

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



**Dissertação**

**PARAOXONASE 1: ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA QUALIDADE DA DIETA, FATORES  
GENÉTICOS E BIOQUÍMICOS EM CRIANÇAS**

**Tainá da Silva Sigales**

Pelotas, 2018

# **PARAOXONASE 1: ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA QUALIDADE DA DIETA, FATORES GENÉTICOS E BIOQUÍMICOS 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<sup>a</sup> Dra. Sandra Costa Valle

Coorientadores: Prof Dr. Augusto Schneider  
Prof<sup>a</sup>: Ludmila Correa Muniz

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas Catalogação  
na Publicação

S574p Sigales, Tainá da Silva

Paraoxonase 1 : análise da influência da qualidade da dieta, fatores genéticos e bioquímicos em crianças / Tainá da Silva Sigales ; Sandra Costa Valle, orientadora ; Augusto Schneider, Ludmila Correa Muniz, coorientadores. — Pelotas, 2018.

98 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Paraoxonase 1. 2. Crianças. 3. Alimentação. 4. Estado nutricional. I. Valle, Sandra Costa, orient. II. Schneider, Augusto, coorient. III. Muniz, Ludmila Correa, coorient. IV. Título.

Elaborada por Maria Inez Figueiredo Figas Machado CRB: 10/1612

# **PARAOXONASE 1: ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA QUALIDADE DA DIETA, FATORES GENÉTICOS E BIOQUÍMICOS 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:

30 de Julho de 2018

Banca examinadora:

Prof. Dra. Ângela Nunes Moreira

Doutora em Biotecnologia Agrícola pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dra. Juliana dos Santos Vaz

Doutora em Nutrição pela Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dra. Sandra Costa Valle (Orientadora)

Doutora em Fisiologia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

### **Agradecimentos**

A presente dissertação de mestrado não poderia ter sido concluída com êxito sem ajuda e apoio de pessoas especiais ao longo deste caminho.

Muito em especial, quero agradecer profundamente a minha orientadora Professora Doutora Sandra Costa Valle, obrigada por toda competência, atenção, disponibilidade e paciência comigo e principalmente pelos ensinamentos que me foram passados, sempre me auxiliando, corrigindo e estimulando durante esta jornada.

Ao meu marido Ândrio por ter compartilhado comigo toda esta vivência, sempre me incentivando e aguentando junto comigo os momentos mais difíceis deste caminho. Obrigada por não me deixar desistir, sem teu apoio talvez isso não fosse possível, te amo!

Agradeço as minhas colegas de trabalho, por toda compreensão e ajuda durante o meu mestrado, em especial quero agradecer a Moema Zambiasi, que além de me incentivar, muito me ajudou e ensinou, mostrando-me que foi possível conciliar trabalho e estudos.

Agradeço aos professores do Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da UFPEL por terem colaborado com a minha formação, em especial ao meu coorientador Augusto, por estar sempre disposto a me ajudar e ter contribuído muito com o meu trabalho.

A duas pessoas especiais que muito contribuíram com a minha pesquisa, a minha entrevistadora Larissa e ao bolsista Ruan, por toda ajuda no laboratório, sem a colaboração vocês este estudo não seria viável.

Muito obrigada a todos.

## Resumo

SIGALES, T. **Paraoxonase 1: análise da influência da qualidade da dieta, fatores genético e bioquímicos em crianças.** 2018

95p. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

**Introdução:** a má qualidade da alimentação e o excesso de peso na infância causam impacto a curto e longo prazo na saúde, principalmente por serem fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV). A enzima Paraoxonase 1 (PON1) circula associada a lipoproteína de alta densidade (HDL) e é responsável pelas suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias evitando a formação de danos endoteliais e as DCV. **Objetivo:** investigar a influência da qualidade da alimentação, do estado nutricional e do polimorfismo genético PON1 C(-107)T sobre a atividade da enzima antiaterogênica PON1. **Métodos:** estudo transversal com crianças entre 5 e 8 anos incompletos, de ambos os sexos, do ambulatório de pediatria, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Pelotas. Foram coletadas variáveis sociodemográficas e de consumo alimentar, aferidos peso, altura e circunferência da cintura e solicitada coleta de sangue. O índice de massa corporal (IMC) foi calculado em  $\text{kg/m}^2$  e escore z. A atividade arilesterase da PON1 foi medida pela velocidade de formação de fenol (U/L) utilizando fenilacetato como substrato. O polimorfismo PON1 C(-107)T foi determinado por reação em cadeia da polimerase (PCR), seguido por digestão com enzima de restrição e eletroforese em gel de agarose e posterior amplificação. As análises estatísticas foram ANOVA de uma via e regressão linear múltipla, o nível de significância adotado foi  $p < 0,05$ . **Resultados:** a frequência dos alelos CT, TT e CC foi 54,6%, 14,4% e 30,9%, respectivamente. A maior atividade da PON1 associou-se ao alelo CC. Nas análises bruta e ajustada a associação entre a PON1 e os polimorfismos manteve-se significativa. A inclusão da frequência de consumo alimentar e do escore z do IMC aumentou em 11,2% a variabilidade da enzima. A maior mudança no coeficiente beta ocorreu com os alimentos de boa qualidade nutricional. **Conclusão:** uma alimentação de boa qualidade nutricional na infância foi importante para predizer a atividade da enzima cardioprotetora PON1 associada ao polimorfismo C(-107)T.

**Palavras chave:** Paraoxonase 1, crianças, alimentação, estado nutricional

### Abstract

SIGALES, T. **Paraoxonase 1: analysis of the influence of diet quality, genetic and biochemical factors in children.** 2018

95p. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

**Introduction:** The poor food quality and overweight in infancy result in negative short and long-term health influence, mainly because they are risk factors for the development of cardiovascular diseases (CVD). The enzyme Paraoxonase 1 (PON1) circulates in association with high-density lipoprotein (HDL) and is responsible for its antioxidant and anti-inflammatory properties, avoiding the formation of endothelial damage and CVD. **Objective:** to investigate the influence of food quality, nutritional status and genetic polymorphism PON1 C (-107) T on the activity of the antiatherogenic enzyme PON1. **Methods:** a cross-sectional study with children between 5 and 8 years of age, of both sexes, from the pediatric clinic in the Medical School of the Federal University of Pelotas. Sociodemographic variables and food consumption, weight, height and waist circumference were collected and blood samples were obtained. The body mass index (BMI) was calculated in kg/m<sup>2</sup> and z-score. The PON1 arylesterase activity was measured by the rate of phenol formation (U/L) using phenylacetate as substrate. The PON1 C (-107) T polymorphism was determined by polymerase chain reaction (PCR), followed by restriction enzyme digestion and agarose gel electrophoresis and subsequent amplification. Statistical analyzes were performed using one-way ANOVA and multiple linear regression, with the level of significance adopted being  $p < 0.05$ . **Results:** the frequency of CT, TT and CC alleles was 54.6%, 14.4% and 30.9%, respectively. The highest activity of PON1 was significantly associated with the CC allele. In the unadjusted and adjusted analyzes the association between PON1 and polymorphisms was significant. The inclusion of the frequency of food consumption and z-score of BMI increased by 11.2% the variability of the enzyme. The largest change in the beta coefficient occurred with foods of good nutritional quality. **Conclusion:** a good food quality of feeding was important to predict the activity of the cardioprotective enzyme PON1 associated to the C (-107) T polymorphism in infancy.

**Key words:** Paraoxonase 1, infancy, food, nutritional status.

## Sumário

<b>Apresentação</b>	07
<b>Parte 1 - Projeto de dissertação</b>	09
1.1 Introdução	15
1.1.1 Justificativa	19
1.2 Revisão bibliográfica	20
1.2.1 Estudos que abordam paraoxonase 1 em crianças	29
1.2.2 Estudos que abordam a enzima paraoxonase 1 associada ao consumo de gorduras	29
1.2.3 Estudos com polimorfismos genéticos da região -108 e crianças	31
1.2.4 Estudos envolvendo PON1, consumo de gorduras e polimorfismos em crianças	31
1.3 Objetivos	33
1.3.1 Objetivo geral	33
1.3.2 Objetivos específicos	33
1.4 Hipóteses	34
1.5 Metodologia	35
1.5.1 Delineamento	35
1.5.2 População em estudo	35
1.5.3 Amostra	35
1.5.3.1 Critérios de exclusão e inclusão	35
1.5.3.2 Cálculo do tamanho amostral	35
1.5.4 Logística e caracterização do local	36
1.5.5 Definição do desfecho	38
1.5.5.1 Atividade arilesterase da PON1	38
1.5.6 Definição das variáveis de exposição	39
1.5.6.1 Polimorfismo genético C(-107)T da enzima PON1	39
1.5.6.2 Antropometria	40
1.5.6.3 Determinação dos níveis séricos de lipídeos	41
1.5.6.4 Consumo alimentar	42
1.5.7 Instrumentos	44
1.5.8 Seleção e treinamento dos entrevistadores	45
1.5.9 Estudo piloto	45
1.5.10 Controle de qualidade	45
1.5.11 Análise dos dados	46
1.5.12 Aspectos éticos	46
1.6 Orçamento	47
1.7 Divulgação dos resultados	47
1.8 Cronograma de execução	48
1.9 Referências	49
<b>Parte 2 - Relatório de trabalho de campo</b>	55
<b>Parte 3 - Artigo</b>	61
Apêndices	86
Anexos	94



## **Apresentação**

A alimentação durante a infância pode ter muitos impactos de curto e longo prazo na saúde, incluindo os riscos de desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, como a doença cardiovascular (DCV) (ZHANG et al. 2015). A exposição desde as etapas iniciais do desenvolvimento a fatores de risco ambientais, a exemplo de uma alimentação habitual de má qualidade, (SBC, 2013) tem sido relacionada também à obesidade, sendo os seus contribuintes a excessiva comercialização de alimentos altamente energéticos e gordurosos, como bebidas açucaradas, doces e carnes, além da menor participação de hortaliças, frutas e alimentos com menor teor energético e mais nutritivos na alimentação infantil (MOMM et al. 2014). A obesidade está relacionada a presença de disfunção endotelial (DE), esta disfunção é a lesão mais precoce do processo aterosclerótico e precede qualquer alteração morfológica dos vasos sanguíneos (PIRES et al. 2015). As alterações subsequentes levam à modificação do fenótipo da parede do vaso culminando na formação da placa aterosclerótica, processo que se desenvolve ao longo de décadas (SBC, 2005).

A lipoproteína de alta densidade (HDL) evita a formação das lesões endoteliais e as DCV, principalmente pela sua capacidade antioxidante e anti-inflamatória. Estas propriedades são conferidas principalmente pela presença da enzima paraoxonase 1 (PON1) nas partículas de HDL (PRECOURTE et al. 2011). A PON1 é uma enzima cálcio dependente expressa em humanos, sobretudo no fígado, que pode ser detectada no plasma predominantemente ligada as Apo-proteínas A<sub>1</sub> e J das partículas de HDL (MOYÁ et al. 2007). A PON1 atua no metabolismo dos fosfolipídios das lipoproteínas, em especial na lipoproteína de baixa densidade (LDL), prevenindo o dano oxidativo a suas frações lipídicas e os efeitos pró-inflamatórios dos lipoperóxidos na camada íntima dos vasos sanguíneos. Contudo, a expressão, concentração, atividade e os sítios de ligação da PON1 sofrem importante influência de fatores genéticos e ambientais, dentre estes últimos destaca-se a dieta (KIM et al. 2013).

Para avaliar a qualidade da alimentação é possível utilizar-se de ferramentas, dentre elas o índice de qualidade da alimentação, onde são baseados em recomendações nutricionais específicas (MOMM et al. 2014). O

índice classifica em alimentação de boa qualidade, caracterizada pela presença de frutas, verduras e legumes e uma alimentação de má qualidade, caracterizada pelo consumo excessivo de alimentos altamente energéticos e ricos em gordura.

O tipo de gordura presente na alimentação habitual exerce influência significativa sobre a PON1, a quantidade e a composição dos lipídios da dieta são fatores-chave na modulação da atividade da enzima e que também são modulados pelos polimorfismos da PON1 (LOU BONAFONTE et al. 2015). O consumo de ácidos graxos monoinsaturados está associado a uma maior atividade da PON1, enquanto alguns estudos mostram que os ácidos graxos saturados mostram-se neutros sobre a atividade da enzima, porém estão associados a um perfil inflamatório. Em estudos feitos com dietas ricas ácidos graxos poli-insaturados, observou-se que houve uma diminuição na atividade da PON1 (BOSHTAM et al. 2013).

O consumo de frutas, verduras e legumes mostraram uma associação positiva com a PON1 e podem auxiliar na prevenção da DCV por meio de substâncias protetoras como vitaminas e minerais antioxidantes e diferentes componentes fenólicos (SCHRADER et al. 2011).

Aos fatores genéticos são atribuídos uma variabilidade de até 60% na atividade da PON1 entre diferentes populações, inclusive naquelas da mesma etnia. Em particular, os polimorfismos da região C(-107)T (PON1 C(-107)T tem maior efeito sobre a expressão e atividade arilesterase da enzima, contribuindo com 25% da variabilidade de sua expressão em adultos caucasianos. A presença do alelo C resulta em níveis de PON1 até duas vezes superiores aos dos portadores do alelo T (DEAKIN et al. 2003; BROPHY et al. 2001; HUEN et al. 2010). 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 ligadas à DCV ocorrem ainda na infância, principalmente em decorrência dos fatores mencionados anteriormente. Ainda que a má qualidade da alimentação seja amplamente aceita como fator de risco CV não há registro de estudo que tenha associado a qualidade da alimentação infantil à atividade da PON1. Além disso, a frequência do polimorfismo genético na região promotora -107 é pouco conhecida na população infantil brasileira.

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



Projeto de dissertação

**Paraoxonase 1: análise da influência da qualidade da dieta, fatores  
genéticos e bioquímicos em crianças**

**Tainá da Silva Sigales**

Pelotas, julho de 2017

**TAINÁ DA SILVA SIGALES**

**PARAOXONASE 1: ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA QUALIDADE DA DIETA,  
FATORES GENÉTICOS E BIOQUÍMICOS EM CRIANÇAS**

Projeto de qualificação 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: Profa Dra. Sandra Costa Valle  
Coorientadores: Prof Dr. Augusto Schneider  
Profa Dra. Ludmila Muniz

Pelotas, julho de 2017

## **Resumo**

**SIGALES, T. Paraoxonase 1: análise da influência da qualidade da dieta, fatores genético e bioquímicos em crianças. 2017**

A má qualidade da alimentação das crianças tem sido caracterizada principalmente pelo consumo excessivo de alimentos ultraprocessados, altamente energéticos e gordurosos como refeições prontas e/ou rápidas, biscoitos recheados, bebidas açucaradas, além da menor participação de hortaliças, frutas e alimentos com menor teor energético e mais nutritivos. Estes hábitos associam-se a doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) dentre as quais destacam-se as doenças cardiovasculares (DCV). Estudos mostram que as lesões endoteliais iniciam-se na infância principalmente em crianças com fatores de risco para as DCV. A lipoproteína de alta densidade (HDL) evita a formação das lesões endoteliais e as DCV pela sua capacidade antioxidante e anti-inflamatória. 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. O objetivo deste estudo é investigar a associação entre a atividade da PON1, a qualidade da dieta, polimorfismos genéticos e fatores bioquímicos em crianças de 5 a 8 anos de idade atendidas no Ambulatório de Pediatria da Faculdade de Medicina/UFPEL e no Centro de Especialidades da cidade de Pelotas-RS. O estudo terá um delineamento transversal e será realizado no período de Agosto de 2017 a Março de 2018. 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 dieta, 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%. Espera-se que a atividade arilesterase da PON1 esteja associada com a qualidade da dieta e que o polimorfismo genético da região C(-107)T mostre associação com uma maior atividade da enzima e seja influenciado pela alimentação e estado nutricional.

### **Lista de Abreviaturas e Siglas**

ALT Alanina transaminase  
apoA-I Apolipoproteína A  
apoJ Apolipoproteína J  
ARE Arilesterase  
CC Circunferência da cintura  
CT Colesterol Total  
DCV Doença Cardiovascular  
DE Disfunção endotelial  
HDL Lipoproteínas de Alta Densidade  
IMC Índice de Massa Corporal  
IR Resistencia a insulina  
LDL Lipoproteínas de Baixa Densidade  
NO Óxido Nítrico  
OMS Organização Mundial de Saúde  
OSI índice de estresse oxidativo  
PCR Proteína C reativa  
POF Pesquisa de Orçamento Familiar  
PON1 Paraoxonase-1  
QFCA Questionário de frequência de consumo alimentar  
RS Rio Grande do Sul  
SBC Sociedade Brasileira de Cardiologia  
SBP Sociedade Brasileira de Pediatria  
SMET Síndrome metabólica  
SISVAN Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional  
TAS Estado antioxidante total  
TOS Estado oxidante total  
TCLE Termo de Consentimento Livre e Esclarecido  
TG Triglicerídeos  
UFPEL Universidade Federal de Pelotas

## Lista de figuras

Figura 1 – Descritores utilizados na busca dos artigos	21
Figura 2 - Cálculo do tamanho de amostra para as diversas exposições	36
Figura 3 - Recrutamento e fluxograma de coleta de dados	38
Figura 4 - Valores de referência de IMC/idade propostos para a população de 5 a 19 anos pela Organização Mundial da Saúde	40
Figura 5 - Distribuição em percentis da circunferência abdominal segundo sexo e idade	41
Figura 6- 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	42
Figura 7 - Pontuação atribuída para o índice de qualidade da alimentação, segundo a frequência de consumo alimentar de crianças nos sete dias anteriores a entrevista	43
Figura 8 - Orçamento do projeto de pesquisa	47
Figura 9 - Cronograma de atividades	48

## Sumário

1.1	Introdução	15
1.1.1	Justificativa	19
1.2	Revisão bibliográfica	20
1.2.1	Estudos que abordam paraoxonase 1 em crianças	29
1.2.2	Estudos que abordam a enzima paraoxonase 1 associada ao consumo de gorduras	29
1.2.3	Estudos com polimorfismos genéticos da região -108 e crianças	31
1.2.4	Estudos envolvendo PON1, consumo de gorduras e polimorfismos em crianças	31
1.3	Objetivos	33
1.3.1	Objetivo geral	33
1.3.2	Objetivos específicos	33
1.4	Hipóteses	34
1.5	Metodologia	35
1.5.1	Delineamento	35
1.5.2	População em estudo	35
1.5.3	Amostra	35
1.5.3.1	Critérios de exclusão e inclusão	35
1.5.3.2	Cálculo do tamanho amostral	35
1.5.4	Logística e caracterização do local	36
1.5.5	Definição do desfecho	38
1.5.5.1	Atividade arilesterase da PON1	38
1.5.6	Definição das variáveis de exposição	39
1.5.6.1	Polimorfismo genético -107C/T da enzima PON1	39
1.5.6.2	Antropometria	40
1.5.6.3	Determinação dos níveis séricos de lipídeos	41
1.5.6.4	Consumo alimentar	42
1.5.7	Instrumentos	44
1.5.8	Seleção e treinamento dos entrevistadores	45
1.5.9	Estudo piloto	45
1.5.10	Controle de qualidade	45
1.5.11	Análise dos dados	46
1.5.12	Aspectos éticos	46
1.6	Orçamento	47
1.7	Divulgação dos resultados	57
1.8	Cronograma de execução	48
1.9	Referências	49
	Apêndices	86
	Anexos	94



## 1.1 INTRODUÇÃO

A qualidade da alimentação consumida na infância tem revelado como contribuintes principais a presença excessiva de alimentos ultraprocessados, altamente energéticos e gordurosos, como refeições prontas e ou rápidas, biscoitos recheados, bebidas açucaradas, além da menor participação de hortaliças, frutas e alimentos com menor teor energético e mais nutritivos (SBC, 2013). Uma alimentação inadequada tem sido associada a uma maior prevalência de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), com destaque para as DCVs que nos últimos anos tiveram aumento de prevalência em adultos, especialmente naqueles mais jovens (POF 2008-2009).

Vários estudos, incluindo análises anatomopatológicas, têm demonstrado que a doença aterosclerótica inicia-se na infância, particularmente em crianças com fatores de risco cardiovascular (SIEGRIST et al. 2011; PIRES et al. 2015; SHAH et al. 2017). Sendo assim a exposição desde as etapas iniciais do desenvolvimento a fatores de risco ambientais, a exemplo de uma alimentação habitual de má qualidade e a presença de obesidade, está relacionada a presença de disfunção endotelial (DE). Esta disfunção é a lesão mais precoce do processo aterosclerótico e precede qualquer alteração morfológica dos vasos sanguíneos (PIRES et al. 2015). As alterações subsequentes levam à modificação do fenótipo da parede do vaso culminando na formação da placa aterosclerótica, processo que se desenvolve ao longo de décadas (SBC, 2005).

A aterosclerose caracteriza-se por um processo inflamatório crônico da parede vascular associado a elevação de marcadores inflamatórios séricos e dislipidemia (SBC, 2005). A lipoproteína de alta densidade (HDL), evita a formação das lesões endoteliais e as DCV, principalmente pela sua capacidade antioxidante e anti-inflamatória. Estas propriedades são conferidas principalmente pela presença da enzima paraoxonase 1 (PON1) nas partículas de HDL (PRECOURTE et al. 2011)

A PON1 é uma enzima cálcio dependente, expressa em humanos sobretudo no fígado, que pode ser detectada no plasma predominantemente ligada as Apo-proteínas A<sub>1</sub> e J das partículas de HDL (MOYÁ et al. 2007). Esta enzima originalmente foi identificada por hidrolisar compostos organofosforados e seu nome refere-se à sua capacidade em degradar o paraoxon (atividade de

paraoxonase). No entanto, a enzima mostrou-se capaz de hidrolisar eficientemente lactonas lipofílicas (atividade lactonase), fenilacetato (atividade arilesterase) e agentes nervosos (SAHEBKAR et al. 2016).

A PON1 atua no metabolismo dos fosfolipídios das lipoproteínas, em especial na lipoproteína de baixa densidade (LDL), prevenindo o dano oxidativo a suas frações lipídicas e os efeitos pró-inflamatórios dos lipoperóxidos na camada íntima dos vasos sanguíneos. Estudos mostram que, principalmente, o aumento da arilesterase e, em menor extensão, da lactonase associam-se à redução do dano endotelial e do risco de DCV (DURRINGTON et al. 2001; MACKNESS et al. 2003). Contudo, a expressão, concentração, atividade e os sítios de ligação da PON1 sofrem importante influência de fatores genéticos e ambientais, dentre estes últimos destaca-se a dieta (KIM et al. 2013).

Aos fatores genéticos são atribuídos uma variabilidade de até 60% na atividade da PON1 entre diferentes populações, inclusive naquelas da mesma etnia. Em particular, os polimorfismos da região -107C/T (PON1-108C/T) tem maior efeito sobre a expressão e atividade arilesterase da enzima, contribuindo com 25% da variabilidade de sua expressão em adultos caucasianos. A presença do alelo C resulta em níveis de PON1 até duas vezes superiores aos dos portadores do alelo T (DEAKIN et al. 2003; BROPHY et al. 2001; HUEN et al. 2010). Uliano et al, ao analisarem a atividade arilesterase da PON1 em uma amostra de crianças saudáveis de 5 a 8 anos de idade, verificaram que o polimorfismo PON1 C(-107)T associou-se a uma maior atividade enzimática (1,5 vezes) e a níveis mais elevados de HDL, em especial naquelas crianças com peso adequado. Resultados similares já haviam sido relatados para adultos por Huen (2010). Entretanto, apesar da significativa influência genética, aos fatores dietéticos são atribuídos modificações de até 40% na PON1.

O tipo de gordura presente na alimentação habitual exerce influência significativa sobre a PON1 (LOU BONAFONTE et al. 2015). O consumo predominante de ácido graxo monoinsaturado oleico (18:1  $\omega$  9) causa aumento da atividade e da concentração hepática da enzima, efeitos atribuídos em grande parte a um teor maior deste ácido graxo nos fosfolipídios das partículas de HDL. Neste contexto, o consumo reduzido de ácidos graxos saturados e transesterificados, permite aumento da atividade enzimática. Embora os ácidos graxos saturados mostrem neutralidade sobre a atividade da PON1, sua

predominância na alimentação habitual predispõe a um perfil inflamatório pouco favorável para síntese e atividade da enzima (BOSHTAM et al. 2013). Já os ácidos graxos poli-insaturados e transesterificados mostraram um considerável efeito inibidor sobre a ação enzimática.

Dentre os fatores dietéticos as frutas, verduras e os legumes tem sido efetivas na modulação positiva na atividade da PON1. Estes alimentos, incluem raízes, folhas, frutos, caules e sementes de mais de quarenta famílias diferentes da botânica, conferindo a esses alimentos a característica de prover grande variedade e complexidade à dieta humana (SCHRADER et al. 2011; MUNIZ et al. 2013). As frutas, verduras e legumes podem auxiliar na prevenção da DCV por meio de substâncias protetoras como vitaminas e minerais antioxidantes e diferentes componentes fenólicos.

A *American Academy of Pediatrics* dos Estados Unidos, assim como o Ministério da Saúde do Brasil recomendam o consumo diário de no mínimo três porções de frutas e três porções de legumes e verduras, salientando a importância de diversificar o consumo desses alimentos nas refeições das crianças (WHO,2011). Entretanto, a Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2008/2009 identificou consumo insuficiente de frutas e hortaliças em mais de 90% da população brasileira (SBC, 2007).

A ocorrência cumulativa de fatores de risco para DCV em crianças não é mais um evento raro, assim como a uma alimentação habitual inadequada rica em açúcar e produtos industrializados. Além disso, grande parte dos alimentos industrializados consumidos pelas crianças possui elevado valor energético e são ricos gordura total, ácidos graxos poli-insaturados ômega-6 e transesterificados (KOTA et al. 2013).

Sabe-se que uma alimentação inadequada qualidade é um importante fator de risco para doenças e agravos a saúde, inclusive na infância. Na atualidade, a prevalência de obesidade infantil mostra-se elevada e seus índices tem aumentado em diversas regiões do mundo. Esta doença uma vez estabelecida em fase precoce do desenvolvimento caracteriza-se em importante fator de risco para comorbidades, a exemplo das DCV (HONG et al. 2010; SBP, 2012). Em um estudo de coorte observou-se que a associação entre os fatores de risco para doenças cardiovasculares na infância e o surgimento de lesões na carótida, são dependentes da idade, principalmente a partir dos nove anos,

predizendo o surgimento de aterosclerose na fase adulta (JOUNALA et al. 2010).

Por outro lado, pesquisas tem mostrado a influência da obesidade na infância sobre a redução da atividade da PON1 (ZAKI et al. 2014). O mecanismo de inflamação presente na obesidade causa alterações no metabolismo de lipídeos, levando a alterações na composição e níveis das lipoproteínas, levando a uma maior susceptibilidade a peroxidação lipídica e diminuição da atividade da PON1 (KONCSOS et al. 2013; ZAKI, 2014).

Estudos que associam a qualidade da dieta e sua relação com a PON1 em crianças ainda são escassos apesar das evidências de aumento dos fatores de risco cardiovascular em fase precoce do desenvolvimento humano. Além disso, a frequência do polimorfismo genético na região promotora C(-107)T é pouco conhecida na população infantil brasileira. Estudos que relatem esta associação em crianças do nosso meio contribuirão para o ajuste das medidas de prevenção para DCV.

### 1.1.1 JUSTIFICATIVA

A infância e adolescência são em particular, períodos vulneráveis a fatores de risco cardiovasculares (AGIRBASLI et al. 2014). A obesidade em crianças e adolescentes pode induzir alterações vasculares ateroscleróticas precocemente. O acúmulo de gordura favorece a ocorrência de distúrbios metabólicos, onde esse aumento e gravidade também desempenham um papel importante no processo aterosclerótico (HONG et al. 2010; RUMINSKA et al. 2017). Dados sobre a associação entre a atividade da PON1 e obesidade em crianças são limitados e divergentes, devido a seus potenciais fatores de confusão, como os fatores genéticos e ambientais, tais como a dieta. (SUMEGOVÁ et al. 2007; KRZYTEK-KORPACKA, 2013; KONCSOS et al. 2010; RUPÉREZ et al. 2013).

Estudos sobre a frequência do polimorfismo genético na região promotora -107, em crianças são escassos. Ao analisar a atividade arilesterase da PON1 em uma amostra de crianças saudáveis de 5 a 8 anos de idade, foi observado que o polimorfismo PON1 C(-107)T associou-se a uma maior atividade enzimática (ULIANO et al. 2016)

Sabe-se que as alterações ligadas à DCV ocorrem ainda na infância, principalmente em decorrência dos fatores mencionados anteriormente. Ainda que a má qualidade da alimentação seja amplamente aceita como fator de risco CV não há registro de estudo que tenha associado a qualidade da alimentação infantil à atividade da PON1.

## 1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica foi realizada através das bases de dados Europe PubMed e BVS saúde, a busca foi feita utilizando os descritores abaixo citados e suas respectivas traduções para a língua portuguesa. Para a pesquisa dos artigos um dos critérios de escolha estudos publicados até 10 anos anteriores, somente o consumo de gorduras foi acrescentado na busca estudos com humanos e animais.

Base de dados	Descritores	Artigos encontrados	Artigos selecionados para leitura do resumo	Artigos lidos na íntegra	Artigos selecionados para compor a revisão
Europe PubMed	1 or 2 AND 3	689	24	9	6
	1 or 2 AND 4	289	15	10	4
	1 or 2 AND 5 or 6	1289	25	5	5
	1 or 2 AND 5 or 7	941	10	4	3
	1 or 2 AND 3 or 8	268	9	4	4
BVS Saúde	1 or 2 AND 3	84	9	1	0
	1 or 2 AND 4	16	1	0	0
	1 or 2 AND 5 or 6	248	10	1	0
	1 or 2 AND 5 or 7	38	1	0	0
	1 or 2 AND 3 or 8	467	24	1	1
TOTAL					23

Quadro 1: Estratégia de busca dos artigos de revisão nas bases de dados.

## Descritores utilizados

1- *Paraoxonase 1*  
2- *Pon1*  
3- *Children*  
4- *Childhood*

5- *Diet*  
6- *Vegetables*  
7- *Fatty acids*  
8- *Polymorphisms*

Fig. 1. Descritores utilizados na busca dos artigos.

**Quadro 2.** Estudos que envolvem a atividade da PON1 e crianças.

Autor/ Ano	Objetivos	Tipo de estudo	Metodos	Principais Resultados	Conclusões
Huen et al. 2015	Determinar a relação da metilação do DNA no gene PON1 com polimorfismos genéticos de PON1 e com a expressão gênica no nível protéico em crianças da coorte CHAMACOS.	Coorte	Amostra: 378 recém nascidos 247 crianças de 9 anos de idade PON1: atividade arilesterase Polimorfismo: PON1-108	Observou-se associações positivas entre o número de alelos T de PON1-108 com níveis de metilação. Em ambas as idades, a metilação em locais individuais do Bloco 1 CpG foi significativamente associada com a atividade de arilesterase e esta relação foi fortemente associada à idade de 9 anos. Os níveis de metilação neste Bloco 1 estavam fortemente associados à atividade de arilesterase da PON1	Os alelos T do polimorfismo -108 foram associados com níveis de metilação. Encontrou-se fortes evidências do fenomeno ASM entre o polimorfismo PON1-108 e a metilação em um conjunto de sites CpG em torno do TSS que também foi associado com PON1.
Huen et al., 2009	Examinar os efeitos da idade e do genótipo na atividade enzimática da PON1 em uma coorte de nascimento de crianças mexicano-americanas.	Coorte	Amostra: 458 crianças Idade: nascimento, 1, 2, 5 e 7 anos. PON1: atividade paraoxonase, arilesterase e chorpírfos. Polimorfismos: 192 e -108	Houve um aumento dependente da idade nas três medidas da atividade da PON1 desde o nascimento até os 7 anos de idade. O genótipo PON1192 modificou significativamente o efeito da idade na atividade da paraoxonase. As crianças com o diplótipo PON1-108CC192RR tinham atividades PON1 significativamente maiores etambém tiveram aumentos mais acentuados da atividade de paraoxonase ao longo do tempo em comparação com crianças com o diplótipo PON1-108TT192QQ.	Os níveis mais baixos da enzima PON1 mostraram ser dependentes da idade, onde atingiram valores maiores somente aos 7 anos.
Koncsos et al. 2010	Estudar as alterações e possíveis correlações das atividades de PON1, leptina e adiponectina na obesidade infantil.	Clinico transversal	Amostra: 59 crianças obesas, 51 grupo controle. PON1: atividade paraoxonase e arilesterase Variáveis:HDL, LDL, CT, TG,PCR, Ureia, Creatinina, bilirrubina, leptina, selectina, adiponectina, hematócrito e hemoglobina. Também foi avaliado estágios de Tanner.	Os níveis de HDL foram significativamente mais baixos e os níveis mais elevados de glucose, LDL, TG, foram observados nas crianças obesas. As crianças obesas apresentaram níveis significativamente mais elevados de HOMA-IR e de insulina plasmática em jejum. Observou-se valores significativamente menores em ambas as atividades da PON1 (paraoxonase e arilesterase ) no grupo obeso em comparação com as crianças de peso normal. As crianças obesas tiveram adiponectina significativamente menor (e maiores níveis de leptina A atividade de arilesterase de PON1 mostrou uma correlação positiva significativa com os níveis de adiponectina e uma correlação negativa significativa com os níveis de leptina.	As crianças obesas apresentaram um perfil lipidico e níveis de glicemia elevados, além de níveis de resistência a insulina. As atividades paraoxonase e arilesterase foram significativamente menores no grupo obeso.



Autor/ Ano	Objetivos	Tipo de estudo	Metodos	Principais Resultados	Conclusões
Agirbasli et al., 2014	Determinar os níveis da atividade paraoxonase e arilesterase da PON1 em relação à resistência à insulina e obesidade entre crianças e adolescentes.	Clínico transversal	Amostra: 169 crianças e adolescentes. Idade: 12,5 anos Variáveis: IMC, HDL, LDL, HOMA-IR, TG PON1: atividade arilesterase e paraoxonase.	- Os níveis de HDL correlacionaram-se positivamente com a atividade de PON1 - A correlação entre os níveis de HDL e a atividade de PON1 permaneceu mais significativa entre os indivíduos do grupo controle. - Entre os indivíduos com IR ou obesidade, os níveis de PON1 foram negativamente correlacionados com o IMC e circunferência da cintura.	Os determinantes da atividade da enzima PON1 variam em crianças e adolescentes com base na IR e obesidade. Os níveis de HDL estão correlacionados de forma positiva com a enzima paraoxonase 1, principalmente em indivíduos saudáveis. A atividade da PON1 estão negativamente correlacionadas com os valores de IMC e circunferência da cintura.
Eren et al., 2014	Avaliar as atividades de paraoxonase /arilesterase e avaliar a capacidade total de oxidantes e antioxidantes em crianças obesas e em crianças com síndrome metabólica.	Clinico transversal	Amostra: 151 crianças e adolescentes. Idade: 13 anos Grupos: com SMET e sem SMET e grupo controle. PON1: atividade paraoxonase e arilesterase. variáveis: Estado total oxidante (TOS), Estado total	Houve diferenças estatisticamente significativas no valores de glicemia de jejum, insulina de jejum, HOMA-IR, ALT, colesterol total, LDL, HDL, TG, hsCRP, arilesterase, TOS, TAS e OSI entre o SMET entre o grupo obeso e grupos controle (p <0,01). Foi observado diferenças estatisticamente significativas entre os valores de atividade de paraoxonase / arilosesterase entre os grupos obeso e controle.	As capacidades oxidantes, antioxidantes e atividade PON1 foram altas em crianças com Smet e também em crianças obesas. Os marcadores de obesidade em seres humanos são iniciados durante o período da infância.
Rupéres et al. 2013	Analisar o genótipo de dezesseis SNP de PON1, para medir as atividades de PON1 séricas e correlacionar esses achados com a incidência de obesidade infantil e características relacionadas.	Clinico transversal	Amostra: 179 crianças obesas e 189 grupo controle. Idade: 8,9 anos PON1: lactonase, arilesterase, paraoxonase e diaxoxonase. Variáveis: IMC, Pressão Arterial, adiponectina, leptina, capacidade antioxidante total, resistencia a insulina e variabilidade genética.	As crianças obesas apresentaram valores significativamente maiores de peso, IMC, pontuação z do IMC, circunferência da cintura, leptina e proteína de ligação aos ácidos graxos. Os parâmetros da síndrome metabólica, foram significativamente maiores nas crianças obesas, enquanto o índice quantitativo de controle de sensibilidade à insulina, HDL-colesterol e ApoA1 foram menores neste grupo. Os níveis de CT, HDL e ApoA1 foram correlacionados com a atividade diaxoxonase e arilesterase. Além disso, os níveis de retinol foram positivamente correlacionados com atividades de lactonase e arilesterase. SNP localizados na região promotora (rs854571, rs854572, rs854573, rs705382, rs757158 e rs13236941) estavam fortemente associados com atividades de lactonase, arilesterase e diaxoxonase; Apenas SNP rs854572 e rs757158 mostraram associações significativas com atividade de paraoxonase.	Observou-se que o SNP rs854566 sugere um papel protetor em relação à obesidade. Este SNP também mostrou fortes associações com atividades séricas de diaxoxonase, lactonase e arilesterase. As atividades de PON1 não foram significativamente diferentes em crianças obesas pré-púberes. A atividade da lactonase é um indicador confiável da função PON1.

Autor/ Ano	Objetivos	Tipo de estudo	Metodos	Principais Resultados	Conclusões
Korpacka et al., 2013	Avaliar a atividade de PON1 e a distribuição fenotípica em relação à obesidade e distúrbios metabólicos relacionados a obesidade, inflamação e estresse oxidativo em crianças e adolescentes.	Clinico transversal	Amostra: 156 crianças e adolescentes Idade: entre 10 e 17 anos PON1: atividade arilesterase e paraoxonase Variáveis: perfil lipídico, HOMA IR, estresse oxidativo e parâmetros antropométricos	A atividade da arilesterase PON1 diminuiu de forma significativa em obesidade central, hipertensão arterial, hiperinsulinemia e correlacionou com IMC, PCR, proteína de ligação a ácidos graxos, superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, tióis livres e HOMA IR de uma maneira dependente de gênero. A enzima PON1 correlacionou-se inversamente com IMC, A-FABP e PCR.	Houve uma diminuição da PON1 em associação com obesidade central e não geral. Os fatores associados independentemente com diminuição da PON1 foram encontradas dependentes do sexo: obesidade e estresse oxidativo relacionado a obesidade em meninas e inflamação em meninos.
Muchová et al. 2016	Investigar a relação entre 10 subfrações de HDL e parâmetros de perfil lipídico - CT, VLDL, subfrações de LDL e as atividades de arilesterase e lactonase da paraoxonase 1 em um grupo de crianças e adolescentes hipercolesterolêmicos e em crianças saudáveis.	clinico transversal	Amostra: 27 crianças com dislipidemia Idade: 11 a 17 anos PON1: atividade arilesterase e lactonase. Variáveis analisadas: IMC e HDL e suas 10 subfrações	A subfração L-HDL3 foi significativamente menor no grupo doentes do que no controle. Os níveis das subfrações I-HDL6 e I-HDL7 e a soma das subfrações de foram significativamente menores no grupo de doentes do que no grupo controle. As maiores subfrações de L-HDL, subfrações de LDL antiaterogênicas, subfrações de S-HDL e menores subfrações de LDL aterogênicas associaram-se positivamente. A atividade de PON1-L correlacionou-se positivamente com a subfração de L-HDL1 anti-aterogênica e correlacionou-se negativamente com as subfrações intermediárias de I-HDL.	Houve associação positiva entre as grandes subfrações de L-HDL e subfrações de LDL antiaterogênicas e entre subfrações de S-HDL e subfrações pequenas de LDL aterogênicas em crianças e adolescentes hipercolesterolêmicos. A atividade de PON1-L correlacionou-se positivamente com a maior subfração de L-HDL1 anti-aterogênica e correlacionou-se negativamente com as subfrações intermediárias de I-HDL 4, 5 e 6.
Zaki et al., 2014	Investigar a concentração de paraoxonase sérica (PON1) e os marcadores de estresse oxidativo e avaliar suas relações com os parâmetros bioquímicos em adolescentes obesos.	Clinico transversal	Amostra: 150 crianças e adolescentes. Idade: 16 e 18 anos Grupos: obeso e controle PON1: atividade arilesterase e paraoxonase. Variáveis: o óxido nítrico (NO), malonaldeído, antropometria, glicemia de jejum, concentrações de insulina, CT, HDL e LDL.	A média do peso corporal, IMC e CC foi significativamente maior em indivíduos obesos. Os níveis de colesterol sérico, LDL-C, TG, insulina, glicose e HOMA-IR aumentaram significativamente em adolescentes obesos em comparação aos controles, enquanto que o HDL-C foi significativamente menor. Os níveis de paraoxonase e NO nos pacientes obesos foram significativamente inferiores aos controles, enquanto o MAD foi significativamente maior. Houve correlação negativa significante entre os níveis de PON1 e MAD e entre PON1 e IMC em adolescentes obesos.	A obesidade é um fator importante para maiores níveis de estresse oxidativo e está associada com menor capacidade enzimática PON1 antioxidante. O perfil lipídico aumentou significativamente em adolescentes obesos, assim como os níveis de PON1 e NO.
Koncsos et al., 2011	Investigar o efeito de mudanças de estilo de vida de curto prazo sobre a alteração das atividades de paraoxonase-1 (PON1), leptina, adiponectina, E selectin e dimetilarginina assimétrica (ADMA) como fatores aterogênicos e antiaterogênicos em crianças obesas.	Clinico de intervenção	Amostra: 151 crianças Idade: 11,8 anos PON1: atividade paraoxonase e arilesterase. Variáveis: HDL, LDL, CT, TG, PCR, Ureia, Creatinina, bilirrubina, leptina, selectina, adiponectina, hematócrito, hemoglobina e estágios de Tanner. - 2 semanas com dieta e atividade física	Houve diminuição significativa do IMC, BFP e circunferência da cintura. Os níveis de CT, LDL, TG, leptina, E-selectina e ADMA diminuíram significativamente. A atividade de paraoxonase de PON1 mostrou um aumento significativo. Houve uma correlação positiva significativa da concentração de leptina com os níveis de IMC, BFP, HOMA e triglicerídeos (antes do programa de estilo de vida). A adiponectina apresentou correlação positiva significativa com os níveis de HDL-C e correlação negativa significativa com os valores de HOMA.	O aumento da atividade física e dieta resultou em mudanças antiaterogênicas em obesidade infantil.

**Quadro 3. Estudos que associam a PON1 e o consumo de gorduras**

Autor/ Ano	Objetivos	Tipo de estudo	Métodos	Principais Resultados	Conclusões
Iglesia et al., 2014	Avaliar as relações entre a atividade AREase da PON1 e os marcadores antropométricos e bioquímicos, a ingestão de antioxidantes dietéticos e os níveis de metilação de citosina da região reguladora da transcrição do gene PON1 em adultos com síndrome metabólica.	clinico transversal	Amostra: 47 adultos Idade: 47 anos; 6 meses de estudo, 8 primeiras semanas de intervenção nutricional, com acompanhamento a cada 15 dias e 4 meses posteriores de controle; Ingestão dietética: recordatório de 48 horas; Variáveis: IMC, PA, HDL, LDL, TG,CT,Glicose e ApoB; PON1: atividade arilesterase; Análise dos níveis de metilação dos sítios CpG	Os participantes apresentaram valores significativamente menores de peso corporal, IMC, circunferência da cintura, RCQ, massa gorda total e massa gorda andróide. Reduziram significativamente os valores de SBP, DBP e MBP, glicose plasmática e Apo B .Os valores de LDL e HDL foram significativamente maiores. A relação ARE / HDL foi significativamente menor. Os níveis de atividade AREase de PON1 foram significativamente correlacionados com as concentrações de CT,HDL e Apo B A atividade AREase de PON1 mostrou correlações positivas com a ingestão de vitamina C, tocoferóis totais e licopeno, foi encontrada uma correlação inversamente significativa entre os sítios CpG1, CpG2, CpG3 e CpG4 com a atividade enzimática arilesterase.	A atividade arilesterase diminuiu em paralelo com os marcadores relacionados a síndrome metabólica, enquanto a ingestão de antioxidantes na dieta aumentou a atividade AREase, reduzindo a metilação do gene PON1.
Loued et al. 2013	Avaliar as propriedades anti-inflamatórias do HDL e de PON1, relacionados com o processo de envelhecimento e determinar se o consumo do azeite de oliva extra virgem, melhora a atividade anti-inflamatória do HDL em jovens e idosos.	clinico transversal	Amostra: 22 participantes Grupos: 1 - idade entre 20 e 30 anos; 2- com idade entre 65 e 85 anos. 12 semanas consumindo 25 ml de azeite de oliva extra virgem; Análise Bioquímica: T1 e T12 Variáveis: LDL, HDL, peroxidação lipídica e estresse oxidativo; PON1: atividade paraoxonase e arilesterase; Análise do genótipo Q192r	O efeito anti-inflamatório do HDL mostrou-se dependente da idade. Na presença de LDL oxidado, o HDL reduziu de forma significativa o seu efeito pró-inflamatório. Enriquecimento de HDL com PON1 aumentou significativamente o efeito anti-inflamatório. O LDL oxidado aumentou significativamente a migração de monócitos enquanto que o HDL reduziu significativamente a migração de monócitos. As concentrações plasmáticas de glicose em T12 e pressão arterial sistólica e diastólica no grupo de idosos foram significativamente reduzidas com o consumo do azeite de oliva A atividade arilesterase e concentrações plasmáticas de PON1 aumentaram significativamente no grupo de idosos a T12.	A atividade anti-inflamatória do HDL reduziu de forma significativa com o aumento da idade. A enzima PON1 está envolvida na regulação da atividade ateroprotetora. A diminuição da atividade anti-inflamatória foi independente das concentrações plasmáticas de HDL. Uma dieta rica em azeite de oliva extra virgem, pode reduzir significativamente com o aumento da idade as atividades anti-inflamatórias de HDL e PON1 pela redução ou prevenção dos danos causados pelo estresse oxidativo.

Autor/ Ano	Objetivos	Tipo de estudo	Metodos	Principais Resultados	Conclusões
Arumina et al. 2013	Avaliar o efeito do consumo de óleo de coco virgem, sobre o status antioxidante, a atividade da paraoxonase 1 e os marcadores peroxidantes formados durante a oxidação de lipídios e proteínas em comparação com óleo de coco, óleo de oliva e óleo de girassol.	Experimental	Amostra: 24 ratos Sprague-Dawley. Grupos: 4 grupos com 6 ratos em cada. Os grupos receberam dieta sintética com 8% de de óleos. Grupo 1: CO, Grupo 2: VCO, Grupo 3: OO, Grupo 4: SFO. Variáveis: catalase, superóxido dismutase, glutatona peroxidase e glutatona redutase. Análise dos ácidos graxos e vitamina E nos óleos. PON1: atividade paraoxonase e arilesterase	As atividades de enzimas antioxidante catalase, superóxido dismutase, glutatona peroxidase e glutatona redutase foram significativamente maiores nos ratos alimentados com VCO. A concentração de glutatona redutase aumentou significativamente nos ratos alimentados com CO. A atividade da paraoxonase 1 foi significativamente maior em ratos alimentados com VCO em comparação com aqueles alimentados com CO, OO e SFO. Os animais alimentados com VCO mostraram uma diminuição na peroxidação lipídica.	Observou-se o efeito benéfico do óleo de coco virgem, sobre os outros óleos analisados, sob a atividade da PON1 e na peroxidação lipídica
Moya et al. 2007	Investigar se a atividade de PON1 está envolvida na resposta neutralizante do estresse oxidativo associado ao jejum e se a atividade sérica de PON1 é alterada pelo jejum.	experimental	Amostra: 25 ratos winstar; Divididos em 5 grupos com 5 ratos em cada; 1 grupo com água e dieta livre e os outros 4 grupos submetidos a jejum de 6, 12, 24 e 48 horas, respectivamente; PON1: atividade paraoxonase e arilesterase. Variáveis: HDL, LDL, CT, TG, glutatona redutase e glutatona peroxidase	A atividade da glutatona peroxidase no fígado diminuiu significativamente ao longo do jejum. A privação de alimentos causou uma redução significativa nos níveis séricos de peróxido lipídico às 6 e 12 h de jejum. As primeiras horas de jejum levaram, ao aumento da atividade sérica de arilesterase e paraoxonase, atingindo níveis mais altos às 12 h. A partir das 12h, a atividade arilesterase diminuiu significativamente. A atividade da paraoxonase permaneceu maior até 24 h de jejum.	As primeiras horas de jejum estão associadas ao aumento da atividade sérica de arilesterase e paraoxonase da PON1. Após 12 horas a atividade arilesterase reduz de forma significativa e a atividade paraoxonase mantém-se em níveis mais elevados até 24 horas de jejum.
Moya et al. 2008	Avaliar se o estado pró-oxidante e pró-inflamatório associado ao aumento da adiposidade poderia influenciar a atividade da PON1 e os principais fatores envolvidos na sua expressão, estabilidade e função, de forma dependente do sexo	experimental	Amostra: 24 ratos winstar 2 grupos: grupo dieta de cafeteria e grupo controle; Variáveis: HDL, LDL, TG, glicose, insulina, adiponectina, leptina e resistência a insulina, peroxidação lipídica. PON1: atividade paraoxonase e arilesterase	Alimentação de cafeteria-dieta induziu um ganho significativo de peso corporal em ratos de ambos sexos. Os níveis de insulina aumentaram significativamente em machos e fêmeas. Em ambos os sexos, a atividade de TBARS/arilesterase e as proporções de atividade de TBARS/paraoxonase, indicam a perda de capacidade antioxidante de PON1, aumentaram com a alimentação da dieta de cafeteria.	A resposta de atividade sérica da PON1 em relação ao consumo da dieta de cafeteria, mostra associação com o estado obeso e pró-inflamatório em ratos fêmeas. A diminuição da atividade de PON1 em ratos alimentados com dieta de cafeteria, é devida ao estresse oxidativo aumentado e danos causados pela obesidade.

**Quadro 4. Estudos com polimorfismos genéticos da região -108 e crianças**

Autor/ Ano	Objetivos	Tipo de estudo	Metodos	Principais Resultados	Conclusões
Eskenazi et al. 2010	Estimar as associações entre o desenvolvimento neurológico e os genótipos PON1, com a atividade da enzima paraoxonase 1 medida em crianças no nascimento e aos 2 anos de idade e nas mães no parto.	coorte	Amostra: 351 mulheres grávidas e 365 crianças até 2 anos de idade Polimorfismos: Q129R e -108C/T; Exposição a pesticidas: analisado através da urina coletada PON1: atividade paraoxonase e arilesterase	Os genótipos PON1-108TT e PON1 192QQ foram associados com medidas enzimáticas menores. Aos 2 anos de idade, as atividades médias de paraoxonase e os níveis de Arilesterase foram duas a três vezes maiores do que no sangue do cordão umbilical. Crianças de dois anos apresentaram padrões enzimáticos similares de paraoxonase em relação ao seu genótipo, como quando eram neonatos. O alelo PON1-108T permaneceu associado a um menor desempenho no Bayley MDI e PDI.	O alelo PON1-108T está relacionado ao desenvolvimento mental e, em menor grau, ao desenvolvimento psicomotor em crianças. O gene PON1 está associado a uma série de pontos finais neurológicos em adultos e em crianças.
Huen et al. 2009	Examinar os efeitos da idade e do genótipo na atividade enzimática da PON1 em uma coorte de nascimento de crianças mexicano-americanas.	Coorte	Amostra: 458 crianças Idade: nascimento, 1, 2, 5 e 7 anos. PON1: atividade paraoxonase, arilesterase e chlorpyrifos-oxon Polimorfismos: 192 E -108	Houve um aumento dependente da idade nas três medidas da atividade da PON1 desde o nascimento até os 7 anos de idade. O genótipo PON1192 modificou significativamente o efeito da idade na atividade da paraoxonase. As crianças com o diplótipo PON1-108CC192RR tinham atividades PON1 significativamente mais elevadas e também tiveram aumentos mais acentuados da atividade de POase ao longo do tempo em comparação com crianças com o diplótipo PON1-108TT192QQ.	Os níveis mais baixos da enzima PON1, persistem em crianças com idade inferior a 2 anos de idade, e aumentam com pelo menos 7 anos de idade. As crianças com o diplótipo PON1-108CC192RR mostraram atividades PON1 significativamente mais elevadas.
Huen et al. 2010	Realizar uma comparação longitudinal do papel do controle genético sobre as atividades enzimáticas PON1, no nascimento e também sete anos depois. e também comparar as atividades de PON1 entre mães e crianças em ambos os pontos de tempo.	coorte	Amostra 431 mulheres e 434 crianças com 7 anos de idade; PON1: atividade paraoxonase, arilesterase e chlorpyrifos-oxon Polimorfismos : PON1192, PON155, PON1-162,PON1-108	As atividades enzimáticas em mães ao nascimento e sete anos depois foram correlacionadas de forma significativa e muito maiores para a paraoxonase do que para arilesterase e CPOase . A diferença entre a atividade da PON1 entre crianças e mães foi maior em crianças com genótipos associados com baixas atividades de PON1 (PON1-108TT, PON1192QQ e PON1-909CC). Nas mães, as atividades PON1 foram elevadas no parto e durante a gravidez.Tanto em mães quanto em crianças, os cinco polimorfismos PON1 (192, 55, -108, -909, -162) explicaram uma proporção de variância de atividade paraoxonase (62-78%) significativamente maior do que a atividade arilesterase (12,3-26,6%)	As crianças com genótipos associados à diminuição das atividades de PON1, os níveis da atividade enzimática permanecem menores que os de suas mães, mesmo aos sete anos de idade.

Continuação quadro 4

Autor/ Ano	Objetivos	Tipo de estudo	Metodos	Principais Resultados	Conclusões
<b>Martín et al. 2015</b>	Explorar as frequências de SNPs e CNVs, bem como a prevalência de haplótipos e polimorfismos combinados a fim de identificar os indivíduos em risco de potenciais efeitos adversos para a saúde da exposição crônica aos pesticidas OP.	clinico transversal	Amostra: 496 crianças; Idade: entre 3 e 11 anos Polimorfismos: BCHE-K, BCHE-A, PON1Q192R, PON1L55M, PON1108C / T, CYP2C19 G681A, CYP2D6 G1846A, CYP3AP1 44G / A, GSTM1 0 e GSTT1	O polimorfismo da região codificante PON1 Q192R estava em desequilíbrio de ligação com PON1 L55M e o polimorfismo da região promotora -108C / T. PON1 L55M também estava em desequilíbrio de ligação com PON1 -108C / T. A análise do qui quadrado para polimorfismos genéticos mostrou associações estatisticamente significativas entre os dois SNPs estudados no gene BCHE e entre os três SNPs de PON1 estudados, foram observadas associações significativas entre as variantes polimórficas CYP2C19 e CYP3AP1.	Encontrou-se desequilíbrio de ligação entre os três polimorfismos genéticos de PON1 estudados e entre BCHE-K e BCHE-A. A combinação adversa de genótipo (variantes incomuns de BCHE, PON1 55MM/? 108TT e genótipo nulo para GSTM1 e GSTT1) potencialmente conferindo maior risco genético de exposição a organofosforados foi observada em 0,2% da população estudada.
<b>Huen et al. 2015</b>	Determinar a relação da metilação do DNA no gene PON1 com polimorfismos genéticos de PON1 e com a expressão gênica no nível protéico em crianças CHAMACOS.	Clinico transversal	Amostra: 378 recém nascidos e 247 crianças de 9 anos de idade. PON1: atividade arilesterase Polimorfismo: PON1-108	Observou-se associações positivas muito fortes do número de alelos T de PON1-108 com níveis de metilação. Em ambas as idades, a metilação em locais individuais de Bloco 1 CpG foi significativamente associada com a atividade arilesterase, e esta relação foi mais forte à idade de 9 anos. Os níveis de metilação neste Bloco 1 estavam fortemente associados à atividade arilesterase da PON1	Encontramos fortes evidências de ASM entre o promotor polimorfismo PON1-108 e metilação em um conjunto de sites CpG em torno do TSS que também foi associado com níveis de PON1.

### **1.2.1 Estudos que abordam paraoxonase 1 em crianças**

Nesta revisão, foram pesquisados estudos relacionados a PON1 e crianças. Observou-se que a grande maioria dos estudos encontrados a média de idade era 10 a 17 anos, poucos estudos envolvendo crianças menores de 9 anos e a atividade da PON1 foram encontrados.

HUEN e colaboradores, em um estudo de coorte no México, observaram que a atividade da PON1 aumenta de forma dependente da idade, chegando em níveis similares aos de adultos aos 7 anos.

Foram encontrados quatro estudos que relacionam a atividade da PON1 de forma negativa com parâmetros de síndrome metabólica e obesidade e de forma positiva com indivíduos saudáveis. (ZAKI et al. 2014; EREN et al. 2014; AGIRBASLI et al. 2014; KORPACKA et al. 2013). Em um estudo com indivíduos obesos, Zaki e colaboradores, comprovaram que a capacidade antioxidante da enzima paraoxonase 1 é reduzida de forma significativa, em condições inflamatórias.

Ao submeter crianças com obesidade a uma mudança no estilo de vida através de atividade física e dieta, Koncsos e seus colaboradores observaram um aumento significativo da atividade da PON1 e também uma melhora de forma positiva nos parâmetros antropométricos e bioquímicos destas crianças.

O SNP rs854566 sugere um papel protetor em relação à obesidade e também foi fortemente associado com atividades séricas de diazoxonase, lactonase e arilesterase (RUPÉREZ et al. 2013)

Ao analisar as subfrações de HDL, foi visto que a atividade lactonase de PON1 correlacionou-se positivamente com a maior subfração de L-HDL1 anti-aterogênica e de forma negativa com as subfrações intermediárias de I-HDL 4, 5 e 6, em crianças e adolescentes com hipercolesterolemia (MUCHOVÁ et al. 2016).

### **1.2.2 Estudos que abordam a enzima paraoxonase 1 associada ao consumo de gorduras**

A enzima paraoxonase 1 é modulada por vários fatores, dentre eles a dieta, pouco se conhece sobre a relação PON1 e dieta em crianças. Nesta revisão encontramos apenas estudos feitos com adultos e animais que abordam a atividade da PON1 e o consumo de gorduras.

Em uma coorte de 1402 pessoas, o consumo de gorduras monoinsaturadas e saturadas, mostrou uma correlação positiva com a atividade da PON1, enquanto que as gorduras poli-insaturadas foram negativamente associadas com a atividade desta enzima. (KIM et al. 2013)

Bostham e seus colaboradores, em um estudo com 140 homens adultos, verificaram que a composição dos ácidos graxos da dieta no HDL, pode influenciar sua modulação. Desta forma os indivíduos que possuíam os níveis de HDL menores que 39mg/dl, tiveram uma maior proporção de ácidos graxos saturados menor proporção de poli-insaturados na composição do HDL, respectivamente, foi observado também que a atividade da pon1, mostrou-se fortemente correlacionada com os ácidos graxos monoinsaturados.

Ao submeter 47 adultos com síndrome metabólica a uma intervenção nutricional com restrição de energia, durante 6 meses, foi possível verificar que a atividade da PON1 está relacionada a marcadores para condição. A ingestão dietética de antioxidantes mostrou relação positiva com a atividade da PON1. (IGLESIA et al. 2014).

Loued e colaboradores, encontraram em seu estudo com jovens e idosos que, a atividade anti-inflamatória do HDL reduziu de forma significativa com o aumento da idade e a diminuição da atividade anti-inflamatória foi independente das concentrações plasmáticas de HDL. Uma dieta rica em azeite de oliva extra virgem, pode reduzir significativamente, com o aumento da idade, as atividades anti-inflamatórias de HDL e PON1.

Moya e colaboradores (2008), verificaram em seu estudo com ratos que a atividade da PON1 foi reduzida em ratos alimentados com dieta de cafeteria feita com alimentos ricos em gordura e carboidratos, mostrou também que esta atividade é dependente de gênero, sendo menores em fêmeas.

Em um estudo realizado com ratos alimentados com uma dieta enriquecida de óleo de coco extra virgem, houve um aumento na atividade da PON1 e uma redução na peroxidação lipídica, quando comparados com os outros óleos estudados (ARUMINA et al. 2013)



### **1.2.3 Estudos com polimorfismos genéticos da região -107 e crianças**

Os polimorfismos da enzima PON1, são associados a vários fatores, em humanos, nesta revisão encontramos seis artigos que abordam polimorfismos e crianças.

Eskenazi e colaboradores (2010), encontrou que o alelo PON1-107T está relacionado ao desenvolvimento mental e, em menor grau, ao desenvolvimento psicomotor em crianças.

Em seus estudos de coorte Huen e seus colaboradores encontraram que as crianças com o diplótipo PON1-107CC/192RR mostraram maiores atividades de PON1. As crianças com genótipos associados à diminuição das atividades de PON1, os níveis da atividade enzimática permanecem menores que os de suas mães.

Martín e colaboradores (2015), observaram que houve um desequilíbrio de ligação entre os três polimorfismos genéticos de PON1 estudados e entre BCHE-K e BCHE-A. A combinação adversa de genótipo confere potencialmente maior risco genético de exposição a organofosforados.

Kordi-Tamandani e colaboradores (2012), em seu estudo com 320 adultos com síndrome metabólica observaram que o genótipo PON1 (Q192R) está significativamente associado ao aumento do risco de síndrome metabólica.

### **1.2.4 Estudos envolvendo PON1, consumo de gorduras e polimorfismos em crianças**

Poucos estudos foram encontrados com crianças, em grande parte a média de idade (entre 10 e 17 anos) ultrapassa a infância e alcança a puberdade limitando os estudos sobre a atividade da enzima e crianças. Nesta relação PON1/crianças observou-se que a maior parte dos resultados refere-se a fatores antropométricos e bioquímicos, mostrando uma redução da atividade enzimática quanto a marcadores como dislipidemias, síndrome metabólica e obesidade. Foi visto também que a atividade da PON1 responde de forma dependente da idade.

A atividade da PON1 é modulada por vários fatores como: hormonais,

ambientais, genéticos e nutricionais. Quanto aos achados sobre PON1/consumo de gorduras e crianças, não foram encontrados estudos que abordem este tema na infância, observou-se apenas estudos em adultos e animais. A qualidade da dieta foi um fator que interferiu na atividade da paraoxonase. O consumo de gorduras quando associado a PON1, mostrou que a enzima tem sua atividade aumentada quando associada com o consumo de ácidos graxos monoinsaturados e saturados e mostrou uma relação inversa quando associada com ácidos graxos poli-insaturados. Outro achado importante foi que níveis de HDL mais baixos estão associados a uma atividade enzimática menor.

O polimorfismo da região -107 mostrou-se associado com o desenvolvimento neurológico em crianças e também observou-se que crianças que apresentam o diplótipo PON1-108CC192RR mostraram atividades de PON1 significativamente mais elevadas.

Em toda a revisão os estudos abordaram a atividade para vários substratos, dentre eles os mais encontrados foram o fenilacetato, para a atividade arilesterase e o paraoxon para a atividade paraoxonase. Outros substratos encontrados nestes estudos foram: chorpyrifos-oxon, diaxozon e lactonase.

Estudos que relacionam a enzima Paraoxonase 1, crianças, consumo de gorduras e polimorfismos foram abordados na presente revisão, visto o quanto são escassos achados que abordem estes temas é importante realizar mais estudos para verificar os fatores, que na infância, já comprometem a atividade da paraoxonase 1.

## **1.3 OBJETIVOS**

### **1.3.1 Objetivo geral**

Investigar a associação entre a atividade da PON1, a qualidade da dieta, polimorfismos genéticos e perfil lipídico em crianças de 5 a 8 anos de idade atendidas no Ambulatório de Pediatria da Faculdade de Medicina/UFPEL e no Centro de Especialidades da cidade de Pelotas-RS.

### **1.3.2 Objetivos específicos**

- Descrever as características da população estudada, no que se refere ao perfil genético, lipídico e estado nutricional;
- Analisar a qualidade da dieta;
- Analisar a atividade arilesterase da paraoxonase-1;
- Descrever as associações entre a atividade da PON1, qualidade da dieta, polimorfismo genético e perfil lipídico na população analisada.

## **1.4 HIPÓTESES**

- A atividade arilesterase dos portadores do genótipo -107 CC será significativamente maior do que a média dos portadores do genótipo -107 TT;
- Uma menor atividade arilesterase da PON1 será verificada nas crianças que consumam dieta de menor qualidade e que apresentem genótipo -107 TT;

## **1.5 METODOLOGIA**

### **1.5.1 Delineamento**

O presente estudo terá um delineamento transversal.

### **1.5.2 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 e no Centro de Especialidades da cidade de Pelotas – RS, no período de agosto de 2017 a março de 2018.

### **1.5.3 Amostra**

A amostra será composta por crianças de 5 a 8 anos de idade, atendidas no Ambulatório de Pediatria da Faculdade de Medicina/UFPEL e no Centro de especialidades da Cidade de Pelotas-RS, que atenderem aos critérios de inclusão no período da coleta de dados, conforme cálculo amostral.

#### **1.5.3.1 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 e CEs, no período de realização do estudo.

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), alterações genéticas, como Síndrome de Down, talassemia e doenças inflamatórias.

### 1.5.3.2 Cálculo do tamanho amostral

O cálculo do tamanho da amostra partiu da revisão de literatura e de dados de um estudo piloto, considerando média do consumo de frituras semanal de maior que 3 vezes na semana e menor que 4 vezes na semana, através do 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. 2). 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 250 pacientes no estudo.

Variável/ Exposição	Atividade arilesterase da PON1		Relação Não exposto/ exposto	N	n <sup>a</sup>
	Exposto	Não exposto			
Polimorfismo	TT 103,3 ± 23,7	CC 138,5 ± 30,3	1,5 28,3%/18,4%	20	26
Sexo	Masculino 77,3 ± 2,3	Feminino 85,8 ± 3,7	0,75 27/36	4	6
Consumo de frituras	≥ 3 vezes na Semana 82,4 ± 16,0	≤4 vezes na semana 89,0 ± 18,0	0,76	194	242
Total					250

Figura 2 - Cálculo do tamanho de amostra para as diversas exposições. <sup>a</sup> Número total de crianças incluindo 10% para perdas e recusas e 15% para controle de fatores de confusão.

### 1.4 Logística e caracterização dos locais

O estudo será desenvolvido no Ambulatório de Pediatria vinculado a Faculdade de Medicina/UFPEL, localizado no bairro Fragata e no Centro de especialidades, ambos 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. O centro de especialidades, abrange a população em geral e conta com diversas especialidades de atendimento, além de ser uma referência para a procura de vacinas.

Os Ambulatórios elencados realizam atendimentos diariamente em dois turnos, de segunda a sexta-feira, com uma média de 35 atendimentos por dia.

Toda criança encaminhada ao serviço de saúde 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 Figura 3.

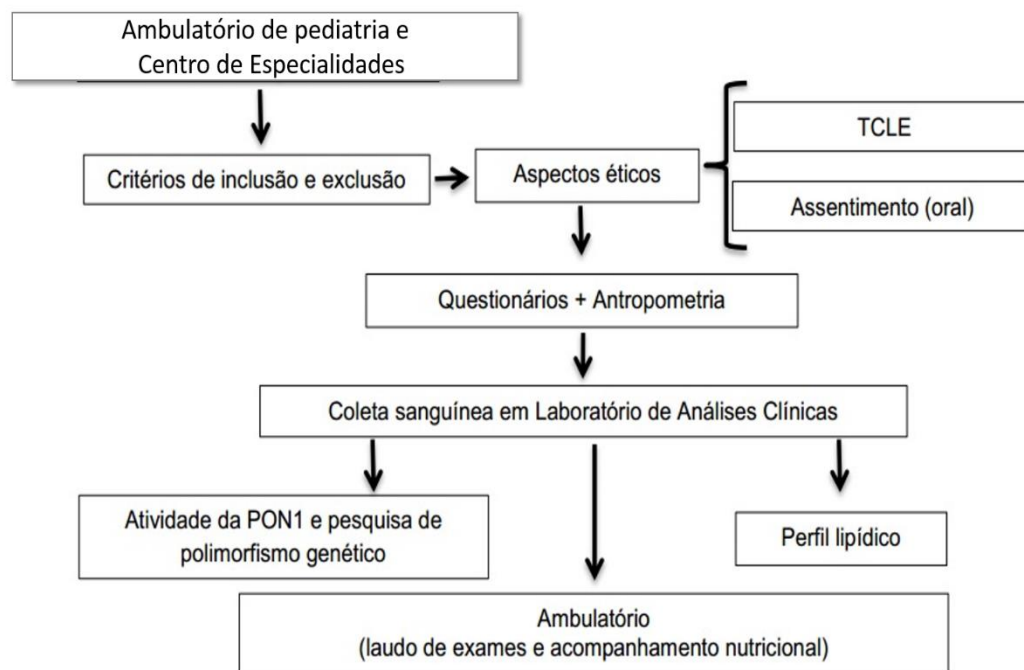


Figura. 3. Recrutamento e fluxograma da coleta de dados

## 1.5 Definição do desfecho

### 1.5.1 Atividade arilesterase da PON1

O soro obtido será mantido a  $-20^{\circ}\text{C}$  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 270 nm, temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$ , em espectrofotômetro. As amostras serão diluídas 1:3 em 20 mm de Tampão Tris/HCl, pH 8,0, contendo 1 mm de  $\text{CaCl}_2$ . A solução reagente será de tampão Tris/HCl, pH 8,0, contendo 1 mm de  $\text{CaCl}_2$ , a qual serão adicionados 4 mm 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 1uM de fenol/minuto e expressa em U/L, com base no coeficiente de extinção de fenol. Amostras em branco contendo água serão utilizadas para corrigir a hidrólise não enzimática.

### 1.5.6 Definição das variáveis de exposição

#### 1.5.6.1 Polimorfismo genético -107C/T da enzima PON1

Para extração de DNA genômico, o sangue coletado (300 uL de sangue total) será adicionado de tampão de quebra de hemácias (Tris-HCl 10 mM, pH 7,6, 109,54 g de sacarose, 1,01 g de MgCl<sub>2</sub> e 10 ml 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 uL de proteinase K (20 mg/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 50µl 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 (ULIANO et al. 2016)

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 42%, corados com SYBR Safe (Applied Biosystems) (CAMPO et al. 2004).

#### 1.5.6.2 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 Figura 4.

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

Figura 4 - 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. 5).

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

### 1.5.6.3 Determinação dos níveis séricos dos lipídeos

Serão coletados cerca de 5 mL 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. Os triglicerídeos e glicose 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 Diretriz de Prevenção da Aterosclerose na Infância e na Adolescência, desenvolvida pela Sociedade Brasileira de Cardiologia (2005), que estão descritos na Fig. 5. Serão consideradas dislipidêmicas, as crianças que apresentarem pelo menos um fator de risco aterogênico, ou seja, no mínimo um valor de lipídeo alterado.

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

Figura 6 - 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.

#### 1.5.6.4 Consumo alimentar e Análise da Qualidade da dieta

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 dezoito alimentos distribuídos em 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. O QFCA compreenderá a frequência de consumo semanal de: feijão; macarrão instantâneo; carne/frango, peixes e mariscos; batata frita/mandioca ou aipim frito/banana frita; salada crua; batata cozida/mandioca ou aipim cozido; legumes cozidos (menos batata e mandioca/aipim); maionese/manteiga; hambúrguer/cachorro-quente; leite/iogurte/queijos; frutas; suco de fruta natural; refrigerante; salgados (coxinha e pastel); doces/balas/sobremesa; presunto/salame/mortadela/linguiça e biscoito (chips/recheado).

A cada frequência específica, conforme a estrutura do QFA, será dada uma pontuação. A pontuação (positiva ou negativa) baseou-se nas diretrizes para a alimentação saudável preconizada pelo Ministério da Saúde e descrita nos estudos de Molina e colaboradores (2010) e Momm e colaboradores (2014). Para os

alimentos/grupos de alimentos recomendados para consumo diário, foi acrescido um ponto, quando estes forem consumidos todos os dias, como por exemplo: frutas, verduras, legumes, feijão e leite. No caso de consumo menor que sete vezes por semana (duas ou quatro vezes por semana, dependendo do alimento/grupo), será subtraído um ponto. Será também acrescido um ponto para um consumo menor ou igual a duas vezes por semana para os itens considerados de baixa qualidade nutricional, como balas, refrigerantes, frituras, macarrão instantâneo, hambúrguer e maionese, e subtraído um ponto para as frequências diárias desses alimentos. Após somatório da pontuação individual, a qualidade da dieta será classificada em inadequada e adequada, utilizando como ponto de corte a mediana da distribuição da variável entre todos os avaliados.

Grupos Alimentares	Pontuacao Positiva	Pontuacao Negativa
Salada crua (alface, tomate, cenoura, pepino, repolho, etc.)	7 vezes/ semana= +1	≤ 4 vezes/ semana = -1
Legumes e verduras cozidos (couve, abóbora, chuchu, brócolis, espinafre, etc.) (não considerar batata e mandioca)	7 x/sem= +1	≤ 4 x/sem = -1
Frutas frescas ou salada de frutas	7 x/sem= +1	≤ 2 x/sem = -1
Feijão	7 x/sem= +1	≤ 2 x/sem = -1
Leite ou iogurte	7 x/sem= +1	≤ 4 x/sem = -1
Batata frita, batata de pacote e salgados fritos (coxinha, quibe, pastel, etc.)	≤ 2 x/sem = +1	7 x/sem= -1
Hambúrguer e embutidos (nuggets, steak, salsicha, mortadela, salame, presunto, linguiça, etc.)	≤ 2 x/sem = +1	7 x/sem= -1
Bolachas/ biscoitos salgados ou salgadinhos de pacote	≤ 2 x/sem = +1	7 x/sem= -1
Bolachas/ biscoitos doces ou recheados, doces, balas e chocolates (em barra ou bombom)	≤ 2 x/sem = +1	7 x/sem= -1
Refrigerante (não considerar os diet ou light)	≤ 2 x/sem = +1	7 x/sem= -1
Costuma realizar desjejum	7 x/semana= +1	≤ 2 x/sem = -1
Costuma realizar as refeicoes a mesa	7 x/semana= +1	≤ 2 x/sem = -1

Figura 7: Pontuação atribuída para obtenção do índice de qualidade da alimentação, segundo a frequência de consumo alimentar de crianças nos sete dias anteriores a entrevista.

### 1.5.7 Instrumentos

O peso das crianças será aferido utilizando balança plataforma digital da marca Welmy, com capacidade para 200 kg e precisão de 100 g. Para obter a

medida da altura será utilizado estadiômetro acoplado à balança, com capacidade de 200 cm e precisão de 0,5 cm. 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.

#### **1.5.8 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.

#### **1.5.9 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.

#### **1.5.10 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.

#### **1.5.11 Análises dos dados**

Os dados coletados serão analisados utilizando-se o software STATA versão 12. O presente projeto de pesquisa se encontra em fase de planejamento sendo assim a proposição da análise estatística requer prudência. Em linhas gerais as análises envolverão métodos estatísticos convencionais de média, desvio padrão e frequência, de comparação das médias e prevalências entre os grupos e de regressão linear simples e multivariada. O nível de significância adotado será de  $p < 0,05$ .

#### **1.5.12 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.

### 1.6 Orçamento

O orçamento do projeto será financiado parte por membros da equipe e parte por projetos previamente contemplados com bolsa em parceria científica. 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. 8).

Material	Valor unitário (R\$)	Valor total (R\$)
Análises de Biologia molecular	1500,00	1500,00
Análise do perfil lipídico	14,08	1408,00
Material de expediente (folhas, canetas, toner)	200,00	200,00
Valor total (R\$)	1175,71	3108,00

Figura 8 - Orçamento do projeto de pesquisa.

### 1.7 Divulgação de resultados

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



## 1.8 CRONOGRAMA

<b>FASES</b>	<b>1° sem. 2017</b>	<b>2° sem. 2017</b>	<b>1° sem. 2018</b>	<b>2° sem. 2018</b>
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 9: Cronograma de trabalho

## 1.9 REFERÊNCIAS

AGIRBASLI, M; TANRIKULU, A; ERKUS, E; AZIZY, M; SEVIM, BA; KAYA Z; TASKIN, A, AKSOY, N; DEMIRBAG, R. Serum paraoxonase-1 activity in children: the effects of obesity and insulin resistance. **Acta cardiologic**, v.69, n.6, p. 679-685, 2014

ARUNIMA, S; RAJAMOH, T. Effect of virgin coconut oil enriched diet on the antioxidante status and paraoxonase 1 activity in ameliorating the oxidative stress in rats – a comparative study. **Food & Function**. v.4, p-1402-1409, 2013

BOSHTAM, M.; RAZAVI, A.; POURFAEZAM, M.; ANI, M.; NADERI, G.; BASATI, G.; MANSOURIAN, M.; DINANI N.; ASGARY, S.; ABDI, S. Serum Paraoxonase 1 Activity Is Associated with Fatty Acid Composition of High Density Lipoprotein. **Disease Markers**, V.35, n.4, p. 273–280, 2013.

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.

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

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 in children with metabolic

syndrome. *Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology*. V.6, n.3. p.163-168,2014

ESKENAZI, B; HUEN, K; MARKS, A; HARLEY, QG; BRADMAN, A; BARR, D; HOLLAND, N. PON1 and Neurodevelopment in Children from the CHAMACOS Study Exposed to Organophosphate Pesticides *in Utero*. **Research Children's Health**. v.118, n.2, p.1775-1781, 2010

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.

Hong, YM. Atherosclerotic cardiovascular disease beginning in childhood. **Korean Circulation Journal**, v.40, n.1, p.1–9, 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.

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; YOUSEFI, P; STREET, K; ESKENAZI, B; HOLLAND N. PON1 as model for integration of genetic epigenetic and expression. Data on susceptibility genes. **Environmental Epigenet**, v.3, n1, 2015.

IGLESIA, R; MANSEGO, ML; SÁNCHEZ-MUNIZ, F; ZULET, M; MARTINEZ, J. Arylesterase activity is associated with antioxidante intake and paraoxonase-

1(pon1) gene methylation in metabolic syndrome patients following a energy restricted diet. **EXCLI Journal**. v. 13, p. 416-426, 2014.

JUONALA, M. Influence of Age on Associations Between Childhood Risk Factors and Carotid Intima-Media Thickness in Adulthood The Cardiovascular Risk in Young Finns Study, the Childhood Determinants of Adult Health Study, the Bogalusa Heart Study, and the Muscatine Study for the International Childhood Cardiovascular Cohort (i3C) Consortium. **CIRCULATION**, v. 122, p. 514-520, 2010.

KIM, D.; MADEN, S.; BURT, A.; RANCHALIS, J.; FURLONG, C.; JARVIK, G. Dietary fatty acid intake is associated with paraoxonase 1 activity in a cohortbased analysis of 1,548 subjects. **Lipids in Health and Disease**, v.12, n.12, p.183, 2013.

KIM, D.; BURT, A.; RANCHALIS, J.; RICHTER, R.; MARSHALL, J.; NAKAYAMA, K.; JARVIK, E.; EINTRACHT, J.; ROSENTHAL, E.; FURLONG, C.; AND JARVIK, G. Dietary cholesterol increases paraoxonase 1 enzyme activity. **The journal of lipid Research** v 53, n11, p. 2450–2458, 2012.

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

KONCSOS, P; SERES, I; HARANGI, M; PÁLL, D; JÓZSA, L; BAJNOK, L; NAGY, E. PARAGH., G. Favorable effect of short-term lifestyle intervention on human Paraoxonase-1 activity and adipokine levels in childhood obesity. **Journal of the American College of Nutrition**. v.30, n.5, p.333-339, 2011.

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.

LOU-BONAFONTE, M; GABÁS-RIVERA, C; NAVARRO, A; et al. PON1 and Mediterranean diet. *Nutrients*.v.7 n.40, p.68–92, 2015.

LOUED, S; BERROUGUI, H; COMPONOVA, P; IKHLEF, S; HELAL, O; KHALIL, A. Extra-virgin olive oil consumption reduces the age- related decrease in HDL and paraoxonase 1 anti-inflammatory activities. **British Journal of Nutrition**. v. 110, p.1272-1284, 2013.

MACKNESS, B; DURRINGTON, P; MCELDOUFF, 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.

MARTÍN, G; HERNÁNDEZ, F; GONZÁLEZ, M; ALZAGA, B; BARRANCO R; FLORES, L; GARDUNO, A; LACASANA, M. Polymorphisms of pesticide-metabolizing genes in children living in intensive farming communities. **Chemosphere**. v.139, p. 534-540, 2015.

MOLINA, B; LOPÉZ, M; FARIA, P; CADEI, V; ZANDONADE, E. Preditores socioeconômicos da qualidade da alimentação de crianças. **Revista de saúde pública**. v.44, n.5, p. 732-785, 2010.

MOMM, N; HÖFELMANN, A. Qualidade da dieta e fatores associados em crianças matriculadas em uma escolar municipal de Itajaí, Santa Catarina. **Caderno de saúde coletiva**. V.22, n.1, p.32-39, 2014.

MOYÀ, E; GIANOTTI, M; PROENZA, A; LLADÓ, I. Paraoxonase 1 Response to a High-Fat Diet: Gender Differences in the Factors Involved. **Molecular Medicine** v.13, n.3 – 4, p. 203 - 209, 2007.

MOYÀ, E; PÉREZ, Y; FIOL, M; GIANOTTI, M; LLADÓ, I; PROENZA, A. Gender Related Differences in Paraoxonase 1 Response to High-fat Diet–induce Oxidative Stress. **Obesity Journal**. V.16, n.10 p. 2232–2238, 2008.

MUCHOVÁ, J; ANDREZÁLOVÁ, L; ORAVEC, S; NAGYOVÁ, Z; GARAIOVA, I; ĎURAČKOVÁ, Z. High density lipoprotein subfractions and paraoxonase 1 in children. **Acta Biochimica Polonica**. v.63, n.3, p. 555-563, 2016.

MUNIZ, L.; ZANINI, R; SCHNEIDER, B; TASSITANO, R; FEITOSA, W *et al*. Prevalência e fatores associados ao consumo de frutas, legumes e verduras entre adolescentes de escolas públicas de Caruaru, PE. **Ciênc Saúde Coletiva**. 2013; 18 (2): 393-404.

ONIS, M; ONYANGO, A; BORCHI, 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.

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

PIRES, A.; CASTELA, E.; SENA C.; SEIÇA, R. Obesidade: paradigma da disfunção endotelial. **Acta Med. Port**. V.28, N.2, P.233-239, 2015.

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

RUMISKA, R. et al. Carotid Intima-Media Thickness and Metabolic Syndrome

Components in Obese Children and Adolescents. **Neuroscience and Respiration**, P.1-10, 2017.

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.

SHAH, N; WONG, C; COX, N; KELLY, AM; SOON, K. Prevalence of Asymptomatic Coronary Heart Disease in the Siblings of Young Myocardial Infarction Patients as Detected by Coronary Computer Tomography Angiography: A Pilot Study. **Heart, Lung and Circulation**. V.17, p. 1-7, 2017.

SAHEBKAR, A; HERNÁNDEZ-AGUILERA, A; ABELLÓ, D; SANCHO, E; CAMPS, J; JOVEN, J. Systematic review and meta-analysis deciphering the impact of fibrates on paraoxonase-1 status. **Metabolism-Clinical and Experimental** 65, 609–622, 2016.

SCHRADER, C. RIMBACH, G. Determinants of Paraoxonase 1 status: genes, drugs and nutrition. **Curr Med Chem**. 2011; 18 (36): 5624-43.

SIEGRIST, M; HANSEN, H; LAMMEL, C. A cluster randomised school-based lifestyle intervention programme for the prevention of childhood obesity and related early cardiovascular disease (JuvenTUM 3). **Bio Med Central**. v.22, n.258, 2011.

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 CARDIOLOGIA. IV Diretriz brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose. Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.101, n.4, suplemento 1, 2013.

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.

ULIANO, G; MUNIZ, L; BARROS, C; SCHNEIDER, A; VALLE, S. Association between paraoxonase 1 (PON1) enzyme activity, PON1 C(- 107)T polymorphism, nutritional status, and lipid profile in children. **Nutrire**. V.41, n.20, 2016.

ZAKI, M; BASSYOUNI, H; KAMAL, S; GAMMAL, M; YOUNESS, E. Association of serum paraoxonase enzyme activity and oxidative stress markers with dyslipidemia in obese adolescents. **Indian journal of Endocrinology and Metabolism**, v.18, n.3, p. 340–34, 2014.



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



Relatório de trabalho de campo

Paraoxonase 1: análise da influência da qualidade da dieta,  
fatores genéticos e bioquímicos em crianças

**Tainá da Silva Sigales**

Pelotas, 2018.

## **2.1 Logística do trabalho de campo**

O trabalho de campo iniciou em novembro de 2013, com uma pausa em fevereiro de 2015, retomado em setembro de 2017 e finalizado em março de 2018. Foram realizadas as seguintes atividades pela estudante de mestrado:

- Formatação dos questionários;
- Seleção e treinamento das entrevistadoras;
- Estudo piloto;
- Coleta de dados;
- Administração dos insumos e materiais biológicos da pesquisa;
- Treinamento em técnicas bioquímicas e de biologia molecular;
- Análises laboratoriais.

## **2.2 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, 3 alunos realizaram as coletas, onde receberam treinamento de 20 horas e, ao término deste, estavam 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 foi coordenado pelas pesquisadoras do estudo, com objetivo principal de explicar a pesquisa e a logística do trabalho a ser desenvolvido. Os entrevistadores receberam certificado conforme as horas trabalhadas.

## **2.3 Estudo Piloto**

O estudo piloto serviu 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).

## **2.4 Coleta de dados**

A primeira coleta de dados foi realizada no período de 22 de janeiro a 30 de outubro de 2014 e a segunda coleta foi realizada no período de 01 de setembro a 23 de março de 2018. 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.

## **2.5 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.

## **2.6 Digitação e processamento de dados**

Esta etapa foi realizada utilizando-se do programa Microsoft Excel 2016 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.

## **2.7 Perdas**

Foram consideradas perdas os indivíduos que não completaram o protocolo de pesquisa. O total de perdas correspondeu a 91 crianças (33,0%) pacientes, houve 5 recusas. Dentre os motivos para as perdas encontram-se crianças que não compareceram ao laboratório para coleta de sangue (n=69), amostras em quantidade insuficiente para análise da atividade enzimática (n=5) e perdas de amostras pelo laboratório da coleta (n=22). Ao final o estudo contou com a participação de 97.

## **2.8 Análises laboratoriais**

As análises laboratoriais foram realizadas entre março de 2014 e fevereiro de 2015 e entre setembro de 2017 e março de 2018, 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. 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 102 crianças avaliadas, 97 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.

## **2.9 Modificações do projeto de pesquisa**

O projeto de pesquisa previa para esta segunda etapa de coleta a obtenção de uma amostra de 80 crianças, no período de setembro de 2017 a março de 2018. O laboratório onde foi feita a coleta sanguínea, em razão da troca de chefia descartou um número importante de amostras durante este período. Dada esta situação e o tempo já transcorrido foi necessário ampliar o tempo de coleta e a pesquisa finalizada no mês de abril de 2018.

Os resultados desta dissertação serão apresentados na sequência deste volume sob a forma de manuscrito o qual foi formatado conforme as normas para publicação no Jornal de Pediatria.

**Influência de fatores nutricionais e do polimorfismo PON1 C(-107)T sobre a  
atividade da Paraoxonase 1 na infância**

Título curto: Paraoxonase 1 e fatores associados em crianças

Tainá S. Sigales<sup>1</sup>, Augusto Schneider<sup>2</sup>, Ludmila Muniz<sup>3</sup>, Sandra C. Valle<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Mestranda em Nutrição e Alimentos. Faculdade de Nutrição - Universidade Federal de Pelotas –[tainasigales@hotmail.com](mailto:tainasigales@hotmail.com).

<sup>2</sup>Prof Dr. Augusto Schneider. Faculdade de Nutrição - Universidade Federal de Pelotas - [augustoschneider@gmail.com](mailto:augustoschneider@gmail.com).

<sup>3</sup>Prof Dr. Lumila Muniz. Faculdade de Nutrição – Universidade Federal de Pelotas [ludmuniz@yahoo.com.br](mailto:ludmuniz@yahoo.com.br)

<sup>4</sup>Profª Dra. Sandra Costa Valle. Faculdade de Nutrição - Universidade Federal de Pelotas – [sandracostavalle@gmail.com](mailto:sandracostavalle@gmail.com).

Autor correspondente: T. Sigales, 55 53 9845273388, e-mail  
[tainasigales@gmail.com](mailto:tainasigales@gmail.com)

Conflito de interesses: Os autores declaram que não existe conflito de interesse.

Resumo: 247 palavras

Texto: 3.000 palavras

Figuras e Tabelas: 4

## Resumo

**Objetivo:** investigar a influência da qualidade da alimentação, do estado nutricional e do polimorfismo genético PON1 C(-107)T sobre a atividade da enzima antiaterogênica Paraoxonase 1 (PON1) na infância. **Métodos:** estudo transversal com crianças entre 5 e 8 anos incompletos, de ambos os sexos, do ambulatório de pediatria, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Pelotas. Foram coletadas variáveis sociodemográficas e de consumo alimentar, aferidos peso, altura e circunferência da cintura e solicitada coleta de sangue. O índice de massa corporal (IMC) foi calculado em kg/m<sup>2</sup> e escore z. A atividade arilesterase da PON1 foi medida pela velocidade de formação de fenol (U/L) utilizando fenilacetato como substrato. O polimorfismo PON1 C(-107)T foi determinado por reação em cadeia da polimerase (PCR), seguido por digestão com enzima de restrição e eletroforese em gel de agarose e posterior amplificação. As análises estatísticas foram ANOVA de uma via e regressão linear múltipla, o nível de significância adotado foi  $p < 0,05$ . **Resultados:** a frequência dos alelos CT, TT e CC foi 54,6%, 14,4% e 30,9%, respectivamente. A maior atividade da PON1 associou-se ao alelo CC. Na análise bruta e ajustada a associação entre a PON1 e os polimorfismos manteve-se significativa. A inclusão da frequência de consumo alimentar e do escore z do IMC aumentou em 11,2% a variabilidade da enzima. Uma maior mudança no coeficiente beta ocorreu com os alimentos de boa qualidade nutricional. **Conclusão:** uma alimentação de boa qualidade nutricional foi importante para predizer a atividade da enzima cardioprotetora PON1 na infância.

**Palavras chave:** Paraoxonase 1, criança, dieta, estado nutricional

## **Abstract**

**Objective:** to investigate the influence of food quality, nutritional status and genetic polymorphism PON1 C (-107) T on the activity of the antiatherogenic enzyme PON1.

**Methods:** a cross-sectional study with children between 5 and 8 years of age, of both sexes, from the pediatric clinic in the Medical Scholl of the Federal University of Pelotas. Sociodemographic variables and food consumption, weight, height and waist circumference were collected and blood samples were obtained. The body mass index (BMI) was calculated in  $\text{kg/m}^2$  and z-score. The PON1 arylesterase activity was measured by the rate of phenol formation (U/L) using phenylacetate as substrate. The PON1 C (-107) T polymorphism was determined by polymerase chain reaction (PCR), followed by restriction enzyme digestion and agarose gel electrophoresis and subsequent amplification. Statistical analyzes were performed using one-way ANOVA and multiple linear regression, with the level of significance adopted being  $p < 0.05$ . **Results:** the frequency of CT, TT and CC alleles was 54.6%, 14.4% and 30.9%, respectively. The highest activity of PON1 was significantly associated with the CC allele. In the unadjusted and adjusted analyzes the association between PON1 and polymorphisms was significant. The inclusion of the frequency of food consumption and z-score of BMI increased by 11.2% the variability of the enzyme. The largest change in the beta coefficient occurred with foods of good nutritional quality. **Conclusion:** a good food quality of feeding was important to predict the activity of the cardioprotective enzyme PON1 in infancy.

**Key words:** Paraoxonase 1, infancy, food, nutritional status



## **Introdução**

A PON1 é uma enzima cálcio dependente, expressa em humanos sobretudo no fígado e é detectada no plasma predominantemente ligada as Apo-proteínas A<sub>1</sub> e J das partículas da lipoproteína de alta densidade (HDL)<sup>1</sup>. A enzima atua no metabolismo dos fosfolipídios das lipoproteínas, em especial na lipoproteína de baixa densidade (LDL), prevenindo o dano oxidativo a suas frações lipídicas e os efeitos pró-inflamatórios dos lipoperóxidos na camada íntima dos vasos sanguíneos<sup>2</sup>. Estudos mostram que principalmente o aumento da arilesterase e, em menor extensão, da lactonase associam-se à redução do dano endotelial e do risco de doença cardiovascular (DCV)<sup>1,2</sup>. Contudo, a expressão, a concentração, a atividade e os sítios de ligação da PON1 sofrem importante influência de fatores genéticos e ambientais, dentre estes últimos destaca-se a alimentação<sup>1,3,4</sup>

O tipo de gordura da alimentação habitual exerce influência significativa sobre a PON1, a quantidade e a composição dos lipídios da dieta são fatores chave na modulação da atividade da enzima<sup>5</sup>. O consumo de frutas, verduras e legumes mostraram uma associação positiva com a PON1 auxiliando na prevenção da DCV, possivelmente, por meio de substâncias protetoras como vitaminas, minerais antioxidantes e diferentes componentes fenólicos<sup>1,4,5,6</sup>.

A adoção de uma alimentação natural encontra-se em declínio entre as famílias e, conseqüentemente, as crianças estão expostas precocemente a alimentos ultraprocessados, com alto teor de gorduras e com baixo valor nutritivo. Segundo a Pesquisa de Orçamento Familiar (POF 2008-2009)<sup>7</sup>, a alimentação das crianças brasileiras é pobre em legumes, verduras e frutas e rica

em bebidas açucaradas, biscoitos recheados, hambúrgueres, salgados e embutidos<sup>8</sup>. Estes últimos quatro tipos de alimentos são, caracteristicamente, ricos em gorduras totais, ácidos graxos saturados, transesterificados e poliinsaturados da série ômega 6<sup>8</sup>.

A relação entre a atividade da enzima e o estado nutricional também tem sido investigada em crianças e adolescentes<sup>9,10,11</sup>. A maior parte dos estudos relatam que a enzima tem menor atividade em crianças com excesso de peso<sup>12,13,14</sup>. Apesar disso vale considerar que os estudos sobre este tema, na sua maioria, não refletem apenas a infância uma vez que incluíram pré-adolescentes e adolescentes e, desta forma, também suas influencias hormonais.

Os polimorfismos de PON1 identificados no gene humano são responsáveis por mais de 60% da variação interindividual na concentração e atividade da enzima<sup>15</sup>. Uliano et al.<sup>16</sup> ao analisarem a atividade arilesterase da PON1 em crianças saudáveis de 5 a 8 anos de idade verificaram que o polimorfismo PON1 C(-107)T associou-se a uma maior atividade enzimática. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi investigar a influência da alimentação, do estado nutricional e do polimorfismo genético C(-107)T sobre a atividade arilesterase da enzima antiaterogênica PON1 na infância.

## **Metodologia**

Estudo transversal realizado com crianças entre 5 e 8 anos de idade incompletos, de ambos os sexos, atendidas no Ambulatório de Pediatria da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), na cidade de Pelotas – RS. O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em

Pesquisa da Faculdade de Medicina da UFPEL (504.362/2013).

Crianças diagnosticadas com 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 foram excluídas do estudo. Os responsáveis das crianças elegíveis foram devidamente esclarecidos e convidados, e os que autorizaram a participação no estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE. O assentimento da criança foi questionado oralmente antes do início das avaliações e respeitada sua decisão.

Os responsáveis responderam a um questionário sociodemográfico, de comportamento e de consumo alimentar das crianças, foram realizadas medidas antropométricas e solicitada a coleta de sangue em laboratório de análises clínicas. As duas primeiras categorias de variáveis coletadas no questionário foram renda familiar (em R\$ convertidos a salários mínimos), idade da mãe (anos completos), escolaridade materna (anos completos de estudo), número de pessoas no domicílio e tempo (em horas) frente a telas (computador, celular, tablet, videogames, televisão). A cor da pele foi observada e classificada como branca e não branca.

Após jejum de 12 horas amostras de 5ml de sangue foram coletadas em laboratório de análises clínicas, aliquotadas e congeladas a -80°C para análises bioquímicas posteriores.

A atividade arilesterase da PON1 foi medida em amostras de soro 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<sub>2</sub> (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 80 segundos. Considerou-se uma unidade de atividade arilesterase da PON1 igual a 1µM de fenol/minuto e esta foi expressa em U/L, com base no coeficiente de extinção de fenol<sup>16</sup>. As análises foram realizadas em duplicata e amostras em branco contendo água deionizada foram utilizadas para corrigir a hidrólise não enzimática.

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 C(-107)T foi feita a uma temperatura de anelamento de 67°C, por 35 ciclos, com o uso dos *primers*: *forward* 5'AGCTAGCTGCGGACCCGGCGGGGAGGaG3' e *reverse* 5'GGCTGCAGCCCTCACCACAACCC3'. 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. Os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose (Kasvi, Paraná, BR) de 3%, corados com SYBR Safe (Applied Biosystems)<sup>17</sup>.

O Índice de Qualidade da Alimentação (IQA) deste estudo foi elaborado tendo como referência o Índice de Alimentação do Escolar (Ales) com a adaptação de duas questões originais. O IQA baseou-se: **1)** na identificação de componentes comportamentais, especificamente do hábito de realizar desjejum e do local onde as crianças realizavam as refeições e **2)** na frequência do consumo alimentar, de acordo com o formulário de marcadores do consumo alimentar, proposto pelo Ministério da Saúde do Brasil, 2009.

A frequência de consumo alimentar, nos sete dias anteriores ao da entrevista, considerou dezoito alimentos (salada crua, legumes e verduras cozidos, frutas, feijão, leite ou iogurte, batata frita e salgados, embutidos, bolachas e salgadinhos, doces e refrigerante), distribuídos em dez grupos alimentares.

A cada frequência específica, foi atribuída uma pontuação, positiva ou negativa, com base nas diretrizes para uma alimentação saudável preconizadas pelo Ministério da Saúde do Brasil. Para os alimentos de alta qualidade nutricional foi acrescido um ponto quando foram consumidos todos os dias, como frutas, verduras, legumes, feijão e leite. No caso de consumo menor que sete vezes por semana (duas ou quatro vezes por semana, dependendo do alimento), foi subtraído um ponto. Foi acrescido um ponto para um consumo menor ou igual a duas vezes por semana para os itens considerados de baixa qualidade nutricional como balas, refrigerantes, frituras, hambúrguer e subtraído um ponto para as frequências diárias desses alimentos. A pontuação máxima do IQA correspondeu a 12 pontos. Sendo

assim, quanto maior a pontuação total melhor a qualidade da alimentação.

O 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 avaliar o estado nutricional utilizou-se o Índice de Massa Corporal (IMC) para idade em escore-z, segundo recomendação da Organização Mundial da Saúde de 2007<sup>18</sup>, através do programa AnthroPlus (Organization 2007). Crianças com IMC-para-idade  $>+1DP$  foram classificadas com excesso de peso. A circunferência da cintura foi aferida na linha da cintura, no ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca. O referencial utilizado para comparação foi o proposto por Freedman (1999)<sup>19</sup>.

Os dados foram digitados no Microsoft Excel 2013 e analisados no programa STATA versão 12.0 (Stata Corp., College Station, USA). A normalidade dos dados foi testada a partir do teste *Shapiro-Wilk*, as variáveis são apresentadas como frequência absoluta e relativa, média e desvio padrão (DP) e mediana e intervalo interquartil (IIQ)- p25-75. Na análise não ajustada foi utilizada a regressão linear simples para comparar a atividade da PON1 de acordo com o genótipo. As análises ajustadas foram realizadas por meio de regressão linear múltipla utilizando quatro modelos diferentes: **Modelo 1**= incluiu variáveis sociodemográficas de escolaridade materna, renda familiar, número de pessoas no domicílio, cor da pele e sexo; **Modelo 2**= incluiu as frequências absolutas de consumo alimentar dos alimentos de alta qualidade nutricional, ao ajuste do modelo 1; **Modelo 3**= incluiu as frequências de consumo alimentar dos alimentos de baixa qualidade nutricional, ao ajuste do modelo 2; **Modelo 4**= incluiu o escore

z do IMC ao ajuste do modelo 3. Examinou-se a mudança nos coeficientes de regressão (beta) e determinação ( $R^2$ ), sendo o nível de significância adotado de  $p < 0,05$ .

## **Resultados**

Foram entrevistadas 227 crianças, destas 193 atenderam aos critérios de inclusão na pesquisa, houve 5 recusas (2,6%). Noventa e uma crianças (49,7%) não completaram o protocolo do estudo, caracterizando-se como perdas. Destaca-se como causa, o não comparecimento ao laboratório para coleta de sangue (40,0%). Ao final, este estudo contou com a participação de 97 crianças.

Quanto as características da amostra (Tabela 1), observou-se que os sexos distribuíram-se igualmente (meninos 50,5%;  $n=49$ ), que 39,2% ( $n=38$ ) tinha idade igual a 6 anos, a maioria ( $n=85$ ) era de pele branca e a renda familiar correspondia a 2 ou menos salários mínimos vigentes. As atividades sedentárias prevaleceram para 50,5% ( $n=49$ ) da amostra. A circunferência da cintura ficou abaixo do percentil de risco para 65,0% ( $n=63$ ) das crianças e 55,0 % ( $n=53$ ) delas estavam eutróficas, segundo o escore z do IMC. A atividade arilesterase da PON1 correspondeu a mediana de 90UL (15-30).

O escore geral do IQA correspondeu a uma mediana e intervalo interquartil (IIQ) de 3 (2-5) pontos, sendo estes valores utilizados para distribuir a qualidade da alimentação em três níveis: baixa qualidade ( $\leq 1$  escore), média qualidade (2-4 escores) e alta qualidade ( $\geq 5$  escores). A comparação do escore geral do IQA entre as categorias de variáveis sociodemográficas, antropométricas e níveis da PON1 não indicou diferença estatística significava. A associação entre estas variáveis e

os três níveis de qualidade da alimentação foi testada e não houve diferença significativa (Tabela 1).

Na figura 1 observa-se a distribuição do polimorfismo PON1 C(-107)T e a influência do genótipo, do IQA e do genótipo de acordo com o IQA sobre a atividade arilesterase da PON1. A frequência dos alelos CT, TT e CC foi 54,6%, 14,4% e 30,9%, respectivamente (Fig.1 A). A atividade da PON1 foi significativamente maior na presença do alelo CC, comparada a dos alelos TT e CT (Fig.1B). Os níveis de atividade arilesterase foram similares entre as categorias do índice de qualidade da alimentação (Fig.1C). No entanto, o genótipo associado a qualidade da alimentação influenciaram significativamente na atividade da PON1. Naquelas com alelo CC um baixo escore do IQA se associou a uma menor atividade da PON1, quando comparadas as com alelo CT no mesmo nível de escore (Fig.1 D). Porém, as crianças com alelo CC que tinham uma alimentação de melhor qualidade, representada pelo IQA médio, apresentaram maior e significativa atividade enzimática comparadas as com alelo TT, no mesmo escore (Fig.1 D).

A análise bruta e ajustada da associação entre a atividade da PON1 e o polimorfismo PON1 C(-107)T é apresentado na Tabela 2. Na análise bruta as associações foram altamente significativas. Quando a análise foi ajustada para as variáveis sociodemográficas, de consumo alimentar e de estado nutricional a associação entre a atividade da PON1 e o polimorfismo manteve-se significativa. No ajuste do modelo 1 a inclusão das variáveis sociodemográficas explicaram 18,1 % da variabilidade na atividade arilesterase da PON1. Comparando-se este modelo com o modelo 4, que incluiu as frequências de consumo alimentar e o escore-z do IMC, constatou-se um adicional de 11,2% na variabilidade da enzima. Os



coeficientes de determinação ( $R^2$ ) dos modelos 1 e 4 foram, respectivamente 18,1% e 29,3%. Na análise ajustada a maior mudança no coeficiente beta ocorreu com a inclusão dos alimentos de boa qualidade nutricional. A porcentagem de variação da PON1 atribuída aos fatores genéticos e nutricionais é mostrada na Figura 2.

## **Discussão**

Neste estudo mostrou-se que fatores ambientais, a exemplo da qualidade da dieta e o IMC, associados ao polimorfismo C(-107)T são previsores da atividade arilesterase da PON1 na infância. Além disso, foram significativos para explicar uma variação de 29,3% na enzima. O genótipo CC e os alimentos de alta qualidade nutricional foram os fatores que destacadamente se associaram a uma maior atividade da enzima.

O polimorfismo PON1 C(-107)T influenciou na PON1, sendo o genótipo CC relacionado a uma maior atividade, o TT a uma menor atividade e o CT a um efeito intermediário. Os polimorfismos da região -107C/T tem maior efeito sobre a expressão e atividade arilesterase da enzima, contribuindo com 25% da variabilidade de sua expressão em adultos caucasianos<sup>20,21,22</sup>. O polimorfismo C(-107)T apresenta um forte efeito na expressão da PON1, sendo o alelo C associado a um nível duas vezes mais alto de enzima quando comparado ao alelo T<sup>23,24</sup>. O efeito do genótipo CC sobre a atividade da PON1 visto no atual estudo já foi apresentado em outros trabalhos com crianças na mesma faixa etária. Huen<sup>24</sup> e seus colaboradores, constataram que a atividade da PON1 nas crianças que apresentaram o genótipo CC foi maior do que as crianças com o genótipo TT. Em

especial, Uliano<sup>16</sup> e colaboradores mostraram que crianças com o genótipo CC para o polimorfismo PON1 C(-107)T apresentaram maior atividade sérica da enzima do que as portadoras do genótipo TT. A frequência dos genótipos observadas neste estudo está de acordo com resultados de outras pesquisas<sup>16,22,24</sup>. Um estudo de coorte CHAMACOS<sup>24</sup>, realizado com crianças da mesma faixa etária, registrou frequências similares as deste.

A expressão, a concentração, a atividade e os sítios de ligação da PON1 sofrem importante influência de fatores genéticos e ambientais<sup>3,4</sup>. Estudos em animais e humanos sugerem uma modulação dietética da enzima e atribuem aos antioxidantes efeito protetor a sua estrutura e função<sup>1,4</sup>. Neste estudo a presença de alimentos de boa qualidade nutricional alterou a atividade da PON1 associada ao polimorfismo PON1C(-107)T. Este resultado pode ser atribuído a uma maior participação das frutas, legumes e verduras na dieta de uma parcela das crianças. Em particular, um estudo de intervenção mostrou que o consumo de 6 porções diárias de frutas, verduras e legumes impactou no aumento de 7% na atividade arilesterase da PON1<sup>25</sup>. Jarvik et al.<sup>26</sup> mostraram que a atividade da PON1 correlacionou-se positiva e significativamente com o maior consumo alimentar de vitaminas antioxidantes, em especial das vitaminas C e E.

O IQA é um instrumento prático e adequado à realidade brasileira para monitorar a alimentação das crianças<sup>27,28</sup>. Uma alimentação de média qualidade verificada para uma parcela de 50,0% da amostra deste estudo não significa adequação do ponto de vista nutricional. Molina et al<sup>28</sup> ao avaliarem a qualidade da alimentação de 1282 escolares também verificaram que a maioria consumia uma alimentação de baixa qualidade. Frente aos baixos escores de qualidade da

alimentação encontrados no atual estudo optou-se por incluir nas análises a frequência absoluta de consumo alimentar da última semana.

Quanto ao escore z do IMC constatou-se sua correlação positiva com a enzima. Diversas pesquisas investigam a relação entre a enzima e o estado nutricional durante o ciclo vital<sup>9,10,11</sup>. No entanto, poucas referiram aumento da enzima associada ao IMC<sup>16,29,30</sup>. As divergências quanto ao efeito do IMC sobre a enzima podem decorrer da idade dos indivíduos selecionados, uma vez que muitas amostras misturam crianças e adolescentes. A obesidade nestas duas fases da vida cursa com diferenças que vão desde o tempo de exposição ao aumento do tecido adiposo, das citocinas pró-inflamatórias até o status hormonal.

Um maior tempo de exposição ao excesso de peso e um aumento do estado inflamatório, ainda que este seja de baixo grau, podem refletir num efeito inibitório sobre a enzima. Porém, na infância o aumento de peso e de formação de espécies reativas de oxigênio poderiam estar sendo compensados pela elevação da enzima. Convém registrar que a natureza complexa da obesidade limita as especulações, pois além dos aspectos citados ainda há influências do estilo de vida e da atividade física. Em particular, Koncos, et al.<sup>13</sup>, ao avaliarem 151 crianças, ressaltaram que após uma mudança no estilo de vida houve aumento da PON1.

Os resultados deste estudo devem ser ponderados frente a seus pontos fortes e suas limitações. Dentre os pontos fortes encontra-se a seleção de uma amostra de crianças em fase precoce do desenvolvimento e isenta doenças crônicas. Ainda, a identificação de um polimorfismo associado a atividade de uma enzima cardioprotetora. Dentre as limitações estão o método de avaliação dietética,

que estima apenas a qualidade da dieta e não estima a quantidade, podendo a frequência do consumo ser subestimada. O número de perdas de acompanhamento que implicou numa amostra reduzida, frente a estimada, e limita a validade estatística das probabilidades encontradas. No entanto, as análises ajustadas foram esclarecedoras quanto as influências mais relevantes para predizer a variabilidade da enzima na amostra deste estudo.

### **Conclusão**

Conclui-se que uma alimentação de boa qualidade nutricional na infância foi importante para predizer a atividade da enzima cardioprotetora PON1 associada ao polimorfismo C(-107)T. Este resultado estimula a orientação para o alcance das metas de consumo de alimentos como frutas, legumes e verduras na infância, especialmente na perspectiva de prevenção de DCV.

### **Referências**

- 1- Shunmoogam N, Naidoo P, Chilton R. Paraoxonase (PON)-1: a brief overview on genetics, structure, polymorphisms and clinical relevance. *Vascular Health and Risk Management*. 2018; 14: 137–143.
- 2- Mackness B, Durrington P, Mcelduff P, Farnel J, Azam N, et al. Ló paraoxonase activity predicts coronary events in the caerphilly prospective study. *Circulation*. 2003;107:2775–9.
- 3- Kim D, Maden S, Burt A, Ranchalis J, Furlong C, Jarvik G. Dietary fatty acid intake is associated with paraoxonase 1 activity in a cohortbased analysis of 1,548 subjects. *Lipids in Health and Disease*. 2013; 12(12):183.

- 4- Lou-bonafonte J, Gabás-rivera C, Navarro M, et al. PON1 and Mediterranean diet. *Nutrients*. 2015; 7; 40:68–92.
- 5- Muniz L, Zanini, R. Schneider B, Tassitano R, Feitosa N, et al. Prevalência e fatores associados ao consumo de frutas, legumes e verduras entre adolescentes de escolas públicas de Caruaru, PE. *Ciência e Saúde Coletiva*. 2013; 18 (2): 393-404.
- 6- Schrader C, Rimbach G. Determinants of paraoxonase 1 status: genes, drugs and nutrition. *Current Medicinal Chemistry*. 2011;18:5624–43.
- 7- Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF 2008-2009): Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil. IBGE, 2010.
- 8- 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*, v.101, n.4, suplemento 1, 2013.
- 9- Koncsos P, Seres I, Harangi M, Illyes I, Jozsa L, et al. Human paraoxonase-1 activity in childhood obesity and its relation to leptin and adiponectin levels. *Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology*. 2010; 67:309–13.
- 10-Seres I, Bajnok L, Harangi M, Sztanek, et al. Alteration of PON1 Activity in Adult and Childhood Obesity and Its Relation to Adipokine Levels. *Experimental Medicine and Biology*. 2010; 660:129-42.
- 11-Eren E, Abuhandan M, Solmaz A, Taskin A. Serum paraoxonase/arylesterase activity and oxidative stress status in children with metabolic syndrome. *Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology*. 2014;6:163–8.

- 12-Zaki M, El-Bassyouni H, Kamal S, El-Gammal M, Youness E. Association of serum paraoxonase enzyme activity and oxidative stress markers with dislipidemia in obese adolescents. *Indian Journal Endocrinologic Metabolism*. 2014;18:340–4.
- 13-Koncsos P, Seres I, Harangi M, Páll D, Józsa L, Bajnok L, et al. Favorable effect of short-term lifestyle intervention on human Paraoxonase-1 activity and adipokine levels in childhood obesity. *Journal of the American College of Nutrition*. 2011; 30 (5): 333-339.
- 14- Krzystek-Korpacka M, Patryn E, Hotowy K, Czapinska E, Majda J, et al. Paraoxonase (PON)-1 activity in overweight and obese children and adolescents: association with obesity-related inflammation and oxidative stress. *Advances Clinical and Experimental Medicine*. 2013; 22:229–36.
- 15-Ferretti G, Bachetti T. Effect of dietary lipids on paraoxonase-1 activity and gene expression. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*. 2012; 22: 88-94.
- 16-Uliano G, Muniz L, Barros C, Schneider A, Valle S. Association between paraoxonase 1 (PON1) enzyme activity, PON1 C(– 107)T polymorphism, nutritional status, and lipid profile in children. *Nutrire*. 2016; 41: 20.
- 17-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.

- 18-Onis M, Onyango W, 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 2007; 85:660-667.
- 19-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. 1999; 69 (2): 308-17.
- 20-Deakin S, Leviev I, Brulhart-Meynet C, James W. Paraoxonase-1 promoter haplotypes and serum paraoxonase: a predominant role for polymorphic position - 107, implicating the Sp1 transcription factor. Biochemical Journal. 2003; 372:643–9.
- 21-Brophy H, Jampsa L, Clendenning B, McKinstry A, Jarvik P, et al. Effects of 5' regulatory-region polymorphisms on paraoxonase-gene (PON1) expression. Am J Hum Genet. 2001;68:1428–36.
- 22-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. Toxicol Appl Pharmacol. 2010;244:181–9.
- 23-Grubiša I, Otašević P, Dimković D, Nedeljković I, Toljić B, Vučinić N. Genetic Polymorphisms of Paraoxonase 1 and Susceptibility to Atherogenesis. Serbian Archives of Medicine. 2013;141(9-10):629-633.
- 24-Huen K, Yousefi P, Street K, Eskenazi B, Holland N. PON1 as a model for integration of genetic, epigenetic, and expression data on candidate susceptibility genes. Environmental Epigenetics. 2015;1:1–11.

- 25-Daniels JA, Mulligan C, Mccance D, Patterson C 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. *Cardiovascular Diabetology*. p. 13-16, 2014.
- 26-Jarvik GP, Tsai NT, Mckinstry LA, Wani R, Brophy VH et al. Vitamin C and E intake is associated with increased paraoxonase activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. v. 22, p. 1329-1333, 2002.
- 27-Momm N, Höfelmann DA. Qualidade da dieta e fatores associados em crianças matriculadas em uma escolar municipal de Itajaí, Santa Catarina. *Caderno de saúde coletiva*. 2014 22; 1: 32-39.
- 28-Molina B, López M, Faria P, Cadei V, Zandonade E. Preditores socioeconômicos da qualidade da alimentação de crianças. *Revista de saúde pública*. 2010 44; 5:732-785.
- 29-Garcés C, López-Simón L, Rubio R, Benavente M, Cano B, 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*. 2007;19:287–92.
- 30- González V, Huen K, Venkat S, Pratt K, Xiang P, et al. Cholinesterase and paraoxonase (PON1) enzyme activities in Mexican-American mothers and children from an agricultural community. *Journal of Exposure Scienci and Environmental Epidemiology*. 2012; 22:641–8.



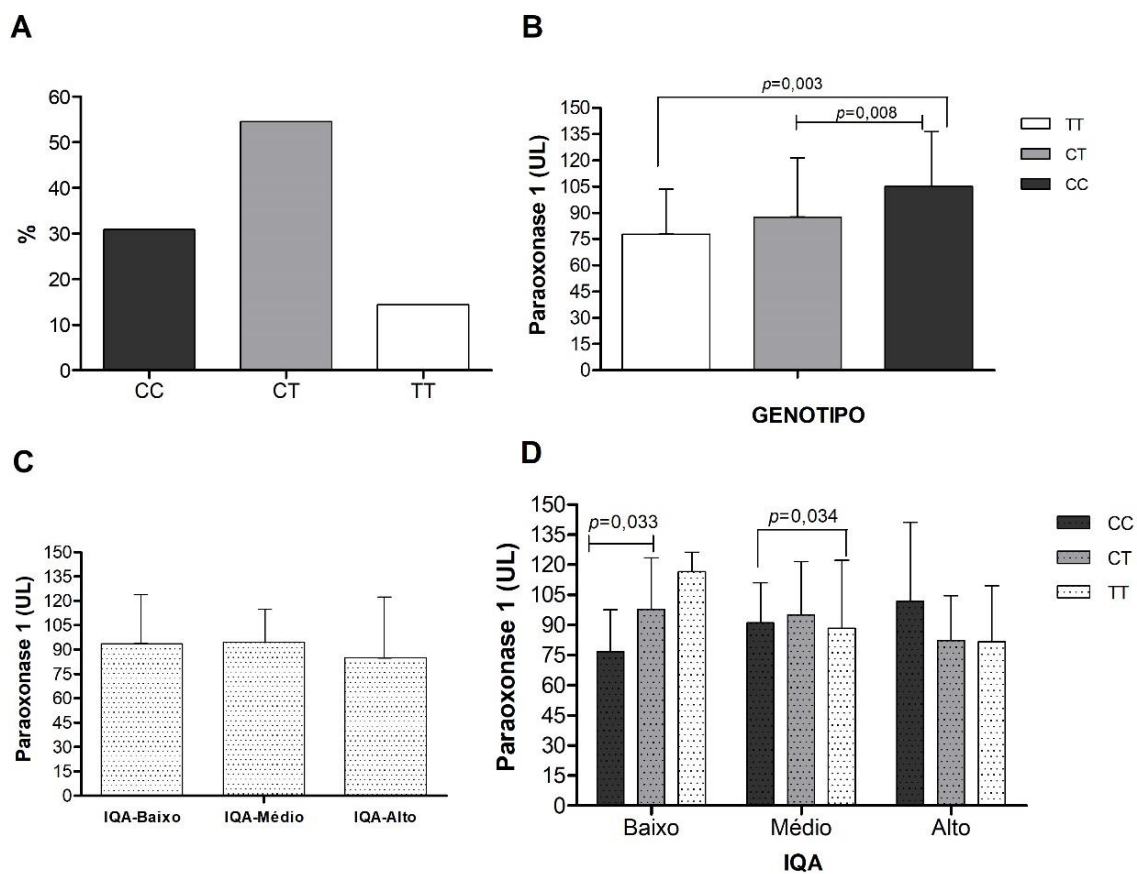
**Quadro 1:** Escore atribuído conforme a frequência semanal do consumo alimentar, habito de realizar café da manhã e local das refeições de crianças.

	FREQUENCIA SEMANAL	PONTUAÇÃO	FREQUENCIA SEMANAL	PONTUAÇÃO
<b>CONSUMO ALIMENTAR</b>				
Saladas (alface, tomate, cenoura, pepino, repolho, etc)	7 vezes	+1	≤ 4 vezes	-1
Legumes e verduras cozidas (couve, abobora, chuchu, brócolis, espinafre, etc)	7 vezes	+1	≤ 4 vezes	-1
Frutas frescas ou salada de frutas	7 vezes	+1	≤ 2 vezes	-1
Feijões	7 vezes	+1	≤ 2 vezes	-1
Leite, iogurte e queijo	7 vezes	+1	≤ 4 vezes	-1
Frituras (batata frita, batata de pacote, salgados fritos)	≤ 2 vezes	+1	7 vezes	-1
Embutidos (hambúrguer e empanados industrializados, salsichas, salame, linguiça, etc)	≤ 2 vezes	+1	7 vezes	-1
Salgadinhos (salgadinhos de pacote, biscoitos salgados, bolachas)	≤ 2 vezes	+1	7 vezes	-1
Biscoitos doces (biscoitos recheados ou doces, balas, doces, chocolates)	≤ 2 vezes	+1	7 vezes	-1
Refrigerantes (exceto diet)	≤ 2 vezes	+1	7 vezes	-1
<b>COMPORTAMENTO</b>				
Desjejum	7 vezes	+1	≤ 2 vezes	-1
Local das Refeições	7 vezes	+1	≤ 2 vezes	-1
<b>PONTUAÇÃO TOTAL</b>		<b>12</b>		

**Tabela 1:** Escores do Índice de Qualidade da Alimentação conforme variáveis sociodemográficas, comportamentais, antropométricas e atividade arilesterase da PON1 entre crianças de 5 e 8 anos incompletos (N=97), Pelotas-RS.

	ESCORE GERAL <sup>†</sup>			ESCORE ESTRATIFICADO						Valor** <i>p</i>
	N	MÉDIA	DP	Baixo (≤ 1)		Médio (2 a 4)		Alto (≥ 5)		
				N	%	N	%	N	%	
<b>SEXO*</b>										0,292
Feminino	48	3,04	2,79	13	50,00	19	40,50	16	61,50	
Masculino	49	3,1	2,64	13	50,00	26	57,80	10	38,50	
<b>IDADE*</b>										0,713
5 anos	33	2,84	3,04	10	38,50	16	35,60	7	26,90	
6 anos	38	3,44	2,43	8	30,80	17	37,80	13	50,00	
7 anos	26	2,80	2,68	8	30,80	12	26,70	6	23,10	
<b>COR DA PELE*</b>										0,226
Branca	85	3,00	2,78	25	96,20	37	82,20	23	88,50	
Não branca	12	3,58	2,1	1	3,80	8	17,80	3	11,50	
<b>RENDA FAMILIAR*</b>										0,782
≤ 2 salários mínimos	82	3,02	2,54	35	89,70	29	78,40	23	85,20	
> 2 salários mínimos	15	3,33	3,55	4	10,30	8	21,60	4	14,80	
<b>TEMPO FRENTE A TELA*</b>										0,647
≤ 2 horas	40	3,75	2,48	8	36,40	20	47,60	12	48,00	
> 2 horas	49	2,75	2,81	14	63,60	22	52,40	13	52,00	
<b>CIRCUNFERÊNCIA DA CINTURA*</b>										0,608
Adequada	63	2,95	2,89	19	73,10	27	61,40	17	65,40	
Elevada	33	3,27	2,37	7	26,90	17	38,60	9	34,60	
<b>CLASSIFICAÇÃO DO ÍNDICE DE MASSA CORPORAL*</b>										0,822
Eutrofia	53	3,15	2,72	14	53,80	26	57,80	13	50,00	
Excesso de peso	44	2,97	2,71	12	46,20	19	42,20	13	50,00	
<b>PARAOXONASE-1 ATIVIDADE ARILESTERASE*</b>										0,645
< 90 UL	50	3,06	2,95	14	53,80	21	51,50	15	57,70	
≥ 90 UL	47	3,08	2,44	12	46,20	24	53,30	11	42,30	

<sup>†</sup>média (min;máx)= 3,20 (-5; 9,0) <sup>\*\*</sup>teste de Qui quadrado de *Pearson*. \* teste t de *Student* ou ANOVA.

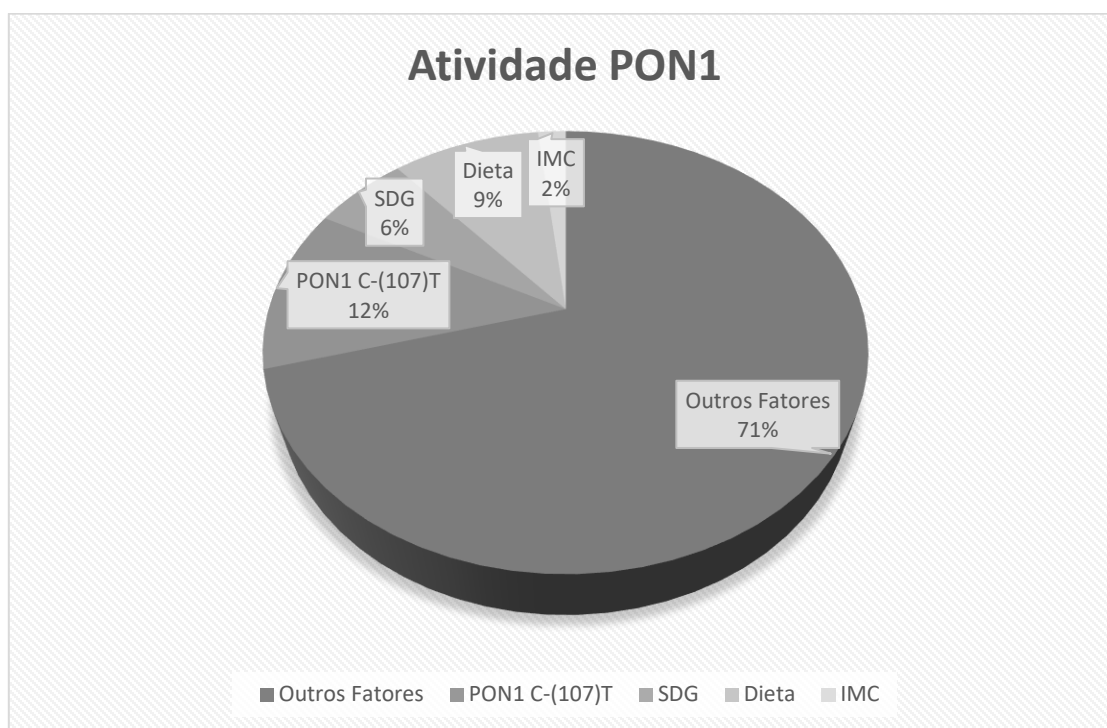


**Figura 1:** Distribuição do polimorfismo genético C(-107)T **(A)**, influência do genótipo **(B)**, do Índice de Qualidade da Alimentação-IQA **(C)** e do genótipo de acordo com o IQA **(D)**, sobre a atividade arilesterase da Paraoxonase 1, em crianças entre 5 e 8 anos incompletos (N=97), Pelotas-RS.

**Tabela 2:** Análise bruta e ajustada da associação entre atividade arilesterase da PON1 e o polimorfismo PON1 C(-107)T em crianças entre 5 e 8 anos incompletos (N=97), Pelotas-RS.

	<b>B (EP)</b>	<b>β</b>	<b>p</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>R<sup>2</sup> ajustado</b>	<b>PON1- VE</b>
<b>Análise bruta</b>						
TT	82,95 (6,53)	REF				REF
CT	3,41 (7,41)	0,06	0,003	11,90	10,00	86,36
CC	22,27 (7,99)	0,39				105,22
<b>Análise ajustada</b>						
Modelo 1 <sup>a</sup>						
TT	77,37 (16,28)	REF				REF
CT	6,59 (7,54)	0,12	0,011	18,00	11,60	83,96
CC	27,75 (8,23)	0,48				105,12
Modelo 2 <sup>b</sup>						
TT	71,19 (18,87)	REF				REF
CT	10,25 (7,89)	0,19	0,011	25,40	14,80	81,44
CC	30,32 (8,27)	0,53				101,51
Modelo 3 <sup>c</sup>						
TT	69,31 (19,88)	REF				REF
CT	10,71 (8,17)	0,20	0,048	27,50	11,90	80,02
CC	31,41 (8,64)	0,55				100,72
Modelo 4 <sup>d</sup>						
TT	68,76 (19,77)	REF				REF
CT	7,73 (8,40)	0,15	0,041	29,30	13,00	76,49
CC	29,71 (8,68)	0,52				98,47

B=coeficiente de regressão; EP=erro padrão; PON1 VE= valor estimado da Paraoxonase;  $\beta$ =coeficiente  $\beta$ ;  $R^2$ :coeficiente de determinação; <sup>a</sup>ajustado para escolaridade materna, renda, número de pessoas no domicílio e cor; <sup>b</sup>ajustado para o Modelo 1+ frequência do consumo alimentar de frutas, legumes, verduras, laticínios e feijões; <sup>c</sup>ajustado para o Modelo 2 + frequência do consumo alimentar de frituras, embutidos, salgadinhos, biscoitos doces e refrigerantes; <sup>d</sup>ajustado para o Modelo 3+ escore z do IMC.



**Figura 2:** Porcentagem de variabilidade da atividade arilesterase da PON1 explicada pelo polimorfismo PON1 C(-107)T, fatores sociodemográficos e nutricionais em crianças entre 5 e 8 anos incompletos (N=97), Pelotas-RS.



## Apêndices



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

**Paraoxonase-1: análise da influência da qualidade da dieta,  
fatores genéticos e bioquímicos em crianças**

Pesquisador responsável: Tainá Sigales

**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 e no Centro de Especialidades da cidade de Pelotas, no período 2017, 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), que está relacionada a doenças do coração, e sua associação a polimorfismos genéticos, fatores bioquímicos (valores de gorduras no sangue) e nutricionais (peso, altura e alimentação) 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**

Tainá da Silva Sigales  
(53) [981351837](tel:51351837) -----  
[/tainasigales@gmail.com](mailto:tainasigales@gmail.com) -----  
PPG Nutrição e Alimentos -----  
UFPEL - Rua Gomes Carneiro, nº 1 -----

**Orientador**

Sandra Costa Valle  
(53) 9 91463063  
[sandracostavalle@gmail.com](mailto: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: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

## APENDICE B – QUESTIONÁRIO

	<b>UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS</b> <b>FACULDADE DE NUTRIÇÃO</b> <b>Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos</b>
<p><i>Oi, Bom dia/tarde! Apresentar-se: meu nome é &lt;...&gt;. Eu sou aluno (a) da Faculdade de Nutrição. Qual seu nome? E qual o nome &lt;da criança&gt;? Posso conversar com vocês agora? (se sim, prosseguir).</i></p> <p><i>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>	
<b>Data da entrevista:</b> ____/____/____ <b>Horário de início da entrevista:</b> ____:____ <b>Entrevistador (a):</b> _____	DATA    /    / ____
<b>AS PRÓXIMAS 2 PERGUNTAS DEVEM SER APENAS OBSERVADAS</b> <b>Sexo da criança:</b> (1) Masculino    (2) Feminino	SEX ____ COR ____
<b>Número do prontuário:</b> _____	PRONT ____
<b>AGORA VOU FAZER ALGUMAS PERGUNTAS SOBRE SEU (SUA) FILHO (A) E FAMÍLIA</b> <b>Nome da criança:</b> _____ <b>Data de nascimento da criança:</b> _____ <b>Idade:</b> ____ (anos completos) <b>Nome do responsável:</b> _____ <b>Endereço:</b> _____	DNASC ____/____/____ IDAD ____
<b>Qual foi o peso do (a) &lt;criança&gt; ao nascer?</b>	PNASC ____
<b>O senhor (a) mora com o(a) &lt;criança&gt;:</b> (1 ) SIM (2 ) NÃO	MORA ____
<b>Qual o seu grau de parentesco:</b> ____ (1) Mãe/Pai/Responsável (2) Avó (3) Tia (4) Irmã(o) (5) Outro <b>Quantas pessoas moram</b>	GP ____ NPES ____
<b>Entre as pessoas que moram na sua residência, quantas trabalharam no último mês? (0)</b>	TRAB ____
<b>Qual a faixa de renda mensal da sua família?</b> ____ (8888) NSA (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 ____  RENDA ____

<b>Qual a escolaridade da mãe? (anos completos)</b> Analfabeto Ensino fundamental (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) Ensino médio (1) (2) (3) Ensino superior (1) (2) (3) (4)	ANALF____ ENSFUN____ ENSMED____ SUPER____
<b>O (a) &lt;criança&gt; participa das aulas de educação física na escola?</b> (1) SIM (2) NÃO	EFESC
<b>Se sim, quantas vezes na semana a (o) &lt;criança&gt; participa destas aulas?</b> vezes/semana (8) NSA	EFESCFQ
<b>Quanto tempo durante o dia o (a) &lt;criança&gt; permanece em frente à:</b> TV/videogame/computador: horas	TVCO
<b>ESSE DADO DEVE SER COLETADO DO PRONTUÁRIO</b> Motivo pelo qual a criança foi encaminhada ao ambulatório:	
<b>AGORA VAMOS FALAR SOBRE A SAÚDE DO (A) &lt;CRIANÇA&gt;</b> <b>Já foi dito por algum médico que &lt;a criança&gt; tem alguma doença?</b> (1)Sim (2)Não <b>Se sim:</b> (1)Diabetes mellitus (2)Hipertensão arterial (3)Infec. Respiratória (4)Colesterol/Triglicerídeos aumentados (5)Outra:	DOENTE ____
<b>A criança faz uso de medicação contínua:</b> (1)Não (2)Sim Qual:	MEDICA____
<b>A criança fez uso de alguma medicação nos últimos 90 dias?</b> (1)Não (2)Sim Qual:	MED90 ____
<b>Na casa da criança existem pessoas que fumam próximo a ela?</b> (1)Não (2)Sim Quem:	FUMO ____
<b>Há alguém na família com alguma destas doenças ou já teve?</b>  (1) Diabetes Mellitus (açúcar no sangue) (06) Hepatopatia (2) Hipertensão Arterial (pressão alta) (07) Doenças Coração (3) Excesso de peso (08) Osteoporose (4) Cálculo renal (09) Câncer (5) Dislipidemia (gordura no sangue) (88) NSA	HFDM____ HFHAS____ HFOBES____ HFCAL____ HFOST____ HFHEP____ HFCOR____ HFDIS____ HDCA____

HÁBITO ALIMENTAR:	
<b>AGORA GOSTARIA DE FALAR COM VOCÊS SOBRE A ALIMENTAÇÃO DO (A) &lt;CRIANÇA&gt;</b> <b>Quais destas refeições ele (a) costuma fazer no dia?</b> Desjejum (1) sim (2) não Lanche da manhã (1) sim (2) não Almoço (1) sim (2) não Lanche da tarde (1) sim (2) não Jantar (1) sim (2) não Ceia (1) sim (2) não	DESJ____ LMANHA____ ALMOCO____ LTARDE____ JANTAR____ CEIA____

<b>Onde o (a) &lt;criança&gt; costuma fazer a maioria das refeições?</b> (1) À mesa em casa (2) Em frente a TV/Computador/ Videogame (3) Na casa de parentes (5) Na escola (6) Restaurante (7) Outros lugares:	ONDREF ____
--	-------------

MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS:	
<b>Peso atual:</b> ____ Kg <b>Altura:</b> ____ cm <b>Circunferência da cintura:</b> ____ cm <b>IMC:</b> ____ kg/m <sup>2</sup>	PESO ____ ALTU ____ CC ____ IMC ____

CONDIÇÕES CLÍNICAS:	
<b>Colesterol total:</b> ____ mg/dl <b>HDL:</b> ____ mg/dl <b>LDL:</b> ____ mg/dl <b>Triglicerídeos:</b> ____ mg/dl <b>Atividade ARE da PON1:</b> ____ <b>Polimorfismo genético:</b> (1)CC (2)CT (3)TT	COLT CHDL CLDL TRIGL PON GENE



## APENDICE C – ENCAMINHAMENTO



Universidade Federal de Pelotas Faculdade de  
Nutrição

Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos

**“Paraoxonase 1: análise da influência da qualidade da dieta, fatores genéticos  
e bioquímicos em crianças.”**

Pesquisadores responsáveis: Prof. Dr. Sandra Costa Valle e Acadêmica Tainá da Silva  
Sigales

Nome do paciente:

Responsável:

### SOLICITAÇÃO DE EXAMES

– Triglicerídeos

– Glicose

• **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 7:00 às 11:30h.

**Comparecer ao Laboratório Novara, no dia \_\_\_\_ de \_\_\_\_/2018, com o  
documento de identificação da criança e esta requisição.**

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

**Contato do pesquisador:**

Tainá da Silva Sigales

tainasigales@gmail.com

(53) 98452738

## APENDICE D – ORIENTAÇÕES



Universidade Federal de Pelotas

Faculdade de Nutrição

Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos



**“Paraoxonase-1: análise da influência da qualidade da dieta, fatores genéticos e bioquímicos 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.
- Os consumos 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/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!


Tainá da Silva Sigales

Nutricionista - CRN2 8841P

Mestranda PPG Nutrição e Alimentos – UFPEL

## **Anexos**

## ANEXO A – QUESTIONÁRIO DE CONSUMO ALIMENTAR - SISVAN

	<b>Ministério da Saúde/ SAS/ DAB/ CGAN</b>	
	<b>SISTEMA DE VIGILÂNCIA ALIMENTAR E NUTRICIONAL</b>	
	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 nos últimos sete dias	1 dia nos últimos sete dias	2 dias nos últimos sete dias	3 dias nos últimos sete dias	4 dias nos últimos sete dias	5 dias nos últimos sete dias	6 dias nos últimos sete dias	Todos os 7 últimos 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)								



Nos últimos 7 dias, em quantos dias você comeu os seguintes alimentos ou bebidas?								
ALIMENTO/ BEBIDA	Não comi nos últimos sete dias	1 dia nos últimos sete dias	2 dias nos últimos sete dias	3 dias nos últimos sete dias	4 dias nos últimos sete dias	5 dias nos últimos sete dias	6 dias nos últimos sete dias	Todos os 7 últimos dias
Salada crua								
Legumes e verduras								
Frutas in natura								
Salada de frutas								
Feijão								
Leite								
Iogurte								
Batata frita								
Batata de pacote								
Salgados fritos								
Hambúrguer								
Embutidos								
Bolachas salgadas								
Salgadinhos de pacote								
Bolachas doces								
Bolacha recheada								
Doces, balas e chocolate								
10. Refrigerante (não considerar os diet ou light)								

