acute coronary syndromes; the CARDIO2000 case-control study. *Nutrition journal* 2:2.
7. Okuda N, Miura K, Okayama A *et al.* (2015) Fruit and vegetable intake and mortality from cardiovascular disease in Japan: a 24-year follow-up of the NIPPON DATA80 Study. *European journal of clinical nutrition*.
8. Rubinstein AL, Irazola VE, Calandrelli M *et al.* (2015) Multiple cardiometabolic risk factors in the Southern Cone of Latin America: A population-based study in Argentina, Chile, and Uruguay. *International journal of cardiology* 183C:82-88.
9. Price HC, Nicholls A. (2014) Primary prevention of CVD: diet. *BMJ clinical evidence* 2014.
10. Upritchard JE, Schuurman CR, Wiersma A *et al.* (2003) Spread supplemented with moderate doses of vitamin E and carotenoids reduces lipid peroxidation in healthy, nonsmoking adults. *The American journal of clinical nutrition* 78(5):985-92.
11. Kim DS, Maden SK, Burt AA *et al.* (2013) Dietary fatty acid intake is associated with paraoxonase 1 activity in a cohort-based analysis of 1,548 subjects. *Lipids in health and disease* 12:183.
12. Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. (2001) Paraoxonase and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 21(4):473-80.
13. Mackness B, Durrington P, McElduff P *et al.* (2003) Low paraoxonase activity predicts coronary events in the Caerphilly Prospective Study. *Circulation* 107(22):2775-9.
14. Schrader C, Rimbach G. (2011) Determinants of paraoxonase 1 status: genes, drugs and nutrition. *Current medicinal chemistry* 18(36):5624-43.
15. Kim DS, Burt AA, Ranchalis JE *et al.* (2012) Dietary cholesterol increases paraoxonase 1 enzyme activity. *Journal of lipid research* 53(11):2450-8.

16. Costa LG, Vitalone A, Cole TB *et al.* (2005) Modulation of paraoxonase (PON1) activity. *Biochemical pharmacology* 69(4):541-50.
17. Jarvik GP. (2002) Vitamin C and E Intake Is Associated With Increased Paraoxonase Activity. *Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology* 22(8):1329-33.
18. Rantala M, Silaste ML, Tuominen A *et al.* (2002) Dietary modifications and gene polymorphisms alter serum paraoxonase activity in healthy women. *The Journal of nutrition* 132(10):3012-7.
19. Kleemola P, Freese R, Jauhiainen M *et al.* (2002) Dietary determinants of serum paraoxonase activity in healthy humans. *Atherosclerosis* 160(2):425-32.
20. de Onis M, Onyango AW, Borghi E *et al.* (2007) Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. *Bulletin of the World Health Organization* 85(9):660-7.
21. World Health Organization (2007) Anthro plus for personal computers: software for assessing growth and development of the world's children: Geneva: WHO.
22. Freedman DS, Serdula MK, Srinivasan SR *et al.* (1999) Relation of circumferences and skinfold thicknesses to lipid and insulin concentrations in children and adolescents: the Bogalusa Heart Study. *The American journal of clinical nutrition* 69(2):308-17.
23. Brasil, SISVAN (2008) Protocolos do Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional-SISVAN na assistência à saúde: Ministério da Saúde Brasília.
24. Cardiologia SBd, Metabologia SBdEe. (2005) I Diretriz de Prevenção da Aterosclerose na Infância e na Adolescência. *Arq. Bras. Cardiol* 85(supl.6):3-36.
25. Koncsos P, Seres I, Harangi M *et al.* (2010) Human paraoxonase-1 activity in childhood obesity and its relation to leptin and adiponectin levels. *Pediatric research* 67(3):309-13.
26. Sumegova K, Nagyova Z, Waczulikova I *et al.* (2007) Activity of paraoxonase 1 and lipid profile in healthy children. *Physiol Res* 56(3):351-7.
27. Cayir Y, Cayir A, Turan MI *et al.* (2014) Antioxidant status in blood of obese children: the relation between trace elements, paraoxonase, and arylesterase values. *Biological trace element research* 160(2):155-60.
28. Huen K, Harley K, Brooks J *et al.* (2009) Developmental changes in PON1 enzyme activity in young children and effects of PON1 polymorphisms. *Environmental health perspectives* 117(10):1632-8.
29. Krzystek-Korpacka M, Patryn E, Hotowy K *et al.* (2013) Paraoxonase (PON)-1 Activity in Overweight and Obese Children and Adolescents: Association with Obesity-Related Inflammation and Oxidative Stress. *Advances in clinical and experimental medicine: official organ Wroclaw Medical University* 22(2):229.
30. Zaki ME, El-Bassyouni H, Kamal S *et al.* (2014) Association of serum paraoxonase enzyme activity and oxidative stress markers with dyslipidemia in obese adolescents. *Indian journal of endocrinology and metabolism* 18(3):340-4.

31. Ferre N, Feliu A, Garcia-Heredia A *et al.* (2013) Impaired paraoxonase-1 status in obese children. Relationships with insulin resistance and metabolic syndrome. *Clinical biochemistry* 46(18):1830-6.
32. Garcés C, López-Simón L, Rubio R *et al.* (2007) Análisis de la actividad paraoxonasa (PON1) y de los polimorfismos PON1 192 y PON1 55 en la población prepuberal del Estudio Cuatro Provincias*. *Clínica e investigación en arteriosclerosis* 19(6):287-92.
33. Gonzalez V, Huen K, Venkat S *et al.* (2012) Cholinesterase and paraoxonase (PON1) enzyme activities in Mexican-American mothers and children from an agricultural community. *Journal of exposure science & environmental epidemiology* 22(6):641-8.
34. Eren E, Abuhandan M, Solmaz A *et al.* (2014) Serum paraoxonase/arylesterase activity and oxidative stress status in children with metabolic syndrome. *Journal of clinical research in pediatric endocrinology* 6(3):163-8.
35. Seres I, Bajnok L, Harangi M *et al.* (2010) Alteration of PON1 activity in adult and childhood obesity and its relation to adipokine levels. *Adv Exp Med Biol* 660:129-42.
36. Daniels JA, Mulligan C, McCance D *et al.* (2014) A randomised controlled trial of increasing fruit and vegetable intake and how this influences the carotenoid concentration and activities of PON-1 and LCAT in HDL from subjects with type 2 diabetes. *Cardiovascular diabetology* 13:16.
37. Gouedard C, Barouki R, Morel Y. (2004) Dietary polyphenols increase paraoxonase 1 gene expression by an aryl hydrocarbon receptor-dependent mechanism. *Molecular and cellular biology* 24(12):5209-22.
38. Fuhrman B, Volkova N, Aviram M. (2010) Pomegranate juice polyphenols increase recombinant paraoxonase-1 binding to high-density lipoprotein: studies in vitro and in diabetic patients. *Nutrition* 26(4):359-66.
39. Koncsos P, Seres I, Harangi M *et al.* (2011) Favorable effect of short-term lifestyle intervention on human paraoxonase-1 activity and adipokine levels in childhood obesity. *J Am Coll Nutr* 30(5):333-9.
40. Cayir A, Turan MI, Gurbuz F *et al.* (2014) The effect of lifestyle change and metformin therapy on serum arylesterase and paraoxonase activity in obese children. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism: JPEM*.
41. Aviram M, Rosenblat M, Billecke S *et al.* (1999) Human serum paraoxonase (PON 1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free radical biology & medicine* 26(7-8):892-904.
42. Ramos-Arellano LE, Munoz-Valle JF, De la Cruz-Mosso U *et al.* (2014) Circulating CD36 and oxLDL levels are associated with cardiovascular risk factors in young subjects. *BMC cardiovascular disorders* 14:54.
43. Ruperez AI, Lopez-Guarnido O, Gil F *et al.* (2013) Paraoxonase 1 activities and genetic variation in childhood obesity. *The British journal of nutrition* 110(9):1639-47.
44. Agirbasli M, Tanrikulu A, Erkus E *et al.* (2014) Serum paraoxonase-1 activity in children: the effects of obesity and insulin resistance. *Acta cardiologica* 69(6):679-85.

ARTIGO 2

Associação entre a atividade enzimática e o polimorfismo C(-107)T do gene da paraoxonase 1 (PON1), estado nutricional e perfil lipídico em crianças de 5 a 7 anos de idade.

Gabriela L. Uliano^{1*}, Ludmila Correa Muniz¹, Augusto Schneider¹, Sandra C. Valle¹

¹Faculdade de Nutrição, UFPEL - Universidade Federal de Pelotas, Rua Gomes Carneiro, n°1, Campus Universitário Porto, Pelotas, RS, Brasil.

* Autor correspondente: G. Uliano, 55 53 91389301, email gabiuliano@hotmail.com

Este artigo será traduzido para a língua inglesa e submetido à revista Genes & Nutrition.

Resumo

A enzima paraoxonase 1 (PON1) tem função antioxidante e protege contra lesões endoteliais. Sua atividade sérica pode ser influenciada por diversos parâmetros incluindo polimorfismos genéticos e estado nutricional. O estudo teve como objetivo investigar a atividade enzimática e o polimorfismo C(-107)T do gene da paraoxonase 1 e suas relações com o estado nutricional e o perfil lipídico em crianças. Foi realizado um estudo transversal, incluindo 73 crianças com idades entre 5 e 7 anos do Rio Grande do Sul, Brasil. A determinação do polimorfismo PON1 C(-107)T foi realizada pela amplificação por reação em cadeia da polimerase seguida de digestão com enzima de restrição. A atividade arilesterase da PON1 foi medida utilizando fenilacetato como substrato. Avaliou-se também o Índice de massa corporal (IMC) para idade, calculado em escore-z, e o perfil lipídico sérico. A atividade da enzima foi maior em crianças com excesso de peso comparadas às eutróficas. A frequência genotípica não diferiu entre os dois grupos. O genótipo -107CC mostrou valores mais elevados de atividade enzimática do que aqueles apresentados pelos portadores do alelo T, mesmo após estratificação por estado nutricional. As concentrações séricas de HDL foram maiores apenas entre as crianças eutróficas portadoras do genótipo -107CC em comparação às portadoras do alelo T. A associação entre o polimorfismo genético, a atividade da enzima e as concentrações de HDL em crianças eutróficas sugere que os fatores genéticos e suas interações com o ambiente estão relacionados a um perfil protetor contra o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Palavras-chave: PON1: Polimorfismo genético: Crianças: Estado nutricional: Perfil lipídico

Introdução

A paraoxonase 1 (PON1) é uma esterase cálcio-dependente, sintetizada principalmente no fígado, que circula no sangue ligada à lipoproteína de alta densidade (HDL). A PON1 tem uma expressiva ação antioxidante, prevenindo a peroxidação lipídica da lipoproteína de baixa densidade (LDL), e o aumento de sua atividade reflete em redução do dano endotelial e da doença cardiovascular (DCV) (Mackness et al. 2003).

A enzima é membro de uma família gênica composta por três genes (PON1, PON2, PON3) localizada no cromossomo humano 7. O gene da PON1 exibe 9 exons e codifica uma proteína de 354 aminoácidos (Primo-Parmo et al. 1996). Originalmente, a PON1 foi identificada por hidrolisar organofosfatos e seu nome faz referência à habilidade da enzima para degradar paraoxon, o metabólito tóxico do pesticida parathion. Além da atividade organofosfatase, a PON1 exibe ainda atividade arilesterase (fenilacetato) e lactonase (lactonas), de acordo com o substrato hidrolisado (Durrington et al. 2001). Os polimorfismos genéticos, em especial a mutação Q192R, afetam a eficiência catalítica da enzima frente alguns substratos como, por exemplo, o paraoxon. Portanto, o uso de fenilacetato fornece uma melhor indicação da atividade enzimática (Costa et al. 2005).

A atividade sérica da PON1 varia entre indivíduos sendo influenciada por diversos parâmetros, incluindo polimorfismos genéticos, estado nutricional, dieta, estilo de vida, idade e estado de saúde (Schrader and Rimbach 2011). Dentre as alterações genéticas que influenciam a atividade da enzima, o polimorfismo caracterizado na região promotora -107 exerce efeitos extremamente significativos. Este polimorfismo contribui com até 25% das variações na expressão da PON1 em adultos da raça branca e o alelo -107C proporciona níveis de PON1 até duas vezes mais elevados que aqueles observados para o alelo -107T (Brophy et al. 2001; Deakin et al. 2003; Huen et al. 2010). Apesar desta constatação, os resultados sobre a associação deste polimorfismo com o risco de DCV são contraditórios. Pesquisadores mostraram que os portadores do alelo C apresentaram um risco elevado de DCV (Najafi et al. 2009), ao passo que Campo e colaboradores (2004a) relataram um risco aumentado para portadores da variante -107T.

Até o momento, dados sobre a atividade da PON1 em crianças e sua associação a fatores de risco para DCV são escassos. Apenas um estudo objetivou genotipar e identificar a frequência do polimorfismo C(-107)T para uma população infantil. Os resultados mostraram que a frequência deste polimorfismo foi muito semelhante para ambos os alelos. A atividade arilesterase da PON1 foi significativamente maior nos portadores do genótipo -107CC do que nos portadores do alelo T (Huen et al. 2010). Na população infantil brasileira, a frequência deste polimorfismo genético ainda é desconhecida. Portanto, o presente estudo tem como objetivo investigar a distribuição do

polimorfismo C(-107)T do gene da paraoxonase 1 e sua relação com a atividade enzimática, o estado nutricional e o perfil lipídico em uma população de crianças entre 5 e 7 anos de idade, atendidas em ambulatorios de pediatria de duas cidades do sul do Rio Grande do Sul, Brasil.

Metodologia

A amostra deste trabalho faz parte de um estudo transversal sobre a atividade da PON1 e fatores associados em crianças entre 5 e 7 anos de idade, do Rio Grande do Sul (RS), Brasil. O estudo foi realizado no período de Janeiro a Outubro de 2014 com crianças atendidas no Ambulatório de Pediatria da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), na cidade de Pelotas – RS, Brasil e no Ambulatório de Pediatria da Secretaria Municipal de Saúde de Pinheiro Machado – RS, Brasil. Foram excluídas as crianças que apresentaram diagnóstico médico de doenças hepáticas, paralisia cerebral, displasia óssea ou neoplasias e aquelas portadoras de necessidades especiais (físicas ou motoras) e alterações genéticas, como Síndrome de Down e talassemia.

Toda criança encaminhada aos ambulatorios de pediatria no período da coleta de dados foi avaliada, sendo convidadas a participar do estudo aquelas que não possuíam qualquer critério de exclusão. Após esta triagem, os responsáveis devidamente esclarecidos e que autorizaram a participação das crianças incluídas no estudo, assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O assentimento da criança foi obtido oralmente e respeitado antes do início das avaliações. Em seguida, informações relativas a idade e sexo da criança foram coletadas do prontuário e utilizadas como variáveis de exposição.

Nesta mesma ocasião foram realizadas medidas antropométricas e solicitada a coleta de sangue em laboratório de análises clínicas. O material biológico coletado foi acondicionado em dois tubos. O primeiro tubo foi utilizado para determinação das variáveis bioquímicas de exposição e mensuração da atividade arilesterase da PON1. O outro tubo, adicionado de EDTA, serviu para a extração de DNA e identificação do polimorfismo genético. As análises referentes à enzima e seu polimorfismo foram realizadas no Laboratório de Nutrigenômica da Faculdade de Nutrição/UFPEL.

O protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina da UFPEL (504.362/2013).

Antropometria

Dados de peso e altura foram coletados utilizando uma balança plataforma digital (Welmy®) com capacidade de 150kg e precisão de 100g, e estadiômetro acoplado com capacidade de 200cm e precisão de 0,5cm. As medidas antropométricas foram coletadas duas vezes, por entrevistadores

treinados, sendo utilizada nas análises a média entre as duas medidas. Para avaliação do estado nutricional utilizou-se o Índice de Massa Corporal (IMC) para idade em escore-z, segundo recomendação da Organização Mundial da Saúde de 2007 (de Onis et al. 2007), através do programa AnthroPlus (Organization 2007). Crianças com IMC-para-idade $>+1DP$ foram classificadas com excesso de peso.

Análises bioquímicas

Lipídeos séricos

Após jejum de 12 horas, amostras de 7ml de sangue foram coletadas em laboratório de análises clínicas, entre 8:00h e 10:00h da manhã. As amostras foram centrifugadas e o soro foi imediatamente utilizado para verificação dos lipídeos séricos. O colesterol total (CT) (Biosystems, RJ, BR), o colesterol ligado às lipoproteínas de alta densidade (HDL-C) (Biosystems, RJ, BR), e os triglicerídeos (TAG) (Doles, GO, BR) foram determinados por método colorimétrico enzimático, seguindo as instruções do fabricante. O LDL-C foi calculado pela fórmula de Friedewald: $LDL-C = CT - HDL-C - (TAG/5)$. Foram considerados adequados os valores de referência propostos na Diretriz de Prevenção da Aterosclerose na Infância e na Adolescência, desenvolvida pela Sociedade Brasileira de Cardiologia (Cardiologia and Metabologia 2005).

Análise da atividade da PON1

Para a mensuração da atividade arilesterase da PON1, as amostras de soro foram congeladas e mantidas a $-20^{\circ}C$ até posterior análise. A atividade arilesterase da PON1 foi medida em duplicata, utilizando fenilacetato como substrato. A atividade enzimática foi calculada a partir da velocidade de formação de fenol através do aumento da absorbância a 270nm, temperatura de $25^{\circ}C$, em espectrofotômetro (FEMTO®). As amostras foram diluídas 1:3 em 20mM de Tampão Tris/HCl (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA), pH 8,0, contendo 1mM de $CaCl_2$ (Vetec Chemical Co, RJ, Br). A solução reagente foi composta pelo tampão, ao qual foi adicionado 1mM de fenilacetato (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA). A reação foi determinada após 20 segundos de retenção e a absorbância medida por 60 segundos. Considerou-se uma unidade de atividade arilesterase da PON1 igual a $1\mu M$ de fenol/minuto e esta foi expressa em kU/L, com base no coeficiente de extinção de fenol. Amostras em branco contendo água deionizada foram utilizadas para corrigir a hidrólise não enzimática.

Genotipagem

O DNA foi extraído das amostras de sangue contendo EDTA de acordo com procedimento padrão e quantificado em espectrofotômetro. A determinação do polimorfismo foi obtida por reação em cadeia da polimerase (PCR), seguido por digestão com enzima de restrição (*Bsr*BI) e eletroforese em gel de agarose.

A amplificação por PCR do polimorfismo PON1 T(-107)C foi feita com o uso dos primers: forward 5'AGCTAGCTGCGGACCCGGCGGGGAGGaG3' e reverse 5'GGCTGCAGCCCTCACCACAACCC3' a uma temperatura de anelamento de 67°C, por 35 ciclos. A letra minúscula no primer forward indica um erro de pareamento que introduz um sítio de restrição para a enzima *Bsr*BI (New England Bio Labs, Cambridge, UK), pois não há sítio de restrição específico cortando a sequência original do DNA. Após a digestão, o alelo C foi identificado pelos fragmentos de 28 e 212 pb, enquanto o alelo T resultou em um fragmento de 240 pb não digerido (Figura 1). Os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose (Kasvi, Paraná, BR) de 3%, corados com SYBR Safe (Applied Biosystems) (Campo et al. 2004a).

Análises estatísticas

Os dados coletados foram duplamente digitados no Microsoft Excel 2010 e analisados no programa STATA versão 12.0 (Stata Corp., College Station, USA). Inicialmente, a normalidade dos dados foi testada a partir do teste *Shapiro-Wilk*. A descrição das variáveis foi realizada usando frequências absolutas e relativas para variáveis categóricas. Para variáveis numéricas utilizou-se média e desvio padrão (DP) e mediana e amplitude interquartil (p25-75) no caso de variáveis assimétricas. A atividade da PON1 segundo as principais exposições categóricas foi avaliada por teste t de Student, Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis, dependendo da natureza das variáveis. As frequências alélicas foram deduzidas da distribuição genotípica. O teste do χ^2 foi utilizado para testar o equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), com as frequências observadas e as esperadas obtidas. A distribuição do estado nutricional entre os genótipos também foi comparada pelo teste do χ^2 . Adotou-se um nível de significância de 5%.

Resultados

Para estas análises foram incluídas 73 crianças, sendo 37 (50,7%) do sexo masculino. A mediana da atividade arilesterase da PON1 foi de 86,5(66,6-103,6)kU/L, sendo semelhante entre meninos e meninas (p=0,50, dados não apresentados). A Tabela 1 mostra as principais

características demográficas e bioquímicas da população estudada, estratificada por estado nutricional. Do total de crianças avaliadas, 41,1% (n=30) apresentava excesso de peso. Essas crianças mostraram atividade da PON1 mais elevada do que as eutróficas (p=0,02).

A frequência alélica foi de 60% para o alelo C e 40% para o alelo T. O polimorfismo PON1 C(-107)T se mostrou em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2=0,38$). A frequência genotípica e a atividade enzimática segundo o genótipo são apresentadas na Tabela 2. A análise revelou que o genótipo mais frequente foi o heterozigoto CT (52,1%), enquanto o menos comum foi o TT (13,7%). As crianças de genótipo CC apresentaram valores mais elevados de atividade enzimática, enquanto que as heterozigotas mostraram valores intermediários.

A análise da frequência dos genótipos CC, CT e TT entre crianças eutróficas e com excesso de peso não mostrou diferença significativa, indicando que não houve associação entre este polimorfismo e o excesso de peso (Figura 2).

Não foram detectadas diferenças significativas entre os genótipos do polimorfismo da PON1 com relação a idade e sexo (dados não apresentados). Para as relações com a atividade enzimática e o perfil lipídico, os pacientes portadores do alelo T foram agrupados em uma única categoria e comparados com os homozigotos para o alelo C. Mesmo após a estratificação por estado nutricional, os valores de atividade enzimática mantiveram-se significativamente mais elevados entre os portadores do genótipo CC. Os níveis de CT, LDL-C e TAG não diferiram entre os grupos. Já as concentrações séricas de HDL-C foram significativamente maiores nas crianças eutróficas portadoras do genótipo CC em comparação às portadoras do alelo T (Tabela 3).

Discussão

Observou-se uma amostra com média de idade próxima aos 6 anos e um perfil lipídico dentro do recomendado para a população pediátrica (Cardiologia and Metabologia 2005). A média da atividade da PON1 na população deste estudo foi 88,9kU/L, e como esperado, similar em ambos os sexos. Estes valores estão próximos às médias para populações infantis que avaliaram a atividade arilesterase utilizando fenilacetato como substrato (Koncsos et al. 2010; Sumegova et al. 2007), porém mais elevados do que a média apresentada em crianças da Turquia (Cayir et al. 2014). Na coorte mexicana CHAMACOS, os autores observaram que a média da atividade da PON1 nas crianças aos 5 anos foi de 84,0±22,3U/L, aumentando para 121,5±30,3U/L aos 7 anos. Além disso, os autores também não verificaram diferença entre os gêneros (Huen et al. 2009).

As frequências genotípica e alélica da amostra estudada também foram semelhantes às encontradas nas crianças mexicanas (Huen et al. 2009). Os pesquisadores dosaram a atividade

arilesterase da PON1 e, assim como no presente estudo, verificaram que os portadores do genótipo CC mostraram atividade enzimática significativamente mais elevada do que as crianças portadoras do alelo T (Huen et al. 2010). Em outras investigações com populações de adultos caucasianos, os alelos C e T apresentam frequências próximas a 50% (Brophy et al. 2001; Suehiro et al. 2000).

Esta relação entre o genótipo e a atividade enzimática se manteve mesmo após a estratificação por estado nutricional. Os polimorfismos genéticos influenciam a concentração enzimática afetando a expressão da proteína e sua atividade específica. Sabe-se que a atividade arilesterase é diretamente proporcional à concentração enzimática (Draganov and La Du 2004), e indivíduos portadores do alelo T podem ter parte da produção da enzima afetada. Há ainda evidências de um mecanismo molecular envolvendo o polimorfismo C(-107)T do gene da PON1 e o fator de transcrição Sp1. Isso condiz com a associação entre o alelo C e maiores concentração e atividade sérica da enzima, indicando que o fator de transcrição se liga a esta região do promotor, mas com uma afinidade para a variante -107C. A variante -107T interrompe a sequência de reconhecimento do fator de transcrição Sp1, resultando em menor concentração de PON1 para este genótipo (Deakin et al. 2003).

Por outro lado, fatores ambientais como dieta e sedentarismo podem exercer maior influência sobre o estado nutricional do que a herdabilidade, de acordo com a fase do desenvolvimento infantil. Os pesquisadores da coorte CHAMACOS mostraram que a relação entre o polimorfismo PON1 Q192R e a obesidade infantil foi mais forte aos 2 anos de idade do que aos 5 anos (Huen et al. 2013).

A relação entre o excesso de peso na infância e os polimorfismos da PON1 ainda é pouco investigada (Huen et al. 2013; Ruperez et al. 2013). Não há relatos de estudos sobre a associação do polimorfismo C(-107)T e o estado nutricional nesta população. Como a distribuição da frequência genotípica foi semelhante entre crianças eutróficas e com excesso de peso, os resultados sugerem que este polimorfismo não exerceu influência sobre o estado nutricional.

Muitos autores verificaram que há uma redução na atividade da enzima em crianças e adolescentes obesos quando comparados àqueles com peso normal (Cayir et al. 2014; Ferre et al. 2013; Koncsos et al. 2010; Krzystek-Korpacka et al. 2013; Zaki et al. 2014). Entretanto, os resultados deste estudo condizem com outros dois trabalhos que avaliaram crianças de uma faixa etária muito semelhante, em que a atividade enzimática era significativamente mais elevada em obesos do que em crianças com peso normal (Garcés et al. 2007; Gonzalez et al. 2012). Um estudo com adolescentes também mostrou resultados similares aos verificados neste trabalho (Eren et al. 2014).

É provável que a natureza complexa da obesidade, que depende tanto de fatores genéticos quanto ambientais, seja a causa para as divergências em pesquisas sobre sua relação com os polimorfismos genéticos e a atividade da PON1 na infância. Neste sentido, a influência da relação gene-ambiente sobre a atividade da PON1 requer estudos adicionais.

Crianças com peso normal e homozigotas para o alelo C tiveram níveis de HDL-C significativamente mais elevados do que aquelas portadoras do alelo T. Estes resultados estão em concordância com um estudo realizado com idosos italianos (Campo et al. 2004b). Uma possível interpretação para esta associação refere-se a uma maior concentração de PON1 ligada às apolipoproteínas do HDL que pode desempenhar um papel no metabolismo desta lipoproteína, melhorando sua funcionalidade (Campo et al. 2004b). Isto mostra que as crianças eutróficas com o genótipo mais favorável à atividade da PON1 também apresentam melhores níveis de HDL-C, sugerindo um perfil de maior proteção frente a possíveis danos oxidativos e, consequentemente, prevenindo o desenvolvimento das lesões endoteliais iniciais.

Conclusão

Os resultados mostram que a frequência alélica foi de 60% para o alelo C e de 40% para o alelo T. Crianças com o genótipo CC para o gene da PON1 apresentaram maior atividade enzimática do que as portadoras do alelo T, mesmo após a estratificação por estado nutricional. As concentrações séricas de HDL-C foram maiores nas crianças eutróficas com o genótipo mais favorável à atividade da PON1. A associação entre o genótipo CC, maior atividade da enzima e concentrações de HDL-C elevadas em crianças eutróficas sustentam a ideia de que a predisposição genética somada a um peso saudável gera um perfil protetor contra o desenvolvimento de DCV.

Conflito de interesses

Gabriela Uliano, Augusto Schneider, Ludmila Muniz e Sandra Valle declaram que não há conflito de interesses.

Referências

- Brophy VH, Jampsa RL, Clendenning JB, McKinstry LA, Jarvik GP, Furlong CE (2001) Effects of 5' regulatory-region polymorphisms on paraoxonase-gene (PON1) expression American journal of human genetics 68:1428-1436 doi:10.1086/320600
- Campo S et al. (2004a) The paraoxonase promoter polymorphism (-107)T>C is not associated with carotid intima-media thickness in Sicilian hypercholesterolemic patients Clinical biochemistry 37:388-394 doi:10.1016/j.clinbiochem.2003.12.012
- Campo S et al. (2004b) 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 doi:10.1016/j.exger.2004.03.017
- Cardiologia SBd, Metabologia SBdEe (2005) I Diretriz de Prevenção da Aterosclerose na Infância e na Adolescência Arq Bras Cardiol 85:3-36
- Cayir Y et al. (2014) Antioxidant status in blood of obese children: the relation between trace elements, paraoxonase, and arylesterase values Biological trace element research 160:155-160 doi:10.1007/s12011-014-0038-0
- Costa LG, Vitalone A, Cole TB, Furlong CE (2005) Modulation of paraoxonase (PON1) activity Biochemical pharmacology 69:541-550 doi:10.1016/j.bcp.2004.08.027
- de Onis M, Onyango AW, Borghi E, Siyam A, Nishida C, Siekmann J (2007) Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents Bulletin of the World Health Organization 85:660-667
- Deakin S, Leviev I, Brulhart-Meynet MC, James RW (2003) Paraoxonase-1 promoter haplotypes and serum paraoxonase: a predominant role for polymorphic position - 107, implicating the Sp1 transcription factor The Biochemical journal 372:643-649 doi:10.1042/BJ20021670
- Draganov DI, La Du BN (2004) Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology 369:78-88 doi:10.1007/s00210-003-0833-1
- Durrington PN, Mackness B, Mackness MI (2001) Paraoxonase and atherosclerosis Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology 21:473-480
- Eren E, Abuhandan M, Solmaz A, Taskin A (2014) Serum paraoxonase/arylesterase activity and oxidative stress status in children with metabolic syndrome Journal of clinical research in pediatric endocrinology 6:163-168 doi:10.4274/Jcrpe.1454
- Ferre N et al. (2013) Impaired paraoxonase-1 status in obese children. Relationships with insulin resistance and metabolic syndrome Clinical biochemistry 46:1830-1836 doi:10.1016/j.clinbiochem.2013.08.020
- Garcés C, López-Simón L, Rubio R, Benavente M, Cano B, Viturro E, De Oya M (2007) Análisis de la actividad paraoxonasa (PON1) y de los polimorfismos PON1 192 y PON1 55 en la población prepuberal del Estudio Cuatro Provincias* Clínica e investigación en arteriosclerosis 19:287-292

- Gonzalez V et al. (2012) Cholinesterase and paraoxonase (PON1) enzyme activities in Mexican-American mothers and children from an agricultural community *Journal of exposure science & environmental epidemiology* 22:641-648 doi:10.1038/jes.2012.61
- Huen K, Harley K, Beckman K, Eskenazi B, Holland N (2013) Associations of PON1 and genetic ancestry with obesity in early childhood *PloS one* 8:e62565 doi:10.1371/journal.pone.0062565
- Huen K, Harley K, Bradman A, Eskenazi B, Holland N (2010) Longitudinal changes in PON1 enzymatic activities in Mexican-American mothers and children with different genotypes and haplotypes *Toxicol Appl Pharmacol* 244:181-189 doi:10.1016/j.taap.2009.12.031
- Huen K, Harley K, Brooks J, Hubbard A, Bradman A, Eskenazi B, Holland N (2009) Developmental changes in PON1 enzyme activity in young children and effects of PON1 polymorphisms *Environmental health perspectives* 117:1632-1638 doi:10.1289/ehp.0900870
- Koncsos P et al. (2010) Human paraoxonase-1 activity in childhood obesity and its relation to leptin and adiponectin levels *Pediatric research* 67:309-313 doi:10.1203/PDR.0b013e3181c9fb66
- Krzystek-Korpacka M et al. (2013) Paraoxonase (PON)-1 Activity in Overweight and Obese Children and Adolescents: Association with Obesity-Related Inflammation and Oxidative Stress *Advances in clinical and experimental medicine: official organ Wroclaw Medical University* 22:229
- Mackness B, Durrington P, McElduff P, Yarnell J, Azam N, Watt M, Mackness M (2003) Low paraoxonase activity predicts coronary events in the Caerphilly Prospective Study *Circulation* 107:2775-2779 doi:10.1161/01.CIR.0000070954.00271.13
- Najafi M, Gohari LH, Firoozrai M (2009) Paraoxonase 1 gene promoter polymorphisms are associated with the extent of stenosis in coronary arteries *Thrombosis research* 123:503-510 doi:10.1016/j.thromres.2008.03.004
- Organization WH (2007) *Anthro plus for personal computers: software for assessing growth and development of the world's children*. Geneva: WHO,
- Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN (1996) The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family *Genomics* 33:498-507
- Ruperez AI et al. (2013) Paraoxonase 1 activities and genetic variation in childhood obesity *The British journal of nutrition* 110:1639-1647 doi:10.1017/S0007114513001967
- Schrader C, Rimbach G (2011) Determinants of paraoxonase 1 status: genes, drugs and nutrition *Current medicinal chemistry* 18:5624-5643
- Suehiro T et al. (2000) A polymorphism upstream from the human paraoxonase (PON1) gene and its association with PON1 expression *Atherosclerosis* 150:295-298
- Sumegova K, Nagyova Z, Waczulikova I, Zitnanova I, Durackova Z (2007) Activity of paraoxonase 1 and lipid profile in healthy children *Physiol Res* 56:351-357

Zaki ME, El-Bassyouni H, Kamal S, El-Gammal M, Youness E (2014) Association of serum paraoxonase enzyme activity and oxidative stress markers with dyslipidemia in obese adolescents Indian journal of endocrinology and metabolism 18:340-344 doi:10.4103/2230-8210.131173

FIGURAS

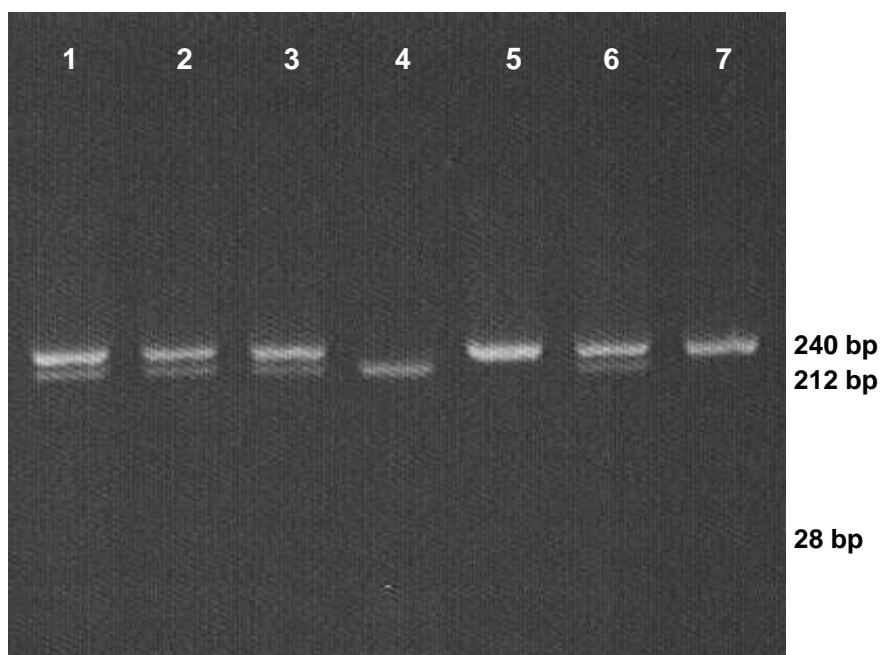


Figura 1. Determinação do polimorfismo na região T(-107) do gene da PON1 por PCR e digestão com enzima de restrição BsrBI. Linha 4: CC; linhas 1, 2, 3 e 6: CT; linhas 5 e 7: TT. O fragmento de 28 pb não é visível em gel de agarose 3%.

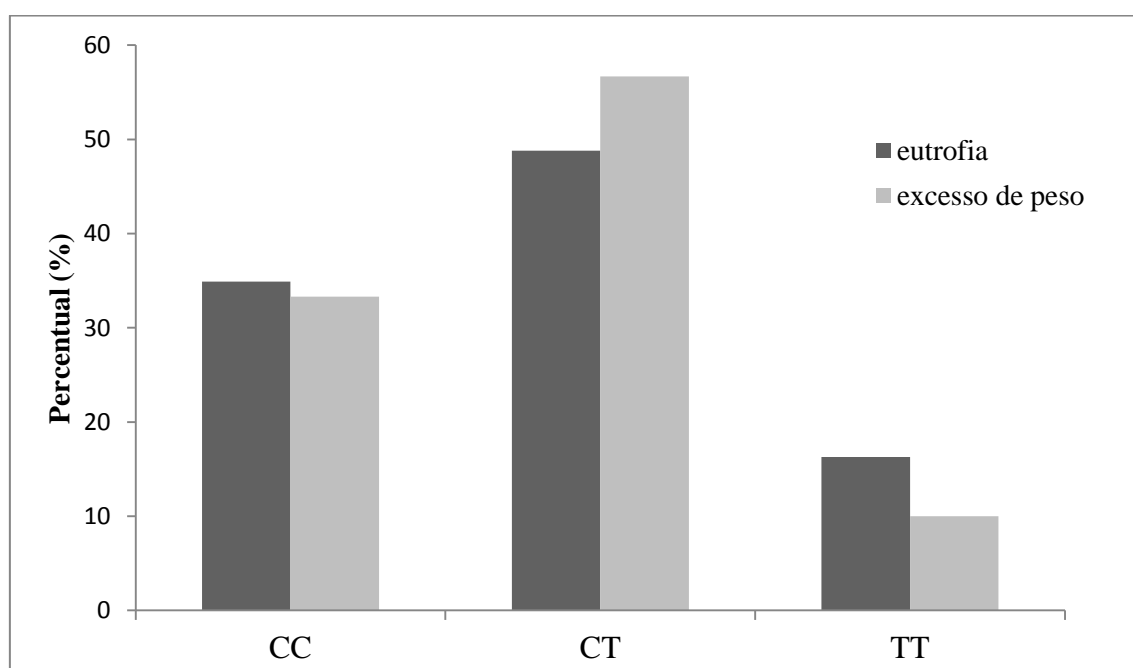


Figura 2. Distribuição percentual dos genótipos do polimorfismo do promotor C(-107)T do gene da PON1 em crianças eutróficas e com excesso de peso entre 5 e 7 anos de idade (n=73), Pelotas, RS, Brasil, 2015.

TABELAS

Tabela 1. Características demográficas e bioquímicas das crianças eutróficas e com excesso de peso entre 5 e 7 anos de idade (n=73). Pelotas, RS, Brasil, 2015.

| Variável | Eutrofia (n=43) | Excesso de peso (n=30) | Valor-p |
|-----------------------------|--------------------------|---------------------------|---------|
| Proporção de sexo; fem/masc | 20/23 | 16/14 | 0,66 |
| | Média (DP) | Média (DP) | |
| Idade (anos) | 5,9 (0,8) | 5,9 (0,8) | 0,87 |
| HDL-C (mg/dL) | 52,8 (12,8) | 50,0 (15,0) | 0,39 |
| LDL-C (mg/dL) | 85,1 (30,3) | 93,7 (28,8) | 0,23 |
| | Mediana (p25-p75) | Mediana (p25-p75) | |
| CT (mg/dL) | 162,0 (125,0-179,0) | 165,0(137,0-187,0) | 0,29 |
| TAG (mg/dL) | 60,0(50,0-86,0) | 71,5(56,0-84,0) | 0,17 |
| Atividade PON1 (kU/L)* | 77,6(64,1-96,1) | 97,2(78,7-105,5) | 0,02 |

HDL-C, colesterol HDL; LDL-C, colesterol LDL; CT, colesterol total; TAG, triglicerídeos; PON1, paraoxonase 1. *Teste de Mann-Whitney, $p<0,05$.

Tabela 2. Frequência genotípica e atividade sérica da PON1 de acordo com o genótipo das crianças estudadas entre 5 e 7 anos de idade (n=73). Pelotas, RS, Brasil, 2015.

| PON1 C(-107)T | Genótipo | | Atividade PON1 (kU/L) | |
|---------------|----------|----------------|-----------------------|------------|
| | n | Frequência (%) | Mediana | p25-75 |
| CC | 25 | 34,2 | 103,0 | 83,4-113,9 |
| CT | 38 | 52,1 | 83,3 | 66,5-97,2 |
| TT | 10 | 13,7 | 68,0 | 63,5-78,7 |
| Total | 73 | 100,0 | 86,5 | 66,6-103,6 |

*Teste de Kruskal-Wallis, valor- $p<0,01$.

Tabela 3. Relação do polimorfismo C(-107)T do gene da PON1 com o perfil lipídico entre crianças eutróficas e com excesso de peso entre 5 e 7 anos de idade (n=73), Pelotas, RS, Brasil, 2015.

| | | PON1 C(-107)T | | Valor-p |
|------------------------------------|-----------------|---------------------|---------------------|-----------------|
| | | CC | CT+TT | |
| Mediana (p25-75) | | | | |
| Atividade PON1 (kU/L) ^a | Eutrofia | 94,6 (72,3-114,8) | 68,5 (63,5-86,7) | <0,01 |
| | Excesso de peso | 103,6 (100,9-113,0) | 94,0 (73,0-102,4) | 0,04 |
| CT (mg/dl) ^a | Eutrofia | 162,0 (141,0-188,0) | 165,0 (125,0-175,0) | 0,38 |
| | Excesso de peso | 165,5 (154,0-183,0) | 167,0 (132,0-187,0) | 0,48 |
| TAG (mg/dl) ^a | Eutrofia | 63,0 (52,0-71,0) | 54,0 (48,0-86,0) | 0,75 |
| | Excesso de peso | 78,0 (62,0-85,0) | 62,0 (55,0-78,0) | 0,40 |
| Média (DP) | | | | |
| HDL-C (mg/dl)* | Eutrofia | 59,8(11,6) | 49,0(12,0) | <0,01 |
| | Excesso de peso | 49,0(16,6) | 50,5(14,6) | 0,80 |
| LDL-C (mg/dl)* | Eutrofia | 85,7(28,1) | 84,7(31,8) | 0,92 |
| | Excesso de peso | 101,0(17,9) | 89,8(32,9) | 0,32 |

PON1, paraoxonase; CT, colesterol total; TAG, triglicerídeos; HDL-C, colesterol HDL; LDL-C, colesterol LDL.

^aVariáveis assimétricas, teste de Mann-Whitney; *Variáveis simétricas, teste t de student.

CONCLUSÕES

Os resultados mostram que crianças entre 5 e 7 anos de idade, com o genótipo -107CC, consumo regular de salada crua e níveis desejáveis de HDL têm atividade da PON1 mais elevada. Além disso, as concentrações séricas de HDL-C foram significativamente maiores nas crianças eutróficas com o genótipo mais favorável à atividade da PON1. A associação entre a variante -107C, maior atividade da enzima, consumo regular de salada crua e concentrações de HDL-C elevadas em crianças eutróficas sustentam a ideia de que a predisposição genética somada a um peso saudável gera um perfil protetor contra o desenvolvimento de DCV. Dada a importância desta enzima, mais estudos avaliando as interações gene-ambiente, especialmente as ligadas ao consumo alimentar, são necessários para melhor elucidar os determinantes da atividade enzimática da PON1.

REFERÊNCIAS

AGIRBASLI, M.; TANRIKULU, A.; ERKUS, E.; AZIZY, M.; SEVIM, B. A.; KAYA, Z., et al. Serum paraoxonase-1 activity in children: the effects of obesity and insulin resistance. **Acta Cardiol**, v.69, n.6, p.679-85, 2014.

AGGOUN, Yacine. Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. **Pediatric Research**, v.61, n.6, p.653–9, 2007.

AŞKAR, Tünay; BÜYÜKLEBLEBİCİ, Olga. Paraoxonase: A New Biochemical Marker of Oxidant- Antioxidant Status in Atherosclerosis. In: Oxidative Stress - Molecular Mechanisms and Biological Effects. InTech: Lushchak, 2012. p.145-54. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/oxidative-stress-molecular-mechanisms-and-biological-effects>> Acesso em: 5 set 2013.

AUDI KOVSZKY, M.; PADOS, G.; SERES, I.; HARANGI, M.; FÜLÖP, P.; KATONA, E., et al. Changes in lipid profile and paraoxonase activity in obese patients as a result of orlistat treatment. **Orvosi Hetilap**, v.142, n.50, p.2779–83, 2001.

AVIRAM, M.; ROSENBLAT, M.; BILLECKE, S.; EROGUL, J.; SORENSON, R.; BISGAIER, C. L., et al. Human serum paraoxonase (PON 1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. **Free Radic Biol Med**, v.26, n.7-8, p.892-904, 1999.

AVIRAM, M.; ROSENBLAT, M.; BISGAIER, C. L.; NEWTON, R. S.; PRIMO-PARMO, S. L.; LA DU, B. N. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. **The Journal of Clinical Investigation**, v.101, n.8, p.1581, 1998.

BLATTER-GARIN, M.; KALIX, B.; DE PREE, S.; JAMES, R. Aspirin use is associated with higher serum concentrations of the anti-oxidant enzyme, paraoxonase-1. **Diabetologia**, v.46, n.4, p.594–5, 2003.

BRASIL; SISVAN. Protocolos do Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional-SISVAN na assistência à saúde: Ministério da Saúde Brasília 2008.

BROPHY, V.; JAMPSA R.; CLENDENNING J.; MCKINSTY L.; JARVIK G.; FURLONG C. Effects of 5' regulatory-region polymorphisms on paraoxonase-gene (PON1) expression. **The American Journal of Human Genetics**, v.68, p.1428-36, 2001.

CAMPO, S.; SARDO, M.; TRIMARCHI, G.; BONAIUTO, M.; CASTALDO, M.; FONTANA, L., et al. The paraoxonase promoter polymorphism (-107)T>C is not associated with carotid intima-media thickness in Sicilian hypercholesterolemic patients. **Clinical Biochemistry**, v.37, n.5, p.388-94, 2004.

CAMPO, S.; SARDO, M. A.; TRIMARCHI, G.; BONAIUTO, M.; FONTANA, L.; CASTALDO, M., et al. Association between serum paraoxonase (PON1) gene promoter T(-107)C polymorphism, PON1 activity and HDL levels in healthy Sicilian octogenarians. **Exp Gerontol**, v.39, n.7, p.1089-94, 2004.

CARVALHO, D.; PAIVA, A.; MELO, A.; RAMOS, A.; MEDEIROS, J.; MEDEIROS, C., et al. Perfil lipídico e estado nutricional de adolescentes. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v.10, n.4, p. 491-8, 2007.

CAYIR, A.; TURAN, M. I.; GURBUZ, F.; KURT, N.; YILDIRIM, A. The effect of lifestyle change and metformin therapy on serum arylesterase and paraoxonase activity in obese children. **J Pediatr Endocrinol Metab**, 2014.

CAYIR, Y.; CAYIR, A.; TURAN, M. I.; KURT, N.; KARA, M.; LALOGLU, E., et al. Antioxidant status in blood of obese children: the relation between trace elements, paraoxonase, and arylesterase values. **Biol Trace Elem Res**, v.160, n.2, p.155-60, 2014.

CHISOLM, Guy M.; STEINBERG, Daniel. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. **Free Radical Biology and Medicine**, v.28, n.12, p.1815-26, 2000.

COLE, T.; JAMPSA, R.; WALTER, B.; ARNDT, T.; RICHTER, R.; SHIH, D., et al. Expression of human paraoxonase (PON1) during development. **Pharmacogenetics and Genomics**, v.13, n.6, p.357-64, 2003.

COSTA, L.; GIORDANO, G.; FURLONG, C. Pharmacological and dietary modulators of paraoxonase 1 (PON1) activity and expression: the hunt goes on. **Biochemical Pharmacology**, v.81, n.3, p.337-44, 2011.

COSTA, L.; VITALONE, A.; COLE, T.; FURLONG, C. Modulation of paraoxonase (PON1) activity. **Biochemical Pharmacology**, v.69, p.541–50, 2005.

DANIELS, J. A.; MULLIGAN, C.; MCCANCE, D.; WOODSIDE, J. V.; PATTERSON, C.; YOUNG, I. S., et al. A randomised controlled trial of increasing fruit and vegetable intake and how this influences the carotenoid concentration and activities of PON-1 and LCAT in HDL from subjects with type 2 diabetes. **Cardiovasc Diabetol**, v.13, p.16. 2014.

DANIELS, Stephen R.; GREER, Frank R. Lipid screening and cardiovascular health in childhood. **Pediatrics**, v.122, n.1, p.198-208, 2008.

DE ROOS, N.; SCHOUTEN, E.; SCHEEK, L.; VAN TOL, A.; KATAN, M. Replacement of dietary saturated fat with *trans* fat reduces serum paraoxonase activity in healthy men and women. **Metabolism**, v.51, n.12, p.1534-37, 2002.

DEAKIN, Sara; GUERNIER, Sophie; JAMES, Richard W. Pharmacogenetic interaction between paraoxonase-1 gene promoter polymorphism C-107T and statin. **Pharmacogenetics and Genomics**, v.17, n.6, p.451-57, 2007.

DEAKIN, S.; LEVIEV, I.; BRULHART-MEYNET, M. C.; JAMES, R. W. Paraoxonase-1 promoter haplotypes and serum paraoxonase: a predominant role for polymorphic position -107, implicating the Sp1 transcription factor. **Biochem J**, v.372, n.2, p.643-9, 2003.

DRAGANOV, D. I.; LA DU, B. N. Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v.369, n.1, p.78-88, 2004.

DUNET, V.; RUIZ, J.; ALLENBACH, G.; IZZO, P.; JAMES, R.; PRIOR, J. Effects of paraoxonase activity and gene polymorphism on coronary vasomotion. **EJNMMI Research**, v.1, n.1, p.1-7, 2011.

DURRINGTON, P.; MACKNESS, B.; MACKNESS, M. Paraoxonase and Atherosclerosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v.21, p.473-80, 2001.

EREN, E.; ABUHANDAN, M.; SOLMAZ, A.; TASKIN, A. Serum paraoxonase/arylesterase activity and oxidative stress status in children with metabolic syndrome. **J Clin Res Pediatr Endocrinol**, v.6, n.3, p.163-8, 2014.

FERRE, N.; FELIU, A.; GARCIA-HEREDIA, A.; MARSILLACH, J.; PARIS, N.; ZARAGOZA-JORDANA, M., et al. Impaired paraoxonase-1 status in obese children. Relationships with insulin resistance and metabolic syndrome. **Clin Biochem**, v.46, n.18, p.1830-6, 2013.

FERRETTI, G.; BACCHETTI, T.; MORONI, C.; SAVINO, S.; LIUZZI, A.; BALZOLA, F., et al. Paraoxonase activity in high-density lipoproteins: A comparison between healthy and obese females. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.90, p.1728-33, 2005.

FORTI, Neusa; DIAMENT, Jayme. Apolipoprotein B and A-I: cardiovascular risk factor? **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v.53, n.3, p.276-82, 2007.

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.

FREEDMAN, D.; SERDULA, M.; SRINIVASAN, S.; BERENSON, G. Relation of circumferences and skinfold thicknesses to lipid and insulin concentrations in children and adolescents: the Bogalusa Heart Study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.69, n.2, p.308-17, 1999.

FUHRMAN, Bianca; VOLKOVA, Nina; AVIRAM, Michael. Oxidative stress increases the expression of the CD36 scavenger receptor and the cellular uptake of oxidized low-density lipoprotein in macrophages from atherosclerotic mice: protective role of antioxidants and of paraoxonase. **Atherosclerosis**, v.161, n.2, p.307-16, 2002.

GARCÉS, C.; LOPEZ-SIMON, L.; RUBIO, R.; BENAVENTE, M.; CANO, B.; ORTEGA, H., et al. High-density lipoprotein cholesterol and paraoxonase 1 (PON1) genetics and serum PON1 activity in prepubertal children in Spain. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v.46, n.6, p.809–13, 2008.

GARCÉS, C.; LÓPEZ-SIMÓN, L.; RUBIO, R.; BENAVENTE, M.; CANO, B.; VITURRO, E., et al. Análisis de la actividad paraoxonasa (PON1) y de los polimorfismos PON1 192 y PON1 55 en la población prepuberal del Estudio Cuatro Provincias. **Clínica e Investigación en Arteriosclerosis**, v.19, n.6, p.287-92, 2007.

GONZALEZ, V.; HUEN, K.; VENKAT, S.; PRATT, K.; XIANG, P.; HARLEY, K. G., et al. Cholinesterase and paraoxonase (PON1) enzyme activities in Mexican-American mothers and children from an agricultural community. **J Expo Sci Environ Epidemiol**, v.22, n.6, p.641-8, 2012.

GOUÉDARD, C.; KOUM-BESSON, N.; BAROUKI, R.; MOREL, Y. Opposite regulation of the human paraoxonase-1 gene PON-1 by fenofibrate and statins. **Molecular Pharmacology**, v.63, n.4, p.945-56, 2003.

GUARDAMAGNA, O.; ABELLO, F.; CAGLIERO, P.; LUGHETTI, L. Impact of nutrition since early life on cardiovascular prevention. **Ital J Pediatr**, v.38, p.73. 2012.

HOLLAND, N.; FURLONG, C.; BASTAKI, M.; RICHTER, R.; BRADMAN, A.; HUEN, K., et al. Paraoxonase polymorphisms, haplotypes, and enzyme activity in Latino mothers and newborns. **Environmental Health Perspectives**, v.114, n.7, p.985–91, 2006.

HUEN, K., HARLEY, K., BECKMAN, K., ESKENAZI, B., HOLLAND, N. Associations of PON1 and genetic ancestry with obesity in early childhood. **PloS one**, v.8, n.5, p.e 62565, 2013.

HUEN, K.; HARLEY, K.; BRADMAN, A.; ESKENAZI, B.; HOLLAND, N. Longitudinal changes in PON1 enzymatic activities in Mexican–American mothers and children with different genotypes and haplotypes. **Toxicology and applied Pharmacology**, v.244, n.2, p.181-9, 2010.

HUEN, K.; HARLEY, K.; BROOKS, J.; HUBBARD, A.; BRADMAN, A.; ESKENAZI, B., et al. Developmental Changes in PON1 Enzyme Activity in Young Children and Effects of PON1 Polymorphisms. **Environmental Health Perspectives**, v.117, n.10, 2009.

JAMES, Richard W.; LEVIEV, Ilia; RIGHETTI, Alberto. Smoking is associated with reduced serum paraoxonase activity and concentration in patients with coronary artery disease. **Circulation**, v.101, n.19, p.2252-57, 2000.

JAMES, R.; LEVIEV, I.; RUIZ, J.; PASSA, P.; FROGUEL, P.; GARIN, M-C. Promoter polymorphism T(-107)C of the paraoxonase PON1 gene is a risk factor for coronary heart disease in type 2 patients. **Diabetes**, v.49, p.1390–93, 2000.

JARVIK, G. P., et al. Vitamin C and E Intake Is Associated With Increased Paraoxonase Activity. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.22, n.8, p.1329-1333. 2002.

KARIKAS, G.; KRIEBARDIS, A.; SAMARA, I.; SCHULPIS, K.; PAPACHRISTODOULOU, M.; FYTOU-PALLIKARI, A. Serum homocysteine levels and paraoxonase 1 activity in preschool aged children in Greece. **Clinical Chemical Laboratory Medicine**, v.44, n.5, p.623-7, 2006.

KELISHADI, Roya. Inflammation-induced atherosclerosis as a target for prevention of cardiovascular diseases from early life. **The Open Cardiovascular Medicine Journal**, v.4, p.24–29, 2010.

KIM, D. S.; BURT, A. A.; RANCHALIS, J. E.; RICHTER, R. J.; MARSHALL, J. K.; NAKAYAMA, K. S., et al. Dietary cholesterol increases paraoxonase 1 enzyme activity. **J Lipid Res**, v.53, n.11, p.2450-8, 2012.

KIM, D. S.; MADEN, S. K.; BURT, A. A.; RANCHALIS, J. E.; FURLONG, C. E.; JARVIK, G. P. Dietary fatty acid intake is associated with paraoxonase 1 activity in a cohort-based analysis of 1,548 subjects. **Lipids Health Dis**, v.12, p.183. 2013.

KLEEMOLA, P.; FREESE, R.; JAUHIAINEN, M.; PAHLMAN, R.; ALFTHAN, G.; MUTANEN, M. Dietary determinants of serum paraoxonase activity in healthy humans. **Atherosclerosis**, v.160, p.425–32, 2002.

KONCSOS, P.; SERES, I.; HARANGI, M.; ILLYÉS, I.; JÓZSA, L.; GÖNCZI, F., et al. Human paraoxonase-1 activity in childhood obesity and its relation to leptin and adiponectin levels. **Pediatric research**, v.67, n.3, p.309-13, 2010.

KONCSOS, P.; SERES, I.; HARANGI, M.; PALL, D.; JOZSA, L.; BAJNOK, L., et al. Favorable effect of short-term lifestyle intervention on human paraoxonase-1 activity and adipokine levels in childhood obesity. **J Am Coll Nutr**, v.30, n.5, p.333-9, 2011.

KONTUSH A.; CHANTEPIE S.; CHAPMAN M. J. Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v.23, p.1881-88, 2003.

KONTUSH, Anatol; CHAPMAN, M. John. Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis. **Pharmacological Reviews**, v.58, n.3, p.342-74, 2006.

KOTA, S.; MEHER, L.; JAMMULA, S.; KRISHNA, S.; MODI, K. Implications of serum paraoxonase activity in obesity, diabetes mellitus, and dyslipidemia. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v.17, n.3, p.402, 2013.

KRZYSZEK-KORPACKA, M.; PATRYN, E.; HOTOWY, K. Paraonase-1 Activity in Overweight and Obese Children and Adolescents: Association with Obesity-Related Inflammation and Oxidative Stress. **Advances and Clinical Experimental Medicine**, v.22, n.2, p.229–36, 2013.

KUDCHODKAR, B.; LACKO, A.; DORY, L.; FUNGWE, T. Dietary fat modulates serum paraoxonase 1 activity in rats. **Journal of Nutrition**, v.130, p.2427–33, 2000.

M LOU-BONAFONTE, J.; FITO, M.; COVAS, M.; FARRAS, M.; OSADA, J. HDL-related mechanisms of olive oil protection in cardiovascular disease. **Current Vascular Pharmacology**, v.10, n.4, p.392-409, 2012.

MACKNESS, B.; DURRINGTON, P.; MCELDUFF, P.; YARNELL, J.; AZAM, N.; WATT, M., et al. Low paraoxonase activity predicts coronary events in the Caerphilly Prospective Study. **Circulation**, v.107, p.2775-79, 2003.

MADAMANCHI, N.; HAKIM, Z.; RUNGE, M. Oxidative stress in atherogenesis and arterial thrombosis: the disconnect between cellular studies and clinical outcomes. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.3, n.2, p.254-67, 2005.

MAGNUSSEN, C. G.; KOSKINEN, J.; CHEN, W.; THOMSON, R.; SCHMIDT, M. D.; SRINIVASAN, S. R., et al. Pediatric metabolic syndrome predicts adulthood metabolic syndrome, subclinical atherosclerosis, and type 2 diabetes mellitus but is no better than body mass index alone: the Bogalusa Heart Study and the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. **Circulation**, v.122, n.16, p.1604-11, 2010.

MARTÍNEZ-SALAZAR, M.; ALMENARES-LÓPEZ, D.; GARCÍA-JIMÉNEZ, S.; SÁNCHEZ-ALEMÁN, M.; JUANTORENA-UGÁS, A.; RÍOS, C., et al. Relationship between the paraoxonase (PON1) L55M and Q192R polymorphisms and obesity in a Mexican population: a pilot study. **Genes & Nutrition**, v.6, n.4, p.361-68, 2011.

MUELLER, C.; LAUDE, K.; MCNALLY J.; HARRISON D. Redox mechanisms in blood vessels. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v.2, p.274–8, 2005.

NAJAFI, Mohammad; GOHARI, Ladan Hosseani; FIROOZRAI, Mohsen. Paraoxonase 1 gene promoter polymorphisms are associated with the extent of stenosis in coronary arteries. **Thrombosis Research**, v.123, n.3, p.503-10, 2009.

NAPOLI, C.; CRUDELE, V.; SORICELLI, A.; AL-OMRAN, M.; VITALE, N.; INFANTE, T., et al. Primary Prevention of Atherosclerosis: A Clinical Challenge for the Reversal of Epigenetic Mechanisms? **Circulation**, v.125, n.19, p.2363-73, 2012.

NAVAB, M.; HAMA, S.; VAN LENTEN, B.; FONAROW, G.; CARDINEZ, C.; CASTELLANI, L., et al. Mildly oxidized LDL induces an increased apolipoprotein J/paraoxonase ratio. **Journal of Clinical Investigation**, v.99, n.8, p.2005–19, 1997.

OKUDA, N.; MIURA, K.; OKAYAMA, A.; OKAMURA, T.; ABBOTT, R. D.; NISHI, N., et al. Fruit and vegetable intake and mortality from cardiovascular disease in Japan: a 24-year follow-up of the NIPPON DATA80 Study. **Eur J Clin Nutr**, 2015.

ONIS, M.; ONYANGO, A.; BORGHINI, E.; SIYAM, A.; NISHIDA, C.; SIEKMANN, J. Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. **Bulletin of the World Health Organization**, v.85, n.9, p.660-7, 2007.

OTOCKA-KMIECIK, Aneta; ORŁOWSKA-MAJDAK, Monika. The role of genetic (PON1 polymorphism) and environmental factors, especially physical activity, in antioxidant function of paraoxonase. **Journal cover**, v.67, 2013.

PANAGIOTAKOS, D. B.; PITSAVOS, C.; KOKKINOS, P.; CHRYSOHOOU, C.; VAVURANAKIS, M.; STEFANADIS, C., et al. Consumption of fruits and vegetables in relation to the risk of developing acute coronary syndromes; the CARDIO2000 case-control study. **Nutr J**, v.2, p.2, 2003.

Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF 2008-2009): Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil. IBGE, 2010.

PRÉCOURT, L. P.; AMRE, D.; DENIS, M. C.; LAVOIE, J. C.; DELVIN, E.; SEIDMAN, E., et al. The three-gene paraoxonase family: physiologic roles, actions and regulation. **Atherosclerosis**, v.214, n.1, p.20-36, 2011.

PRICE, H. C.; NICHOLLS, A. Primary prevention of CVD: diet. **BMJ Clin Evid**, v.2014. 2014.

PRIMO-PARMO, S.; SORENSON, R.; TEIBER, J.; LA DU, B. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. **Genomics**, v.33, n.3, p.498-507, 1996.

RAINWATER, D.; RUTHERFORD, S.; DYER, T.; RAINWATER, E.; COLE, S.; VANDEBERG, J., et al. Determinants of variation in human serum paraoxonase activity. **Heredity**, v.102, n.2, p.147-54, 2008.

RAMOS-ARELLANO, L. E.; MUNOZ-VALLE, J. F.; DE LA CRUZ-MOSSO, U.; SALGADO-BERNABE, A. B.; CASTRO-ALARCON, N.; PARRA-ROJAS, I. Circulating CD36 and oxLDL levels are associated with cardiovascular risk factors in young subjects. **BMC Cardiovasc Disord**, v.14, p.54. 2014.

RANTALA, M.; SILASTE, M.; TUOMINEN, A.; KAIKKONEN, J.; SALONEN, J.; ALFTHAN, G., et al. Dietary modifications and gene polymorphisms alter serum paraoxonase activity in healthy women. **The Journal of Nutrition**, v.132, n.10, p.3012-17, 2002.

RAO, Goutham. Insulin resistance syndrome. **American Family Physician**, v.63, n.6, p.1159-63, 2001.

RAO, M.; MARMILLOT, P.; GONG, M.; PALMER, D.; SEEFF, L.; STRADER, D., et al. Light, but not heavy alcohol drinking, stimulates paraoxonase by upregulating liver mRNA in rats and humans. **Metabolism**, v.52, n.10, p.1287-94, 2003.

RÊGO, Ana Lúcia Viégas; CHIARA, Vera Lucia. Nutrição e excesso de massa corporal: fatores de risco cardiovascular em adolescentes. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.19, n.6, 2006.

RIDKER P.; BROWN N.; VAUGHAN D.; HARRISON D.; MEHTA J. Established and emerging plasma biomarkers in the prediction of first atherothrombotic events. **Circulation**, v.109, IV-6–IV-19, 2004.

ROBERTS, Christian K.; SINDHU, Kunal K. Oxidative stress and metabolic syndrome. **Life sciences**, v.84, n.21, p.705-12, 2009.

RUBINSTEIN, A. L.; IRAZOLA, V. E.; CALANDRELLI, M.; ELORRIAGA, N.; GUTIERREZ, L.; LANAS, F., et al. Multiple cardiometabolic risk factors in the Southern Cone of Latin America: A population-based study in Argentina, Chile, and Uruguay. **Int J Cardiol**, v.183C, p.82-88, 2015.

RUPÉREZ, A. I.; LÓPEZ-GUARNIDO, O.; GIL, F.; OLZA, J.; GIL-CAMPOS, M.; LEIS, R., et al. Paraoxonase 1 activities and genetic variation in childhood obesity. **British Journal of Nutrition**, p.1-9, 2013.

SANDRI, Silvana. **Amilóide sérica A: efeitos biológicos sobre células mononucleares**. 2008. 164p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. Departamento de Análise Clínicas e Toxicológicas. São Paulo.

SANTOS, R.; GAGLIARDI, A.; XAVIER, H.; MAGNONI, C.; CASSANI, R.; LOTTENBERG, A., et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz sobre o consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.100, Supl.3, 40p. 2013.

SCHRADER, C.; RIMBACH, G. Determinants of Paraoxonase 1 Status: Genes, Drugs and Nutrition. **Current Medicinal Chemistry**. v.18, n.36, p.5624-43, 2011;

SCHUCH, Ilaine et al. Excess weight in preschoolers: prevalence and associated factors. **Jornal de pediatria**, v.89, n.2, p.179-188, 2013.

SENTÍ, M.; TOMÁS, M.; ANGLADA, R.; ELOSUA, R.; MARRUGAT, J.; COVAS, M., et al. Interrelationship of smoking, paraoxonase activity, and leisure time physical activity: a population-based study. **European Journal of Internal Medicine**, v.14, n.3, p.178-84, 2003.

SERES, I.; BAJNOK, L.; HARANGI, M.; SZTANEK, F.; KONCSOS, P.; PARAGH, G. Alteration of PON1 activity in adult and childhood obesity and its relation to adipokine levels. **Adv Exp Med Biol**, v.660, p.129-42. 2010.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. I Diretriz de prevenção da aterosclerose na infância e na adolescência. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v.85, Suplemento VI, 2005.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. IV Diretriz brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose. Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v.88, Suplemento I, 2007.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA. **Obesidade na infância e adolescência**: manual de orientação. Sociedade Brasileira de Pediatria. Departamento Científico de Nutrologia. 2.ed. São Paulo: SBP, 2012. 142p.

SOCIEDADE PORTUGUESA DE ENDOCRINOLOGIA, DIABETES E METABOLISMO. GEIR - Grupo de Estudos da Insulino-Resistência. Manual sobre Insulino-Resistência. Editora: Helena Cardoso, 3 ed., 190p. 2009. Disponível em: <[http://www.spedm-geir.org/site/download/manualinsulino resistencia3edicao.pdf](http://www.spedm-geir.org/site/download/manualinsulino%20resistencia3edicao.pdf)> Acesso em: 19 set 2013.

SUEHIRO, T.; NAKAMURA, T.; INOUE, M.; SHIINOKI, T.; IKEDA, Y.; KUMON, Y., et al. A polymorphism upstream from the human paraoxonase (PON1) gene and its association with PON1 expression. **Atherosclerosis**, v.150, n.2, p.295-8, 2000.

SUMEGOVÁ, K.; NAGYOVA, Z.; WACZULIKOVA, I.; ZITNANOVA, I.; DURACKOVA Z. Activity of paraoxonase 1 and lipid profile in healthy children. **Physiological Research**, v.56, n.3, p.351-7, 2007.

SUTHERLAND, W.; WALKER, R.; DE JONG, S.; VAN RIJ, A.; PHILLIPS, V.; WALKER, H. Reduced postprandial serum paraoxonase activity after a meal rich in used cooking fat. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v.19, n.5, p.1340-47, 1999.

THYAGARAJAN, B.; JACOBS, D.; CARR, J.; ALOZIE, O.; STEFFES, M.; KAILASH, P., et al. Factors associated with paraoxonase genotypes and activity in a diverse, young,

healthy population: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) study. **Clinical Chemistry**, v.54, n.4, p.738-46, 2008.

TUZCU, E. M.; KAPADIA, S. R.; TUTAR, E.; ZIADA, K. M.; HOBBS, R. E.; MCCARTHY, P. M., et al. High prevalence of coronary atherosclerosis in asymptomatic teenagers and young adults: evidence from intravascular ultrasound. **Circulation**, v.103, n.22, p.2705-10, 2001.

UPRITCHARD, J. E.; SCHUURMAN, C. R.; WIERSMA, A.; TIJBURG, L. B.; COOLEN, S. A.; RIJKEN, P. J., et al. Spread supplemented with moderate doses of vitamin E and carotenoids reduces lipid peroxidation in healthy, nonsmoking adults. **Am J Clin Nutr**, v.78, n.5, p.985-92, 2003.

VAN LENTEN, B.; WAGNER, A.; NAYAK, D.; HAMA, S.; NAVAB, M.; FOGELMAN, A. High-density lipoprotein loses its anti-inflammatory properties during acute influenza A infection. **Circulation**, v.103, n.18, p.2283-88, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Anthro plus for personal computers: software for assessing growth and development of the world's children: Geneva: WHO 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cardiovascular Diseases (CVDs). Fact Sheet nº 317; 2011. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>> Acesso em: 08 jul 2013.

ZAKI, M. E.; EL-BASSYOUNI, H.; KAMAL, S.; EL-GAMMAL, M.; YOUNESS, E. Association of serum paraoxonase enzyme activity and oxidative stress markers with dyslipidemia in obese adolescents. **Indian J Endocrinol Metab**, v.18, n.3, p.340-4, 2014.

Apêndices

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



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

Atividade da paraoxonase-1: estudo da associação a polimorfismos genéticos, fatores bioquímicos e nutricionais em crianças.

Pesquisador responsável: Gabriela de Lemos Uliano

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Todas as crianças de 5 a 8 anos incompletos, atendidas no Ambulatório de Pediatria da Faculdade de Medicina/ UFPEL, no período de Janeiro a Junho de 2014, estão sendo convidadas a participar do estudo “Atividade da paraoxonase-1: estudo da associação a polimorfismos genéticos, fatores bioquímicos e nutricionais em crianças.”

Objetivos do projeto: Investigar a atividade da paraoxonase-1 (PON1), uma enzima produzida no fígado e relacionada ao colesterol HDL que protege contra doenças do coração, sua associação a polimorfismos genéticos (alterações no DNA que são comuns na população), fatores bioquímicos (valores de gorduras no sangue) e nutricionais (alimentação, peso, altura e circunferência da cintura) em crianças de 5 a 8 anos.

Procedimentos: O responsável deverá responder a um questionário com perguntas sobre saúde, comportamento e alimentação da criança. Um profissional medirá peso, altura e circunferência da cintura da criança. O paciente será ainda encaminhado para uma coleta de sangue para avaliação bioquímica da PON1, triglicerídeos, colesterol total e suas frações. A coleta será feita em local adequado, com material descartável, por profissional treinado, em um laboratório de análises clínicas da cidade, garantindo conforto e segurança de seu (sua) filho (a). A realização dos exames será feita no período da manhã e apenas após a explicação detalhada dos procedimentos à criança e o consentimento de seus responsáveis. A criança deverá estar em jejum, ou seja, deverá ter se alimentado pela última vez 12 horas antes do exame. O sangue coletado será conservado para uso posterior na mesma pesquisa ou para outros estudos. Todos os resultados deste estudo serão mantidos em sigilo e serão usados apenas para fins científicos. As crianças que apresentarem algum resultado que represente fator de risco para doenças do coração serão encaminhadas para consulta nutricional no Ambulatório de Nutrição da Faculdade de Nutrição/UFPEL.

Riscos e desconforto: Os riscos previstos para a saúde da criança na participação do estudo são mínimos, podendo apenas causar certo desconforto com a coleta de sangue. Por isso, foi escolhido um laboratório de referência na cidade, com profissionais técnicos experientes, responsáveis e treinados para esse procedimento dentro das técnicas estabelecidas. Vamos fazer também algumas. Por favor, lembre-se que a Sr (a) poderá deixar de responder qualquer pergunta que desejar.

Benefícios: A criança receberá o diagnóstico do seu estado nutricional e os resultados dos exames bioquímicos, podendo ser encaminhada para orientação nutricional, quando se fizer necessário.

Além disso, a informação obtida com este estudo poderá ser útil cientificamente e de ajuda para melhor conduta nutricional.

Participação voluntária: A participação no estudo é voluntária e o (a) Sr (a) e seu filho (a) podem deixar de participar a qualquer momento. A recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com o atendimento na instituição.

Confidencialidade: As informações obtidas serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre a participação. Em nenhum caso, seu filho (a) será identificado por outros.

Você receberá uma cópia deste termo onde consta telefone/email do pesquisador principal e endereço da instituição, podendo tirar suas dúvidas sobre o estudo, e informações decorrentes dele a qualquer momento.

Contato:

Pesquisador Responsável

Gabriela de Lemos Uliano
(53)91389301/gabiuliano@hotmail.com
PPG Nutrição e Alimentos
UFPEL - Rua Gomes Carneiro, nº 1

Orientador

Profª. Dra. Sandra Costa Valle
sandracostavalle@gmail.com
Faculdade de Nutrição
UFPEL - Rua Gomes Carneiro, nº 1

Número do TCLE: _____

Declaro que recebi as explicações sobre o estudo registradas neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e tive oportunidade de esclarecer minhas dúvidas.

Autorizo _____ a participar da pesquisa sabendo que ele (a) pode deixar de participar a qualquer momento, sem nenhum prejuízo ou perda de qualquer direito.

Nome do (a) responsável pela criança


Assinatura do (a) responsável pela criança

Telefone para contato

Entrevistador: _____

Data: ____/____/____

APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO

| | |
|---|------------------------------------|
|  <p style="text-align: center;">UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS FACULDADE DE NUTRIÇÃO Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos</p> | |
| “Atividade da paraoxonase-1: estudo da associação a polimorfismos genéticos, fatores bioquímicos e nutricionais em crianças” | |
| <p><i>Oi, Bom dia/tarde! Apresentar-se: meu nome é <...>. Eu sou aluno (a) da Faculdade de Nutrição. Qual seu nome? E qual o nome <da criança>? Posso conversar com vocês agora? (se sim, prosseguir). Estamos entrevistando todas as crianças atendidas no ambulatório, faz parte de um trabalho para o Mestrado em Nutrição e Alimentos da Universidade Federal de Pelotas e para isso, precisamos da sua colaboração e compreensão. A sua participação e a do (a) seu (sua) filho (a) é muito importante. Ler o termo de consentimento, coletar a assinatura e logo após realizar as perguntas do questionário e encaminhar para a coleta de sangue no laboratório. No final agradecer a participação.</i></p> | |
| Número do questionário: _____ NQUEST _____ | |
| Data da entrevista: ____/____/_____ Horário de início da entrevista: ____:____ Entrevistador (a): _____ | DATA ____/____/____ |
| AS PRÓXIMAS 2 PERGUNTAS DEVEM SER APENAS OBSERVADAS Sexo da criança: (1) Masculino (0) Feminino Cor da criança: (1) Branca (2) Não branca | SEX ____ COR ____ |
| Número do prontuário: _____ | PRONT ____ |
| <p style="text-align: center;">AGORA VOU FAZER ALGUMAS PERGUNTAS SOBRE SEU (SUA) FILHO (A) E FAMÍLIA</p> Nome da criança: _____ Data de nascimento da criança: ____/____/_____ Idade: ____ (anos completos) Nome do responsável: _____ Endereço: _____ Telefone: () _____ / () _____ | |
| Qual foi o peso do (a) <criança> ao nascer? | PNASC ____ |
| O senhor (a) mora com o (a) <criança>: (1) sim (2) não | MORA ____ |
| Qual o seu grau de parentesco: ____ (1) Mãe/Pai/Responsável (2) Avó (3) Tia (4) Irmã(o) (5) Outro Quantas pessoas moram com o (a) [nome da criança]? ____ | GP ____ NPES ____ |
| Entre as pessoas que moram na sua residência, quantas trabalharam no último mês? (0) (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) | TRAB ____ |
| Qual a faixa de renda mensal da sua família? ____ (8) NSA (9) IGN (1) Até 1 salário mínimo (até R\$ 700,00) (2) De 1 a 3 salários mínimos (R\$ 700,00 até R\$ 2.100,00) (3) De 3 a 5 salários mínimos (R\$ 2.100,00 até R\$ 3.500,00) (4) Mais de 5 salários mínimos (Mais de R\$ 3.500,00) | RENDA ____ |

| | |
|---|---|
| Qual a escolaridade da mãe? (anos completos) (9) IGN Analfabeto (0) Ensino fundamental (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) Ensino médio (11) (12) (13) Ensino superior (21) (22) (23) (24) | ESC ____ |
| O (a) <criança> participa das aulas de educação física na escola? (1) sim (2) não (8) NSA (9) IGN | EFESC ____ |
| Se sim, quantas vezes na semana a (o) <criança> participa destas aulas? ____ vezes/semana (8) NSA | EFESCFQ ____ |
| Quanto tempo durante o dia o (a) <criança> permanece em frente à: TV/videogame/computador: ____ horas | TVCO ____ |
| ESSE DADO DEVE SER COLETADO DO PRONTUÁRIO Motivo pelo qual a criança foi encaminhada ao ambulatório: | |
| AGORA VAMOS FALAR SOBRE A SAÚDE DO (A) <CRIANÇA> Já foi dito por algum médico que <a criança> tem alguma doença? (1)Sim (2)Não Se sim: Diabetes mellitus (1)Sim (2)Não Hipertensão arterial (1)Sim (2)Não Infec. Respiratória (1)Sim (2)Não Colesterol/Triglicerídeos aumentados (dislipidemia) (1)Sim (2)Não Outra: | DOENTE ____ DM ____ HAS ____ INFR ____ DIS ____ OUTRA ____ |
| A criança faz uso de medicação ou vitamina contínua: (1)Sim (2)Não Qual: _____ A criança fez uso de alguma medicação ou vitamina nos últimos 90 dias? (1)Sim (2)Não Qual: | MEDICA ____ QMEDICA ____ MED90 ____ QMED90 ____ |
| Na casa da criança existem pessoas que fumam próximo a ela? (1)Sim (2)Não Quem: | FUMO ____ QFUMO ____ |
| Há alguém na família com alguma destas doenças ou já teve? Diabetes (açúcar no sangue) (1)Sim (2)Não (99) IGN Hipertensão (pressão alta) (1)Sim (2)Não (99) IGN Excesso de peso (1)Sim (2)Não (99) IGN Cálculo renal (1)Sim (2)Não (99) IGN Dislipidemia (colesterol, triglicerídeos aumentados) (1)Sim (2)Não (99) IGN Hepatopatia (doença no fígado) (1)Sim (2)Não (99) IGN Doenças Coração (1)Sim (2)Não (99) IGN Osteoporose (1)Sim (2)Não (99) IGN Câncer (1)Sim (2)Não (99) IGN | HFDM ____ HFHAS ____ HFOBES ____ HFCAL ____ HFDIS ____ HFHEP ____ HFCOR ____ HFOST ____ HFCA ____ |
| MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS: | |
| Peso atual: ____ Kg Altura: ____ cm Circunferência da cintura: ____ cm IMC: ____ kg/m ² | PESO ____ ALTU ____ CC ____ IMC ____ |

| CONDIÇÕES CLÍNICAS: | |
|---|-------------|
| Colesterol total: _____mg/dl | COLT _____ |
| HDL: _____mg/dl | CHDL _____ |
| LDL: _____mg/dl | CLDL _____ |
| Triglicerídeos: _____mg/dl | TRIGL _____ |
| Atividade ARE da PON1: _____ | PON _____ |
| Polimorfismo genético: (1)CC (2)CT (3)TT | GENE _____ |

APÊNDICE C – ENCAMINHAMENTO PARA EXAME LABORATORIAL

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



“Atividade da Paraoxonase-1: associação a polimorfismos genéticos, fatores bioquímicos e nutricionais em crianças”

Pesquisadores responsáveis: Prof. Dr. Sandra Costa Valle e Acadêmica Gabriela de Lemos Uliano

Nome do paciente: _____

Responsável: _____

SOLICITAÇÃO DE EXAMES

- Colesterol total
- HDL-c
- LDL-c
- Triglicerídeos

Observações:

- A realização dos exames será feita somente no período da manhã.
- A criança deverá estar em jejum, ou seja, deverá ter se alimentado pela última vez 12 horas antes do exame.
- Horário: das 8:00 às 10:00h.

Comparecer ao Laboratório Novara, _____/2014, com o documento de identificação da criança e esta requisição.

Em Pelotas

Endereço: Rua Felix da Cunha, 802
Telefone: (53)3227-9100

Em Pinheiro Machado

Junto ao Sindicato Rural
Telefone: (53) 91068984

Contato do pesquisador:

Gabriela de Lemos Uliano
gabiuliano@hotmail.com
(53) 91389301

APÊNDICE D – ORIENTAÇÕES NUTRICIONAIS PARA DISLIPIDEMIA NA INFÂNCIA



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



“Atividade da Paraoxonase-1: associação a polimorfismos genéticos, fatores bioquímicos e nutricionais em crianças”


ORIENTAÇÕES PARA DISLIPIDEMIA INFANTIL

- A dislipidemia está associada ao excesso de peso. Se a criança está acima do peso, fique alerta.
- Se a família já tem tendência à obesidade, cuidar desde o início os hábitos alimentares:
 - Não insistir para “raspar” o prato;
 - Não oferecer porções grandes;
 - Não oferecer sucos, refrigerantes e chás para saciar a sede;
 - Evitar adicionar açúcar nas frutas, sucos naturais e leite;
 - Evitar o hábito da sobremesa;
 - Oferecer água ao invés de sucos artificiais ou refrigerantes.
- O consumo de alimentos muito calóricos podem agravar a dislipidemia e o excesso de peso e devem ser controlados:
- **Evitar:** frituras, chocolates, sorvete, bolacha recheada, miojo, embutidos, salgadinhos fritos e de pacote, bebidas açucaradas como refrigerantes e sucos de pacote e temperos industrializados;
- Incluir diariamente duas a três porções de hortaliças e frutas na alimentação da criança;
- Preferir leite E iogurte desnatados;
- Diminuir o tempo que a criança passa em frente da TV, computador ou videogame. Incentivar brincadeiras com movimento e exercícios;
- Não usar adoçantes para substituir o açúcar sem orientação;
- As crianças aprendem a comer alimentos que a família, os professores e os amigos oferecem. Dar o exemplo é fundamental!

Gabriela de Lemos Uliano
Nutricionista - CRN2 9314
Mestranda PPG Nutrição e Alimentos – UFPEL

Anexos

ANEXO A – QUESTIONÁRIO DE CONSUMO ALIMENTAR - SISVAN

| | | |
|---|--|-------------------------------|
|  | Ministério da Saúde/ SAS/ DAB/ CGAN | |
| | SISTEMA DE VIGILÂNCIA ALIMENTAR E NUTRICIONAL | |
| | Estabelecimento de Saúde | Nº CNES* |
| Nome ou Matrícula do Profissional de Saúde | | |
| Nome completo* | | Data de nascimento: / / |
| Endereço completo* | | |
| Documentação (tipo, número e outras especificações)* | | Data de preenchimento: / / |

* Campos de preenchimento obrigatório (fundo cinza).

FORMULÁRIO DE MARCADORES DO CONSUMO ALIMENTAR - INDIVÍDUOS COM 5 ANOS DE IDADE OU MAIS

| Nos últimos 7 dias, em quantos dias você comeu os seguintes alimentos ou bebidas? | | | | | | | | |
|---|----------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|---------------|
| ALIMENTO/ BEBIDA | Não comi | 1 dia | 2 dias | 3 dias | 4 dias | 5 dias | 6 dias | Todos os dias |
| 1. Salada crua (alface, tomate, cenoura, pepino, repolho, etc.) | | | | | | | | |
| 2. Legumes e verduras cozidos (couve, abóbora, chuchu, brócolis, espinafre, etc.) (não considerar batata e mandioca) | | | | | | | | |
| 3. Frutas frescas ou salada de frutas | | | | | | | | |
| 4. Feijão | | | | | | | | |
| 5. Leite ou iogurte | | | | | | | | |
| 6. Batata frita, batata de pacote e salgados fritos (coxinha, quibe, pastel, etc.) | | | | | | | | |
| 7. Hambúrguer e embutidos (salsicha, mortadela, salame, presunto, linguiça, etc.) | | | | | | | | |
| 8. Bolachas/ biscoitos salgados ou salgadinhos de pacote | | | | | | | | |
| 9. Bolachas/ biscoitos doces ou recheados, doces, balas e chocolates (em barra ou bombom) | | | | | | | | |
| 10. Refrigerante (não considerar os diet ou light) | | | | | | | | |

