UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PUERICULTURA E PEDIATRIA

TAMIRIS TREVISAN DE BARROS

**Ingestão alimentar, perfil vitamínico e dano de DNA em crianças e
adolescentes do município de Ribeirão Preto**

Ribeirão Preto
2017

TAMIRIS TREVISAN DE BARROS

**Ingestão alimentar, perfil vitamínico e dano de DNA em crianças e
adolescentes do município de Ribeirão Preto**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Saúde da Criança e do Adolescente

Área de Concentração: Nutrição

Orientadora: Profa. Dra. Jacqueline Pontes Monteiro

Ribeirão Preto
2017

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

Ficha Catalográfica

Barros, Tamiris Trevisan de

Ingestão alimentar, perfil vitamínico e dano de DNA em crianças e adolescentes do município de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto, 2017.
90 p. : il.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Nutrição.
Orientador: Monteiro, Jacqueline Pontes

1. Dano de DNA. 2. Comet Assay. 3. Ingestão alimentar. 4. Retinol. 5. Betacaroteno. 6. Riboflavina.

Nome: Tamiris Trevisan de Barros

Título: Ingestão alimentar, perfil vitamínico e dano de DNA em crianças e adolescentes do município de Ribeirão Preto

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Saúde da Criança e do Adolescente

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Dedicatória

Aos meus pais, com carinho, admiração e gratidão pelo suporte provido para a minha formação profissional, à minha orientadora, pelo apoio concedido, e a todos os excelentes profissionais que realizaram um surpreendente trabalho em equipe tornando possível a elaboração desta dissertação.

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, Niceia e Antônio, por toda a dedicação a mim conferida ao longo de minha vida, e pelo suporte emocional e financeiro.

À minha querida orientadora, Profa. Dra. Jacqueline Pontes Monteiro, pela confiança em mim depositada e por toda paciência, atenção e suporte que me ofereceu antes e durante o período de elaboração deste trabalho e por acreditar no meu potencial mesmo em momentos de insegurança.

Às minhas colegas, Roberta, Mariana, Carolina, Roseli, Elaine, Maria Olímpia e Joyce, pelo trabalho em equipe, amizade e companheirismo em situações adversas.

Ao Prof. Dr. Jim Kaput, pela confiança e por todo apoio concedido durante a realização deste projeto.

À Profa. Dra. Lusania Maria Gregg Antunes pelo suporte científico e técnico concedido, cedendo espaço no laboratório da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, e aos pós-graduandos Vinícius Venâncio e Lívia Hernandez, que trabalharam arduamente, tornando possível a elaboração deste trabalho.

A todos os profissionais que participaram no processo de coleta de dados, pela dedicação e trabalho em equipe.

Ao *Nestlé Institute of Health Sciences* e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro concedido.

À secretária do programa de pós-graduação do Departamento de Puericultura e Pediatria, Vera Lúcia de Andrade, pelos serviços prestados e pela prontidão em esclarecer dúvidas, com muita atenção e paciência.

Ao meu namorado, Rafael Xavier, que me acompanhou nessa jornada, sempre paciente e disposto a ajudar.

Aos meus amigos pelo apoio emocional e aos que gentilmente cederam sua opinião quando solicitei, em especial Priscila Nogueira Bezan, Rafael Pessoa e Héric Holland.

Resumo

BARROS, T. T. **Ingestão alimentar, perfil vitamínico e dano de DNA em crianças e adolescentes do município de Ribeirão Preto**. 2017, 90f. Dissertação (Mestrado em Saúde da Criança e do Adolescente) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

O objetivo deste estudo é descrever o dano de DNA através das variáveis *Tail Moment* e *Tail Intensity* e investigar a associação entre o dano do DNA, padrão alimentar e concentrações plasmáticas de vitaminas em crianças e adolescentes em Ribeirão Preto (São Paulo, Brasil). Estudantes de 9 a 13 anos foram selecionados de três escolas de Ribeirão Preto (São Paulo, Brasil), totalizando uma amostra de 120 indivíduos. A coleta de dados incluiu antropometria, composição corporal, avaliação da ingestão utilizando um questionário de frequência alimentar (QFA) e o Índice de Qualidade da Dieta Revisado (IQD-R) e coleta de sangue para a dosagem de vitaminas e determinação do dano do DNA pelo método de eletroforese em gel de célula única – *comet assay*. Os indivíduos foram divididos em dois grupos opostos de dano do DNA usando duas técnicas distintas: análise de k-cluster e classificação por escala de dano. Padrões de ingestão de nutrientes também foram gerados, utilizando *robust sparse k-means cluster*, e associados com o dano de DNA. Para análise utilizaram-se os testes T de Student, Mann-Whitney e ANCOVA. Na primeira análise, o cluster 1 (n = 73), com menor dano de DNA, apresentou maior consumo de vegetais verdes escuros e alaranjados (p = 0,047), vegetais totais (p = 0,041) e carnes, ovos e leguminosas (p = 0,022), através do IQD-R, e um escore de IQD total maior (p = 0,030), indicando melhor qualidade de dieta em comparação ao cluster 2 (n = 47), de maior dano de DNA. O cluster 2 apresentou maior consumo de laticínios, em comparação ao cluster 1 (p = 0,008). Em relação a vitaminas plasmáticas, o cluster 1 apresentou maior concentração de riboflavina (p = 0,004). No segundo método de divisão, o grupo 1 (n = 108), com menor dano de DNA, apresentou maior concentração de retinol (p = 0,010), beta-caroteno (p = 0,017) e riboflavina (p = 0,046), após teste de ANCOVA ajustado para o índice de massa corporal (IMC) em comparação ao grupo 2 (n = 12). Na divisão por padrão alimentar, o cluster 2 (n = 58), com menor consumo de aminoácidos e micronutrientes, apresentou maior consumo de energia (p = 0,001) e uma tendência de maior dano do DNA (p = 0,063) em relação ao cluster 1 (n = 27), com maior ingestão de nutrientes. Estes achados corroboram a literatura, afirmando o papel protetor de vitaminas e antioxidantes contra o dano do DNA.

Palavras-chave: dano de DNA, *comet assay*, ingestão alimentar, retinol, betacaroteno, riboflavina.

Abstract

BARROS, T. T. **Food intake, vitamin status and DNA damage in children and adolescents from Ribeirão Preto**, São Paulo, Brazil. 2017, 90f. Dissertation (Master in Health of Children Children and Adolescents) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

The aim of this study is to describe the DNA damage using values of Tail Moment and Tail Intensity and investigate the association between DNA damage, dietary pattern and vitamin status in children and adolescents in Ribeirão Preto (São Paulo, Brazil). 9 to 13 year old students were selected from three schools in the city of Ribeirão Preto (São Paulo, Brazil), totalizing a sample of 120 subjects. Data collection included anthropometry, body composition, assessment of food intake using a food frequency questionnaire (FFQ), quality of diet through Revised Health Eating Index (HEI-R), and blood sampling for vitamins dosage and determination of DNA damage with single cell gel electrophoresis - comet assay. The subjects were divided into two opposing groups according to DNA damage using two different methods: k-cluster analysis and classification by scale of damage. Nutrients intake patterns were also generated through *robust sparse k-means cluster* and associated with DNA damage. The statistical analysis were performed using Student's T test, Mann-Whitney test and ANCOVA. In the first analysis, cluster 1 (n = 73), with less DNA damage presented higher intake of dark green and orange vegetables (p = 0,047), total vegetables (p = 0,041), meat, eggs and legumes (p = 0,022), assessed through HEI, as well as a higher total HEI-R level (p = 0,030), indicating higher quality of diet compared to cluster 2 (n = 47), with increased DNA damage. Cluster 2 presented a higher intake of milk and dairy products, compared to cluster 1 (p = 0,008). In relation to vitamins plasma levels, cluster 1 presented higher levels of riboflavin (p = 0,004). In the second method of division, group 1 (n = 108), with less DNA damage, presented higher levels of retinol (p = 0,010), beta-carotene (p = 0,017) and riboflavin (p = 0,046), after ANCOVA teste adjusted for body mass index (BMI) compared to group 2 (n = 12). In the division by dietary pattern, cluster 2 (n = 58) with a lower consumption of amino acids and micronutrients had higher energy intake (p = 0,001) and a tendency of higher DNA damage (p = 0,063) compared to cluster 1 (n = 27), with higher intake of nutrients. These findings corroborate the literature, asserting protective role of vitamins and antioxidants against DNA damage.

Keywords: DNA damage, comet assay, food intake, retinol, beta-carotene, riboflavin.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS.....	20
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	21
3.1. Seleção dos Participantes	21
3.1.1. Critérios de Inclusão	22
3.1.2. Critérios de Exclusão	22
3.1.3. Indivíduos Estudados	22
3.2. Delineamento do Estudo	23
3.3. Coleta de Dados	23
3.3.1. Procedimentos Clínicos e Testes Laboratoriais	24
3.3.1.2. Dano de DNA: Eletroforese em gel de célula única	25
3.3.2. Antropometria	26
3.3.3. Composição Corporal.....	27
3.3.4. Análise da Ingestão Alimentar Habitual.....	28
3.3.5. Avaliação da Atividade Física	31
3.4.1. Técnica de clusterização para identificação de grupos	33
3.4.2. Agrupamento segundo escala de classificação do dano de DNA	34
4. RESULTADOS.....	35
4.1. Caracterização dos indivíduos excluídos do estudo	35
4.2. Caracterização da população amostral.....	37
4.3. Resultados da clusterização baseada nas variáveis <i>Tail Intensity</i> e <i>Tail Moment</i>	39
4.4. Resultados do agrupamento segundo escala de classificação do dano de DNA:	43
4.5. Resultados baseados no padrão do consumo alimentar determinado pela clusterização <i>Robust Sparse k-means Cluster</i>	48
5. DISCUSSÃO	49
6. CONCLUSÃO	55

REFERÊNCIAS 57

ANEXOS..... 70

1. Introdução

O padrão alimentar do brasileiro tem se caracterizado por um crescente aumento na ingestão de produtos industrializados e redução de alimentos in natura ou preparados em casa. Dados da Pesquisa de Orçamento Familiar (POF) em 2008-2009, comparados à pesquisa de 2002-2003, indicam aumento de 40 % no consumo de refeições prontas e misturas industrializadas em detrimento de preparações como arroz e feijão, que tiveram redução de 6 e 18%, respectivamente. A participação de hortaliças e frutas na alimentação da população brasileira se encontra abaixo das necessidades nutricionais, enquanto é observado aumento em itens com elevado teor de gordura saturada, sacarose e sódio tais como refrigerantes (16%), embutidos (25%) e biscoitos (10%) (IBGE; 2008-2009). Consequentemente, essa mudança no padrão alimentar é também marcada por uma diminuição na ingestão de vitaminas e minerais entre os brasileiros.

Veiga e cols. encontraram um consumo reduzido de micronutrientes entre adolescentes brasileiros. Seu estudo aponta maior prevalência na inadequação do consumo de cálcio, e vitamina E, encontrada em 100% dos indivíduos estudados, fósforo e vitamina A, em dois terços dos indivíduos, e de vitamina C, presente em um terço. Essa é uma realidade preocupante, uma vez que o estirão de crescimento e mudanças corporais características da adolescência determinam necessidades aumentadas de nutrientes (VEIGA, 2013).

Vitaminas e minerais estão distribuídos em diversas funções no organismo humano, atuando como cofatores enzimáticos, mediadores da contração muscular, neurotransmissores, exercendo papel de proteção celular como antioxidantes, entre outras funções regulatórias e estruturais (MAHAM, 2002). Deficiências desses micronutrientes estão relacionadas a disfunções visuais, de renovação tecidual e do sistema imunológico, além de ser fator de risco para o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis como hipertensão arterial e doença cardiovascular, obesidade, diabetes mellitus tipo 2, dislipidemias, síndrome metabólica e câncer (BENEDET, 2013, COMINETTI, 2011).

A propriedade antioxidante destes nutrientes opera de duas formas, protegendo as células da ação prejudicial de radicais livres ao inibir reações de oxidação ou através da mediação das reações de reparação do DNA danificado

(WASSON, 2008; SLYSKOVA, 2014). Agentes pró-oxidantes podem ser endógenos, produtos resultantes de reações próprias do metabolismo celular, ou exógenos, provenientes do contato com substâncias químicas reativas e radiação ionizante ou não, como raios UVA, presentes na luz solar ou raios X, e estão envolvidos principalmente na oxidação de lipídios, proteínas e DNA celular (SLYSKOVA, 2014; WASSON, 2008; COOKE, 2006; O'HAGAN, 2014; KRYSTON, 2011).

Diariamente as células de qualquer organismo vivo são expostas a estes agentes nocivos, porém sabe-se que indivíduos em situações metabólicas alteradas, como diabetes mellitus e hipercolesterolemia, apresentam maior concentração de espécies reativas de oxigênio e menor capacidade antioxidante, com consequente aumento no dano de DNA quando comparados a indivíduos saudáveis (HARANGI, 2002; BELTOWSKI, 2000; DEMIRBAG, 2005; YANG, 1999).

O DNA pode sofrer diferentes tipos de dano, como, por exemplo, oxidação de bases ou ruptura de cadeias, sendo estas as lesões mais comumente encontradas (SLYSKOVA, 2014; WASSON, 2008; COOKE, 2006; O'HAGAN, 2014; KRYSTON, 2011). A reparação do DNA lesionado se dá por meio da remoção das bases ou nucleotídeos que sofreram alteração, ou ocorre a apoptose celular programada, impedindo a multiplicação da célula que sofreu mutação, sendo estas etapas essenciais do ciclo celular para a manutenção da integridade do material genético (EVANS, 2004; SLYSKOVA, 2014).

Caso não haja apoptose celular ou reparação do DNA danificado devido a alguma falha no ciclo celular, o mesmo pode ser replicado, dando origem a novas células com instabilidade genética. Esse mecanismo está associado ao desenvolvimento de tumores malignos, à etiologia da aterosclerose e a doenças neurodegenerativas (EVANS, 2004; DEMIRBAG, 2005; SLYSKOVA, 2014; KRYSTON, 2011).

Diferentes técnicas foram desenvolvidas para a detecção de alterações no DNA, como, por exemplo, a detecção de biomarcadores de dano de DNA através de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), teste do micronúcleo e eletroforese em gel de célula única, também chamado de *comet assay* (KRYSTON, 2011).

Este último, descrito em 1984, por Ostling e Johanson, se trata da análise microscópica de determinado número de nucleoides de uma amostra de fluido ou

tecido corporal submetida previamente ao processo de eletroforese. Nesse processo, fragmentos de DNA são levados a percorrer a lâmina devido a diferença de potencial gerada durante a eletroforese. O método *comet assay* é assim chamado pois, após esse processo, o nucleóide adquire um aspecto que se assemelha ao de um cometa, de forma que quanto maior é o dano, maior é a extensão e a quantidade de fragmentos na porção denominada cauda ou *Tail* (Figura 1).

Figura 1 – Dano oxidativo do DNA por eletroforese em gel de célula única (*comet assay*). A: célula sem dano de DNA; B: célula com dano de DNA severo. (MARTINEZ, 2010)

Esse método tem sido largamente empregado para detecção e quantificação do dano de DNA por ser considerado rápido, simples e econômico, necessita de um número reduzido de células e pode ser adaptado para a detecção de danos específicos (WASSON, 2008).

A relação entre dano de DNA e micronutrientes é objeto de estudo de diversos pesquisadores. Minnet e cols. (2011) suplementaram bebês com deficiência de vitamina B12 e suas mães e analisaram a quebra da cadeia de DNA em leucócitos do sangue periférico, antes e após suplementação da vitamina deficiente, havendo redução nos escores de dano no DNA após a suplementação.

Em relação ao papel da vitamina A no dano de DNA, Collins e cols. (1998) suplementaram indivíduos com alfa e betacaroteno, luteína, licopeno e placebo, e encontraram correlação negativa entre níveis séricos de carotenoides e dano de DNA. Outro estudo analisou o dano de DNA *in vitro* após a radiação gama. Linfócitos humanos tratados com betacaroteno em várias concentrações apresentaram menor dano de DNA em relação às células não tratadas. (KONOPACKA, 2001).

Serpeloni e cols. (2010), verificaram que houve redução no dano de DNA, mensurado por meio dos métodos *comet assay* e teste do micronúcleo, em ratos expostos a cisplatina, após a suplementação de luteína, um carotenoide presente

em hortaliças de cor verde escuro. O estudo de Robichová e cols. (2004), avaliou o dano de DNA *in vitro* após a exposição a N-nitrosomorfolina, substância que possui efeito hepatocarcinogênico. As células hepáticas que foram previamente tratadas com vitamina A apresentaram menor dano de DNA comparadas aquelas que não receberam tratamento.

Hassan e cols. (2012) demonstraram fator protetor da riboflavina contra o dano de DNA causado pela cisplatina em células saudáveis. Em outro estudo, ratos expostos a um carcinógeno tinham maior dano de DNA quando recebendo dieta deficiente em riboflavina (WEBSTER, 1996).

Embora a relação entre micronutrientes e dano de DNA esteja bem esclarecida, não foram encontrados na literatura científica estudos que demonstrem a relação entre o consumo alimentar e/ou estado nutricional e dano de DNA em crianças e adolescentes.

Considerando que este grupo da população vem apresentando uma piora no padrão alimentar com redução na ingestão de vitaminas e minerais, afetando seu estado nutricional, e a relação destes micronutrientes com o dano de DNA, bem como o papel do dano de DNA no desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, evidencia-se a importância e necessidade de um estudo científico que descreva essas variáveis nesta faixa etária.

Dessa forma, elaboramos a hipótese de que crianças e adolescentes entre 9 e 13 anos, residentes no município de Ribeirão Preto, com maior dano de DNA apresentam pior padrão alimentar e menores níveis plasmáticos de retinol, betacaroteno e riboflavina quando comparadas aquelas com menor dano de DNA.

2. Objetivos

- Descrever o dano de DNA de leucócitos em amostras de sangue periférico através do método *comet assay*, analisando os parâmetros *Tail Moment* e *Tail Intensity* e criar dois *clusters* opostos de dano de DNA (grupo com maior dano de DNA, grupo com menor dano de DNA – GRUPO CONTROLE);

- Comparar a ingestão habitual de energia e nutrientes, a qualidade da dieta em grupos opostos de dano de DNA (grupo com maior dano de DNA, grupo com menor dano de DNA – GRUPO CONTROLE);
- Comparar os níveis plasmáticos de vitaminas e minerais em dois grupos opostos de dano de DNA (grupo com maior dano de DNA, grupo com menor dano de DNA – GRUPO CONTROLE).
- Comparar o dano de DNA em dois distintos grupos de padrões alimentares encontrados pela técnica da clusterização;

3. Casuística e métodos

Este é um sub estudo clínico transversal do projeto “Nova Estratégia para Analisar Interação Gene-Nutriente”, aprovado pelo comitê de ética do HCFMRP - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (processo HCRP nº 14255/2010) e aprovado pelo CONEP – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (processo CAAE nº 00969412.6.0000.5440; nº do parecer: 220.625-18/02/2013).

A coleta de sangue, a antropometria e composição corporal, dados da ingestão alimentar e atividade física foram analisados no momento inicial do projeto “ Nova Estratégia para Analisar Interação Gene-Nutriente” em crianças e adolescentes de 9 a 13 anos residentes na cidade de Ribeirão Preto.

3.1. Seleção dos Participantes

O cálculo do tamanho amostral do projeto “Nova Estratégia para Analisar Interação Gene-Nutriente” foi baseado em estudo piloto realizado nos Estados Unidos, no estado de Arkansas, onde também foram selecionados grupos metabólicos para posterior associação com a ingestão alimentar e com concentrações sanguíneas de vitaminas, determinando uma amostra mínima de 100 indivíduos.

Os indivíduos participantes desta pesquisa foram selecionados em três escolas da cidade de Ribeirão Preto (São Paulo, Brasil): Escola Estadual Professor Rafael

Leme Franco, Escola Estadual Professor Walter Ferreira e Escola Particular Viktor Frankl. Estas escolas são localizadas nas proximidades da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP) e seus alunos residem na mesma região em que estão localizadas.

3.1.1. Critérios de Inclusão

Somente crianças e adolescentes de 9 a 13 anos, consideradas clinicamente estáveis após avaliação pediátrica, sem doença crônica que pudesse interferir com a coleta de dados ou com os resultados obtidos foram incluídas. Cada criança e adolescente foi questionado acerca da escolha em participar do estudo, tanto verbalmente como por escrito (ANEXO A).

O objetivo da pesquisa foi explicado aos pais ou responsáveis legais, que deram consentimento informado por escrito para participar (ANEXO B). Apenas participantes e responsáveis legais com respectivos termos de assentimento e consentimento assinados, foram incluídos no estudo.

3.1.2. Critérios de Exclusão

Foram excluídos do estudo crianças e adolescentes que apresentaram três ou mais episódios de fezes líquidas ou semilíquidas nas 24 horas antecedentes à coleta de dados; que estavam fazendo uso de suplementação de vitaminas e/ou minerais; que estavam sob dieta supervisionada para redução de peso, ou que estavam sob qualquer outro tipo de dieta e que tivessem diagnóstico prévio de doença crônica.

3.1.3. Indivíduos Estudados

Inicialmente, 150 crianças e adolescentes atenderam os critérios de inclusão e exclusão e concordaram, por escrito, em participar. Na coleta de dados, compareceram 141 indivíduos. Crianças de todos os estados nutricionais foram incluídas (magras, eutróficas, com sobrepeso e obesas), com o objetivo de não excluir qualquer indivíduo que, por ventura, apresentasse dano de DNA aumentado relacionado ao seu índice de massa corporal.

3.2. Delineamento do Estudo

O delineamento do estudo foi baseado na medida transversal do dano de DNA, do estadiamento puberal e do estado nutricional (ingestão alimentar, antropometria, composição corporal, e perfil bioquímico de vitamina A, betacaroteno e riboflavina) em crianças e adolescentes em três escolas da cidade de Ribeirão Preto, SP.

3.3. Coleta de Dados

A coleta de dados foi realizada no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, Brasil, na sala de Coleta de sangue, local que conta com infraestrutura e segurança adequadas e necessárias aos procedimentos efetuados, além de dispor de amplo espaço para que os participantes e seus acompanhantes pudessem ser acomodados.

Foi disponibilizado transporte para buscar os participantes em suas casas e levá-los de volta ao final da coleta, a fim de evitar atrasos e garantir a participação de todos. A coleta de dados aconteceu em dois dias de um final de semana (sábado e domingo), com o objetivo de melhorar a logística de atendimento, distribuindo metade dos participantes em cada dia.

Durante a coleta de dados, todos os participantes foram submetidos à avaliação clínica por um pediatra para a determinação do estadiamento puberal conforme critérios estabelecidos por Tanner (1962), os quais utilizam 5 escalas de estadiamento para desenvolvimento mamário e pelos pubianos em meninas, e para tamanho testicular e pelos pubianos em meninos; bem como para avaliação dos critérios de inclusão. Para essa avaliação, inicialmente, cada criança com seu acompanhante, escolheram entre as fotos representativas do estadiamento puberal aquela que mais se aproximava da sua atual caracterização. Após conversa com o pediatra, caso houvesse dúvida, era realizada uma análise individual com o sujeito da pesquisa.

Além disso, durante a coleta de dados os participantes foram submetidos a antropometria, à avaliação da composição corporal, à avaliação da ingestão

alimentar e à coleta de sangue para dosagens bioquímicas de vitamina A, betacaroteno e riboflavina e para a determinação do dano de DNA.

3.3.1. Procedimentos Clínicos e Testes Laboratoriais

Foram coletados 24 ml de amostras de sangue de cada indivíduo, após jejum de 12 horas, para dosagem sanguínea de vitaminas e para análise do dano de DNA. A coleta de sangue foi realizada por flebotomistas treinados. Tal procedimento oferece risco mínimo (Categoria 2; 45 CFR 46.110) e é rotineiramente feito no Hospital das Clínicas da FMRP-USP. Após a coleta, as amostras foram imediatamente centrifugadas, separadas e congeladas a -80°C.

Para garantir a correta identificação das amostras, bem como o sigilo sobre os resultados dos exames dos participantes, cada sujeito recebeu um número e um código de barras individual, que foi mantido com os principais investigadores na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brasil. Todas as amostras de sangue foram codificadas no momento em que foram coletadas e encaminhadas para as análises de vitaminas no *Nestlé Institute of Health Sciences* em Lausanne na Suíça e para a análise do dano de DNA, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP. Foi fornecido café da manhã a todos os participantes, imediatamente após a coleta de sangue, a aferição dos dados antropométricos e do exame de impedância bioelétrica.

3.3.1.1. Dosagens Laboratoriais

As dosagens de vitaminas plasmáticas foram realizadas por meio da detecção por cromatografia líquida.

3.3.1.1.1. Dosagens de Retinol e betacaroteno

Para a extração, 200 µL de plasma foram depositados em um tubo já contendo 250 µL de etanol com o padrão interno para as vitaminas analisadas, sendo em seguida agitado em vórtex por 15 segundos, para precipitação de proteínas. Após a adição de 250 µL de butanol : acetato de etila (1:1) e sonicação, as amostras foram

extraídas 2 vezes com 2,5 ml de hexano e um antioxidante, agitando-se novamente em vórtex e depois centrifugando à 2500 x g por 4 minutos. O sobrenadante, correspondente à fase orgânica, foi transferido para um *vial*. O processo de extração com o hexano é repetido novamente, e o sobrenadante combinado ao retirado anteriormente no *vial*. O total extraído foi evaporado em corrente de nitrogênio, sendo depois reconstituído em 100 µL de isooctano.

A detecção foi feita por cromatografia líquida. Foram injetados 5 µL do extrato em uma coluna de sílica Thermo Hypersil GOLD®, com tamanho de partícula de 1,9 µm, dimensões de 200 x 2,1 mm, à 35°C, usando-se gradiente de hexano : dioxano. Os compostos foram detectados por fluorescência, sendo possível detectar cada componente nos respectivos comprimentos de onda, $\lambda_{Ex} = 325$ nm e $\lambda_{Em} = 458$ nm para o retinol e $\lambda_{abs} = 452$ nm para betacaroteno.

3.3.1.1.2. Dosagem de Riboflavina

Para detecção da riboflavina foi realizado o método de cromatografia líquida. Uma quantia de 200 µL de plasma foi adicionada à 20 µL do padrão interno. Em seguida, foram adicionados 800 µL de metanol acidificado e a mistura foi agitada em vórtex por 10 segundos. Após ser deixada em temperatura ambiente por 5 minutos, houve precipitação e as amostras foram filtradas através de uma placa para remoção de proteínas e fosfolípidos. O filtrado foi recolhido e centrifugado a 12000 x g por 15 minutos à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi então transferido para *vials* e evaporado em corrente de nitrogênio. Em seguida, as amostras foram reconstituídas em 500 µL de uma mistura contendo fase móvel A (MP A) (solução de H₂O, 5% de ácido acético e 0,2% de ácido heptafluorobutírico (HFBA)) completada com 1% de ácido ascórbico, sendo 10 µL da amostra analisados através da cromatografia líquida.

A cromatografia líquida foi realizada em uma coluna de fase reversa ACE-3 C18-PFP, 150 x 2,1 mm, 3 µm, à temperatura ambiente, usando sistema de alta performance (UPLC Waters Acquity), sendo mantida vazão constante de 0,2 ml/minuto. A fase móvel B (MP B) foi acetonitrila. A riboflavina foi detectada por espectrometria de massa, operando em ionização positiva.

3.3.1.2. Dano de DNA: Eletroforese em gel de célula única

Para analisar o dano de DNA, utilizou-se o método eletroforese em gel de célula única (*single cell gel electrophoresis assay ou comet assay*), descrito por Singh e cols. (1988) e Tice e cols. (2000) com adaptações.

São colocados 25 µL de sangue periférico colhido em tubo *vacutainer*® EDTA junto à 270 µL de agarose de baixo ponto de fusão 0,5% (p/v). Após a mistura, 80 µL da suspensão celular são depositados em lâminas previamente cobertas com agarose de ponto de fusão normal 1,5% (p/v) e as lâminas mantidas a 4°C por 20 minutos para solidificação da agarose. Em seguida, as lâminas são imersas em solução de lise (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, DMSO 10% (v/v), Triton X-100 1% (v/v), Tris 10mM, pH 10) a 4°C por 24 horas. Passado esse período, as lâminas são submetidas à eletroforese alcalina (NaOH 300 mM, EDTA 1mM, pH>13) por 20 minutos (0,87 V/cm, 300 mA). Ao término da eletroforese, as lâminas são imersas em solução de neutralização (Tris-HCl 0,4M, pH 7.5) por 5 minutos, secas em temperatura ambiente e depois fixadas em etanol absoluto por 2 minutos. Durante a eletroforese, o DNA fragmentado se desloca na superfície da lâmina formando uma cauda ou *tail*. Imediatamente antes da análise, as lâminas são cobertas com 200 µL de solução de GelRED™ (1:1000 v:v) e analisadas em microscópio de fluorescência (aumento de 200 vezes), sendo analisados 100 nucleoides por indivíduo através o software *Comet Assay IV* (Perceptive Instruments, Suffolk, UK), manejado por um profissional treinado.

Para avaliação do dano de DNA, foram utilizadas médias das variáveis *Tail Moment* e *Tail Intensity* de 100 nucleoides de cada indivíduo. A variável *Tail Moment* representa a extensão percorrida pelos fragmentos de DNA danificado, enquanto a variável *Tail Intensity* representa a porcentagem de fragmentos de DNA danificado em relação ao tamanho total do nucleoide.

3.3.2. Antropometria

A estatura e o peso foram aferidos por uma nutricionista treinada logo após a coleta de sangue, de acordo com os procedimentos detalhados por Jelliffe (1968) e Organização Mundial de Saúde (OMS, 1995).

Os participantes foram considerados como tendo magreza grave, se Índice de Massa Corporal (IMC) < Percentil 3; magreza, se Percentil 3 $\leq$ IMC < Percentil 15; peso adequado, se Percentil 15 < IMC < Percentil 85; sobrepeso, se Percentil 85 $\leq$ IMC < Percentil 97 e obesidade se IMC $\geq$ Percentil 97, conforme curvas de IMC para idade, para indivíduos de cinco a 19 anos, da OMS (OMS, 2007).

A medida da circunferência da cintura foi aferida, também após a coleta de sangue, em linha imaginária horizontal localizada no ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca (HEYWARD, 1996). Caso o participante apresentasse um acúmulo de tecido adiposo abdominal que impedisse a localização desta região, a cicatriz umbilical foi considerada como o nível da linha horizontal.

3.3.3. Composição Corporal

A composição corporal dos indivíduos foi analisada utilizando-se aparelho de Impedância Bioelétrica Tetrapolar, da marca *Biodynamics* 450®. Esse aparelho utiliza as equações de Houtkooper e colaboradores (1992) e de Danford, Schoeller & Kushner (1992) em seus cálculos e é capaz de fornecer informações sobre a massa gorda, a massa livre de gordura e a água corporal total do sujeito analisado. Este sistema aplica uma corrente de 500 microampères em uma frequência única de 50 kHz, sendo que, com a configuração tetrapolar, dois eletrodos aplicam a corrente, enquanto os outros dois a recebem. A corrente de 500 microampères aplicada não constitui risco ou desconforto ao indivíduo analisado.

Neste projeto, as seguintes condições foram seguidas para que fosse assegurada a qualidade da aferição: ausência de prática de exercícios pelos participantes nas 12 horas anteriores ao teste; jejum de 12 horas por parte dos voluntários. Além disso, o indivíduo deveria ser mantido em decúbito dorsal durante o exame, com ausência de contato de membros superiores e tronco, e entre os membros inferiores, com os eletrodos posicionados nos dorsos da mão e do pé previamente higienizados com álcool 70% para melhor aderência dos eletrodos, ipsilateralmente, de acordo com técnica de Lukaski (1987).

A porcentagem de gordura corporal foi classificada segundo curvas de referência elaboradas por McCarthy (2006).

3.3.4. Análise da Ingestão Alimentar Habitual

O consumo habitual de alimentos foi mensurado através da aplicação de um questionário de frequência alimentar semiquantitativo (QFA) (FUMAGALLI, 2008 - ANEXO C).

O QFA teve como objetivo investigar a ingestão alimentar dos 30 dias que precediam sua aplicação, informação que pôde ser transformada em consumo alimentar diário. Por meio dele, efetuamos a avaliação da ingestão habitual de energia, macronutrientes, vitaminas e minerais.

O QFA foi aplicado por nutricionistas ou estudantes cursando o último ano do curso de nutrição, os quais receberam treinamento de aproximadamente 60 horas, visando minimizar variações relacionadas ao aplicador. O mesmo foi colhido na presença dos pais/responsáveis legais, para maior veracidade e confiabilidade do relato da ingestão alimentar (LIVINGSTONE, 2000). Além disso, durante o inquérito alimentar foi utilizado um álbum fotográfico (MONTEIRO, 2007) com os alimentos apresentados no questionário, bem como os tamanhos de suas porções, para facilitar a visualização e quantificação do consumo alimentar, aumentando a precisão das informações colhidas.

A digitalização dos dados de ingestão alimentar foi efetuada em duplicata visando minimizar erros. Antes da entrada dos dados, todas as informações foram revisadas para a identificação de possíveis variáveis de confusão na descrição dos alimentos ou preparações consumidas, bem como no tamanho e na quantidade das porções.

Para cálculo e análise da ingestão dietética dos indivíduos estudados, foi usado o Software *DietWin®*, versão *Profissional*, 2011. Este programa contém as informações da tabela Taco e a compilação de dados das principais tabelas nutricionais existentes. Por meio dele é possível adquirir o valor nutricional - macro e micronutrientes - dos alimentos relatados. Os alimentos utilizados na análise do consumo alimentar foram padronizados, levando-se em consideração a tabela que continha mais informações sobre os micronutrientes que os compunham. Dessa forma, priorizou-se o uso das informações fornecidas pelo programa *DietWin* e como segunda opção foram utilizadas as informações fornecidas pela tabela TACO, posto

que esta não traz informações relativas à concentração de alguns micronutrientes, como a vitamina B12, por exemplo.

Para a identificação de sub ou super-relatos da história alimentar, foi estabelecido como critério o intervalo de 0,79 a 2,54 para a razão entre relato da ingestão energética / necessidade energética estimada para peso atual, sendo excluídos os indivíduos que extrapolaram esse intervalo, segundo proposto por Goldberg e cols. (1991) e Black e cols. (1997). A estimativa da necessidade energética dos participantes foi obtida através das equações propostas por Schofield (1985) descritas abaixo:

- 9 a 10 anos:

Sexo masculino: $(22,7 \times \text{peso (kg)}) + 504,3$

Sexo feminino: $(20,3 \times \text{peso (kg)}) + 486$

- 11 a 13 anos:

Sexo masculino: $(17,7 \times \text{peso (kg)}) + 658,2$

Sexo feminino: $(13,4 \times \text{peso (kg)}) + 692,6$

A qualidade da dieta também foi analisada através da ferramenta Índice de Qualidade da Dieta Revisado (IQD-R), proposto por Kennedy (1995) e adaptado por Previdelli e cols. (2011). O IQD-R foi calculado a partir dos dados de consumo obtidos por meio de um Recordatório de 24 horas (R-24h).

Essa ferramenta estima a qualidade da dieta através da atribuição de uma pontuação para o consumo de 12 grupos de alimentos ou nutrientes que caracterizam diferentes aspectos de uma dieta considerada saudável.

Para o cálculo dos 8 componentes baseados no consumo de grupos de alimentos (Cereais Totais, Cereais Integrais, Frutas Totais, Frutas Inteiras, Vegetais Totais e Leguminosas, Vegetais Verdes-Escuros e Alaranjados e Leguminosas (VVAL), Leite e Derivados, Carnes Ovos e Leguminosas), o número de porções

diárias recomendadas de cada componente por 1000 kcal do Valor Energético Total (VET) da dieta foi definido mantendo-se a correspondência com o preconizado no Guia Alimentar para a População Brasileira (BRASIL, 2006). A pontuação máxima (5 ou 10 pontos) foi atribuída para ingestão maior ou igual às porções recomendadas dos componentes e a pontuação mínima (0 pontos) para a ausência de ingestão. Os valores intermediários foram calculados proporcionalmente à quantidade consumida. Uma vez que os componentes Cereais Integrais, Frutas Inteiras e VVAL não possuem recomendações específicas no Guia Alimentar 2006, esses foram calculados proporcionalmente aos componentes Cereais Totais, Frutas Totais e Vegetais Totais e Leguminosas respectivamente.

A pontuação do componente Carnes, Ovos e Leguminosas foi calculada pela soma do valor energético de carnes e ovos com o valor energético de leguminosas até completar a pontuação máxima (190 Kcal = 1 porção = 10 pontos). O excedente foi computado simultaneamente nos grupos Vegetais Totais e Leguminosas e VVAL. Caso o valor energético de carnes e ovos fosse o suficiente para ultrapassar 190 Kcal (1 porção), o valor energético das leguminosas era integralmente computado nos grupos Vegetais Totais e Leguminosas e VVAL (PREVIDELLI, 2011).

Os 2 componentes baseados na ingestão de nutrientes são Gordura Saturada e Sódio. O cálculo do componente Gordura Saturada foi realizado a partir do percentual de contribuição de calorias provenientes de gordura saturada no VET. A pontuação máxima (10 pontos) foi baseada nas Diretrizes sobre Dislipidemia e Prevenção de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia (DEPARTAMENTO DE ATROSCLOOSE DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2007), para um consumo menor ou igual a 7% do VET; a pontuação intermediária (8 pontos) foi conferida ao consumo que representasse 10% do VET, com base nas recomendações da OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2004); e a pontuação mínima (0 pontos) ao consumo maior ou igual a 15% do VET (PREVIDELLI, 2011). Valores intermediários foram calculados proporcionalmente.

A pontuação atribuída ao componente Sódio foi calculada com base na recomendação do *National Academy of Sciences, Institute of Medicine* (IOM, 2004), o qual propõe uma Ingestão Adequada (AI) de 1,5 g de sódio, e com base numa dieta de 2000 kcal proposta pelo Guia Alimentar 2006 (BRASIL, 2006). Dessa forma, a pontuação máxima (10 pontos) foi atribuída ao consumo de 0,75 g ou menos a

cada 1000 Kcal do VET, a pontuação intermediária (8 pontos) para o consumo de 1.0 g/ 1000 Kcal, ingestão máxima estipulada pelo guia alimentar, e a pontuação mínima (0 pontos) para o consumo maior ou igual a 2,0 g por 1000 Kcal do VET, correspondendo ao dobro do valor máximo de consumo estipulado pelo guia alimentar (PREVIDELLI, 2011).

Os componentes baseados no consumo de nutrientes e itens dietéticos incluem os óleos vegetais, oleaginosas e gordura de peixe (Óleos) e as calorias provenientes de gordura sólida, álcool e açúcar de adição (GordAA). O cálculo do componente Óleos e foi realizado com base na porção recomendada do grupo Óleos, Gorduras e Sementes do Guia Alimentar 2006 (BRASIL, 2006). Sendo assim, foi atribuída uma pontuação máxima de 10 pontos para o consumo de 0,5 porções ou mais a cada 1000 Kcal do VET (PREVIDELLI, 2011).

Considerando-se que não há recomendações específicas para a ingestão do componente GordAA no Guia Alimentar 2006, os valores de consumo correspondentes aos percentis 16 e 85 da população avaliada para o desenvolvimento do método foram considerados para o estabelecimento das pontuações mínima e máxima, respectivamente. A pontuação máxima (20 pontos) foi atribuída a um valor $\leq 10\%$ do VET e a pontuação mínima (zero pontos) para um valor $\geq 35\%$ do VET (PREVIDELLI, 2011). Valores intermediários foram calculados proporcionalmente.

A pontuação total do IQD-R foi obtida pela soma de todos os componentes, de forma que quanto maior é a pontuação, melhor é a qualidade da dieta (PREVIDELLI, 2011).

3.3.5. Avaliação da Atividade Física

O nível de atividade física dos participantes foi avaliado para correção dos dados, uma vez que se trata de uma variável de confusão na interpretação do dano de DNA.

A avaliação da atividade física dos participantes deste estudo foi realizada em 3 dias letivos por meio do uso do aparelho *Bodybugg*, da Apex Fitness®. Essa ferramenta consiste em um bracelete que estima o gasto energético total, o gasto

energético durante a atividade física, o tempo de atividade física, bem como a intensidade desta, através do cálculo do equivalente metabólico (MET) e realiza ainda a contagem de passos dados pelo indivíduo (Figura: ANEXO D).

Entende-se por MET o valor correspondente à energia despendida por um sujeito em repouso. O valor de 1 MET corresponde a $3,5 \text{ ml O}_2 \times \text{kg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ e representa uma referência para a classificação da intensidade das atividades. Os valores do dispêndio energético são expressos em múltiplos de METs. Assim, se uma atividade requer 2 METs, esta necessita o dobro da energia que é despendida pelo sujeito em repouso (AINSWORTH, 1993; BOUCHARD, 1993).

O *Bodybugg* é um monitor de gasto energético que utiliza a associação de informações de peso, altura, gênero e idade com o processo chamado "multi-sensor". Este processo envolve a coleta de uma série de dados usando vários sensores fisiológicos (acelerômetro, sensor de fluxo de calor, sensor de resposta galvânica da pele/condutividade e sensor de temperatura) ao invés de um único sensor, que é o que os outros dispositivos de contagem calórica realizam, como os pedômetros e monitores de frequência cardíaca. É esta abordagem multi-sensor que permite ao *Bodybugg* visualizar se o usuário está sentado, dormindo ou correndo. Isso torna o dispositivo confiável e adequado para estimar o gasto energético ao longo do dia.

Foram escolhidos dois dias letivos em que não havia aula de educação física e um dia letivo com essa disciplina para que os alunos participantes utilizassem o aparelho. Explicações referentes ao uso correto do *Bodybugg* foram fornecidas aos professores e aos alunos. O aparelho foi fixado no braço do participante no início da aula e retirado ao final de cada dia escolar pela pesquisadora, sendo o tempo de uso e os cuidados para o bom funcionamento do aparelho monitorados pela mesma.

Para a classificação dos níveis de atividade física, foi adotado o critério descrito por Pate e cols. (2004), que os define da seguinte maneira: sedentário: $\leq 1,4$ MET; atividade física leve: 1,5 a 2,9 METs; atividade física moderada: 3,0 a 5,9 METs; atividade física vigorosa: $\geq 6,0$ METs.

3.4. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizados através do programa SPSS versão 20.0 e *R package*® versão 3.1.3. Para verificar a distribuição normal das variáveis estudadas, foram usados índices de assimetria e curtose.

As variáveis que apresentam distribuição normal foram analisadas através do teste estatístico T de *Student*, e para variáveis com distribuição não normal foi realizado o teste não paramétrico de *Mann-Whitney*. A análise de covariância (ANCOVA) foi utilizada para comparar grupos e neutralizar o efeito de variáveis de confusão. O teste qui-quadrado foi utilizado para a comparação de proporções entre os grupos.

Foram realizados os testes Kruskal-Wallis e análise de variância (ANOVA) para verificar a diferença no dano de DNA em relação à classificação do estadiamento puberal.

3.4.1. Técnica de clusterização para identificação de grupos

Para atender ao objetivo de identificar a existência de diferentes grupos de danos de DNA formados pelos indivíduos estudados, foi utilizado o teste estatístico *cluster de k-means*, técnica comum na análise de dados estatísticos, usada em muitos campos de pesquisa, como a bioinformática. A análise de *cluster* foi originada em 1932 na antropologia, pelos pesquisadores Driver e Kroeber, e desde então noções populares do significado de “*cluster*” incluem a informação de que os grupos formados por meio dessa técnica apresentam pequenos intervalos entre os resultados obtidos por seus membros (BAILEY, 1994).

O teste *cluster de k-means* consiste na tarefa de agrupar um conjunto de indivíduos de tal forma que os sujeitos colocados no mesmo grupo (chamado de *cluster*) são mais semelhantes (em um ou mais sentidos) entre si se comparados a indivíduos de outros grupos. Basicamente, a análise de *cluster* procura agrupar uma amostra de objetos em classes homogêneas, com base na similaridade de suas variáveis (BAILEY, 1994; ESTIVILL-CASTRO, 2002).

O objetivo deste método é minimizar a variância *intra-cluster*. Esta minimização é realizada através de um procedimento em que as observações são colocadas em

grupos de tal forma que a distância entre cada observação e o vetor significativo do seu conjunto (“k”) é tão pequena quanto possível (STEINLEY, 2003, 2006A, 2006B).

O teste de *k-means* foi realizado de duas formas, baseado nos valores de *Tail Intensity* e *Tail Moment*, e baseado no padrão alimentar. Para esse último, o teste *Robust Sparse k-means Cluster* foi utilizado para minimizar ruídos e retirar *outliers*, aprimorando o teste estatístico (KONDO, 2012)

3.4.2. Agrupamento segundo escala de classificação do dano de DNA

Os indivíduos da amostra também foram separados segundo escala de classificação do dano de DNA proposta por Wollowski e cols. (1999). Essa classificação distribui diferentes níveis de dano de DNA em 5 classes considerando para isso valores de *Tail Intensity*. Giovannelli e cols. (2002), utilizando os critérios de Wollowski e cols. (1999), analisaram o dano de DNA presente em regiões isquêmicas de cérebro de ratos e observaram que nas regiões sem isquemia havia apenas classes I e II de dano de DNA. As classes III, IV e V estavam presentes somente na parte isquêmica (Figura 2).

Figura 2 – Nível de dano no DNA aumenta da classe I para a V, de acordo com a migração da cauda: classe I: 0–6%; classe II: 6.1–17%; classe III: 17.1–35%; classe IV: 35.1–60%; classe V: 60.1–100%.

Fonte: (Giovannelli e cols., 2002, de acordo com Wollowski e cols., 1999).

Com base nesses resultados, a população do presente estudo foi dividida em dois grupos: grupo 1 com indivíduos que apresentassem valores médios de *Tail Intensity* dentro do intervalo 0 a 17% (classes I e II), e grupo 2, dentro do intervalo 17,1% a 100% (classes III, IV e V).

4. Resultados

Após a exclusão dos indivíduos que apresentaram sub ou super-relato da história alimentar, o número amostral foi reduzido para 121 participantes. Um participante foi excluído da análise por não apresentar resultado de DNA, totalizando 120 indivíduos estudados.

4.1. Caracterização dos indivíduos excluídos do estudo

Dentre os 21 indivíduos excluídos do estudo, 7 são do sexo masculino (33,3%) e 14 são do sexo feminino (66,7%). O grupo possui uma idade média de 11,33 anos $\pm$ 1,15, e um MET de $2,39 \pm 0,60$, caracterizando nível de atividade física leve. Em relação ao dano de DNA, apresentam valor médio de *Tail Intensity* de $10,14\% \pm 4,41$, e de *Tail Moment* de $4,60 \pm 2,04$.

Nas tabelas abaixo estão caracterizados o estadiamento puberal, estado nutricional e composição corporal dos indivíduos excluídos.

Tabela 1 – Estadiamento puberal dos indivíduos excluídos do estudo segundo classificação de Tanner (1962)

Estágios do desenvolvimento puberal	Frequência (n)	Frequência (%)
Estágio 1	2,0	9,5
Estágio 2	10,0	47,6
Estágio 3	8,0	38,1
Estágio 4	1,0	4,8
Estágio 5	0,0	0,0

Tabela 2 – Estado nutricional dos indivíduos excluídos do estudo segundo IMC/idade

Classificação de IMC/idade*		Frequência (n / %)
< percentil 3	Magreza grave	2 (9,5%)
Entre percentil 3 e percentil 15	Magreza	0 (0,0%)
Entre percentil 15 e percentil 85	Peso adequado	7 (33,3%)
Entre percentil 85 e percentil 97	Sobrepeso	6 (28,6%)
> percentil 97	Obesidade	6 (28,6%)

*Classificação do índice de massa corporal por idade segundo curvas de crescimento da OMS (2007) de 5 a 19 anos.

Tabela 3 – Classificação da composição corporal dos indivíduos excluídos do estudo, segundo porcentagem de gordura corporal

Classificação de Porcentagem de gordura corporal/idade*		Frequência (n / %)
< percentil 2	Redução de Gordura Corporal	0 (0,0%)
Entre percentil 2 e percentil 85	Normalidade	8 (38,1%)
Entre percentil 85 e percentil 95	Excesso de Gordura Corporal	7 (33,3%)
> percentil 95	Obesidade	6 (28,6%)

*Classificação da porcentagem de gordura corporal por idade segundo classificação de McCarthy (2006). < p2: redução de gordura corporal; entre percentil 2 e 85: normalidade; entre percentil 85 e 95: excesso de gordura corporal; > p95: obesidade.

As tabelas 2 e 3 mostram que mais da metade dos 21 indivíduos excluídos apresentam excesso de peso e elevada porcentagem de gordura corporal. Estes indivíduos não diferem significativamente dos indivíduos incluídos na população do estudo em relação à idade, sexo, estadiamento puberal, IMC, composição corporal e nível de atividade física. Também não apresentam diferença em relação às variáveis *Tail Intensity* e *Tail Moment* de dano de DNA (ANEXO E).

4.2. Caracterização da população amostral

A população do estudo possui idade média de 11,41 anos $\pm$ 1,09, e é composta por 54 indivíduos do sexo masculino (45%) e 66 do sexo feminino (55%).

A caracterização da amostra em relação ao estadiamento puberal está descrita abaixo na tabela 4, segundo critério estabelecido por Tanner (1962).

Tabela 4 – Estadiamento puberal da população do estudo segundo classificação de Tanner (1962)

Estágios do desenvolvimento puberal	Frequência (n)	Frequência (%)
Estágio 1	12	10,0
Estágio 2	51	42,5
Estágio 3	40	33,3
Estágio 4	13	10,8
Estágio 5	4	3,3

A tabela 5 descreve o estado nutricional da população do estudo segundo classificação da OMS (2007) para o parâmetro IMC/idade. É possível observar que a maior parte da população se concentra acima do percentil 85, com 46,7% dos participantes com sobrepeso ou obesidade, 42,5% são eutróficos, 7,5% se encontram entre os percentis 3 e 15, indicando magreza, e apenas 3,3% abaixo do percentil 3, caracterizando magreza grave.

Tabela 5 – Estado nutricional da população do estudo segundo IMC/idade

Classificação de IMC/idade*	Frequência (n / %)	
< percentil 3	Magreza grave	4 (3,3%)
Entre percentil 3 e percentil 15	Magreza	9 (7,5%)
Entre percentil 15 e percentil 85	Peso adequado	51 (42,5%)
Entre percentil 85 e percentil 97	Sobrepeso	27 (22,5%)
> percentil 97	Obesidade	29 (24,2%)

*Classificação do índice de massa corporal por idade segundo curvas de crescimento da OMS (2007) de 5 a 19 anos.

A Tabela 6 abaixo estratifica a população amostral segundo classificação da composição corporal da população do estudo, considerando critério estabelecido por McCarthy (2006).

Tabela 6 – Classificação da composição corporal da população do estudo, segundo porcentagem de gordura corporal

Classificação de Porcentagem de gordura corporal/idade*		Frequência (n / %)
< percentil 2	Redução de Gordura Corporal	7 (5,8%)
Entre percentil 2 e percentil 85	Normalidade	61 (50,8%)
Entre percentil 85 e percentil 95	Excesso de Gordura Corporal	26 (21,6%)
> percentil 95	Obesidade	26 (21,6%)

*Classificação da porcentagem de gordura corporal por idade segundo classificação de McCarthy (2006). < p2: redução de gordura corporal; entre percentil 2 e 85: normalidade; entre percentil 85 e 95: excesso de gordura corporal; > p95: obesidade.

Em relação à prática de atividade física, o equivalente metabólico (MET) médio da população foi de 2,42 com um desvio padrão de 0,53, caracterizando atividade física leve.

A média do *Tail Intensity* do total da população estudada foi de 10,32%, com um desvio padrão de 4,35%. O *Tail Intensity* foi de 10,39% $\pm$ 4,44 para sexo masculino (n = 54) e 10,26% $\pm$ 4,85 para sexo feminino (n = 66), não havendo diferença estatística entre os gêneros (p = 0,877). O valor médio de *Tail Moment* da população estudada foi de 4,78 $\pm$ 2,46; para o sexo masculino o valor foi de 4,57 $\pm$ 2,26 e para o sexo feminino, 4,96 $\pm$ 2,61, sem diferença estatística (p = 0,396).

Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa em relação às variáveis *Tail Moment* e *Tail Intensity* de dano de DNA entre os diferentes estágios de desenvolvimento puberal de acordo com classificação de Tanner (1962), segundo os testes estatísticos ANOVA e Kruskal-Wallis, obtendo-se valores de p = 0,93 e p = 0,98, respectivamente.

4.3. Resultados da clusterização baseada nas variáveis *Tail Intensity* e *Tail Moment*

Nesse modelo, o *cluster* 1, formado por 73 indivíduos, apresenta valor médio de *Tail Intensity* de $7,08\% \pm 2,24$, e *Tail Moment* de $3,38 \pm 1,23$, enquanto *cluster* 2, com 47 indivíduos, $15,35\% \pm 2,40$ para *Tail Intensity* e $6,97 \pm 2,30$ para *Tail Moment*. Os grupos formados diferem estatisticamente em relação ao estado nutricional segundo classificação de IMC/idade, com um valor de $p = 0,037$, obtido pelo teste qui-quadrado (Tabela 7), porém são semelhantes em relação à composição corporal, com um valor de $p = 0,705$, conforme apresentado na tabela 8.

Tabela 7 – Estado nutricional dos *clusters* formados a partir de valores de *Tail Intensity* e *Tail Moment* segundo IMC/idade

Classificação de IMC/idade* [#]	Cluster 1 (n = 73)	Cluster 2 (n = 47)
< percentil 3	4 (5,5%)	-
Entre percentil 3 e percentil 15	4 (5,5%)	5 (10,6%)
Entre percentil 15 e percentil 85	28 (38,4%)	23 (48,9%)
Entre percentil 85 e percentil 97	22 (30,1%)	5 (10,6%)
> percentil 97	15 (20,5%)	14 (29,8%)

*Classificação do índice de massa corporal por idade segundo curvas de crescimento da OMS (2007) de 5 a 19 anos. < p3: magreza grave; entre percentil 3 e 15: magreza; entre percentil 15 e 85: peso adequado; entre p85 e p97: sobrepeso; > p97: obesidade.

[#] Teste qui-quadrado $p=0,037$

Tabela 8 – Classificação da composição corporal entre os *clusters* formados segundo valores de *Tail Intensity* e *Tail Moment*

Classificação de Porcentagem de gordura corporal/idade* [#]	Cluster 1 (n = 73)	Cluster 2 (n = 47)
< percentil 2	3 (4,1%)	4 (8,5%)
Entre percentil 2 e percentil 85	37 (50,7%)	24 (51,1%)
Entre percentil 85 e percentil 95	18 (24,7%)	8 (17,0%)
> percentil 95	15 (20,5%)	11 (23,4%)

*Classificação da porcentagem de gordura corporal por idade - McCarthy (2006). < p2: redução de gordura corporal; entre percentil 2 e 85: normalidade; entre percentil 85 e 95: excesso de gordura corporal; > p95: obesidade. [#] Teste qui-quadrado $p=0,705$.

O cluster 2, de maior dano de DNA apresenta uma maior prevalência de obesidade (IMC > p97) em relação ao cluster 1, porém, se considerarmos a soma entre sobrepeso e obesidade (IMC > p85), o cluster de menor dano de DNA apresenta uma maior prevalência. A idade, a distribuição entre os sexos, o estágio de desenvolvimento puberal e o nível de atividade física, através dos valores de equivalente metabólico (MET), também são semelhantes entre os grupos (Tabela 9).

Tabela 9 – Caracterização segundo idade, sexo, desenvolvimento puberal e MET segundo os *clusters* formados a partir de valores de *Tail Intesity* e *Tail Moment*

	<i>Cluster</i> 1 (n = 73)	<i>Cluster</i> 2 (n = 47)	p*
Idade (anos)	11,49 ± 1,04	11,28 ± 1,16	0,29
Sexo (n / %)			0,75
Masculino	32 (43,8%)	22 (46,8%)	
Feminino	41 (56,2%)	25 (53,2%)	
Estadiamento puberal (n / %)			0,44
1	6 (8,2%)	6 (12,8%)	
2	30 (41,1%)	21 (44,7%)	
3	27 (37,0%)	13 (27,7%)	
4	7 (9,6%)	6 (12,8%)	
5	3 (4,1%)	1 (2,1%)	
MET	2,38 ± 0,51	2,47 ± 0,56	0,39

MET: equivalente metabólico, ≤ 1,4: sedentário, 1,5 a 2,9: atividade física leve, 3,0 a 5,9: atividade física moderada, ≥ 6,0: atividade física vigorosa. Classificação do estadiamento puberal segundo Tanner (1962). *Teste T *Student* e Qui-Quadrado.

Em relação a ingestão energética, de macro e de micronutrientes, aferida através do cálculo do Questionário de Frequência Alimentar (QFA), os grupos não apresentam diferença estatisticamente significativa, conforme descrito na tabela 10, no entanto, os grupos diferiram em relação a ingestão alimentar analisada através da ferramenta Índice de Qualidade da Dieta Revisado (IQD-R), apresentando diferença estatisticamente significativa para alguns de seus componentes e para o escore total do IQD-R, como apresentado na Tabela 11.

Tabela 10 - Consumo de energia, macronutrientes e micronutrientes obtidos através do cálculo do QFA entre os *clusters* formados segundo valores de *Tail Intensity* e *Tail Moment*

	Cluster 1 (n = 73)	Cluster 2 (n = 47)	p*	p [#]
Energia (kcal)	1983,58 ± 492,56	2043,68 ± 630,45	0,560	-
Carboidratos (mg)	271,90 ± 81,00	280,38 ± 101,67	0,614	-
Lipídios (g)	67,92 ± 19,35	70,20 ± 21,58	0,548	-
Colesterol (g)	226,88 ± 95,18	222,14 ± 99,41	0,794	-
Ácido Linoleico (g)	9,49 ± 3,78	9,22 ± 3,73	0,702	-
Ácido α-Linolênico (g)	1,00 ± 0,42	0,96 ± 0,38	0,562	-
Gordura saturada (g)	21,12 ± 7,25	21,79 ± 6,84	0,618	-
Fibra alimentar (g)	20,65 ± 7,05	19,38 ± 10,08	0,858	-
Proteínas (g)	71,35 ± 20,05	70,49 ± 23,79	0,419	-
Retinol (µg)	416,82 ± 244,97	418,58 ± 176,35	0,832	-
Vitamina D (µg)	3,38 ± 2,48	3,09 ± 2,09	0,966	-
Vitamina E (mg)	14,50 ± 5,89	13,35 ± 5,57	0,518	-
Vitamina C (mg)	69,62 (36,5; 159,4)	66,64 (39,1; 158,5)	-	0,994
Folato (µg)	98,05 ± 50,01	100,02 ± 44,25	0,530	-
Tiamina (mg)	1,21 (0,99; 1,64)	1,23 (0,92; 1,73)	-	0,966
Riboflavina (mg)	1,55 ± 0,60	1,60 ± 0,61	0,826	-
Niacina (mg)	18,53 ± 6,62	17,90 ± 6,87	0,623	-
Piridoxina (mg)	1,33 ± 0,50	1,34 ± 0,48	0,674	-
Vitamina B12 (µg)	2,68 (1,85; 3,71)	2,66 (1,98; 3,66)	-	0,844
Cálcio (mg)	710,20 ± 310,52	744,50 ± 302,93	0,901	-
Ferro (mg)	10,12 ± 3,83	9,69 ± 3,52	0,527	-
Magnésio (mg)	274,83 ± 92,24	270,26 ± 99,74	0,552	-
Zinco (mg)	10,17 ± 3,66	9,85 ± 3,27	0,536	-

* Teste T *Student* para variáveis com distribuição normal; [#] Teste Mann Whitney para variáveis com distribuição não normal.

O *cluster* 1 (menor dano de DNA) apresenta maior consumo de vegetais em geral, de vegetais verdes escuros, alaranjados e leguminosas e de carnes, ovos e leguminosas ($p < 0,05$). O escore total do IQD-R também é maior no grupo de menor dano de DNA, o que caracteriza melhor qualidade no padrão dietético dos indivíduos deste *cluster*. Já em relação ao componente Laticínios do IQD-R, o grupo de maior dano apresentou um maior escore e, portanto, maior consumo. Para os demais componentes do IQD-R, não foram encontradas diferenças estatísticas.

Tabela 11 –Índice de Qualidade da Dieta Revisado entre *clusters* formados segundo valores de *Tail Intensity* e *Tail Moment*

	<i>Cluster</i> 1 (n = 73)	<i>Cluster</i> 2 (n = 47)	p [#]	p ^{&}
Cerais total	5,00 (4,56; 5,00)	5,00 (4,47; 5,00)	-	0,766
Cereais integrais	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 0,00)	-	0,053
Vegetais total	3,13 ± 2,04	2,36 ± 1,93	0,041*	-
VVAL	3,47 ± 2,10	2,67 ± 2,19	0,047*	-
Frutas total	1,40 ± 2,03	1,61 ± 2,13	0,587	-
Frutas integral	1,02 ± 1,87	1,03 ± 2,02	0,972	-
Laticínios	4,92 ± 3,62	6,63 ± 3,02	0,008*	-
Carnes, ovos e leguminosas	10,00 (10,0; 10,0)	10,00 (8,84; 10,0)	-	0,022*
Óleo	10,00 (10,0; 10,0)	10,00 (10,0; 10,0)	-	0,560
Gordura saturada	7,46 ± 2,95	6,66 ± 2,99	0,151	-
Sódio	6,72 ± 3,73	6,25 ± 3,63	0,497	-
GordAA	0,00 (0,00; 8,12)	0,00 (0,00; 1,55)	-	0,056
IQD total	56,67 ± 10,04	52,67 ± 9,19	0,030*	-

VVAL: vegetais verdes escuro, alaranjados e leguminosas; GordAA: gordura saturada, gordura trans, álcool e açúcar. * valor de p estatisticamente significativo. [#] Teste T *Student* para variáveis com distribuição normal; [&] Teste Mann Whitney para variáveis com distribuição não normal.

Na tabela acima é possível observar uma tendência de maior escore para o componente GordAA para o grupo de menor dano, com valor de $p = 0,056$. O escore dessa variável representa inversamente o consumo dos nutrientes gordura saturada, gordura trans, álcool e açúcar. Sendo assim o *cluster* 2, de maior dano de DNA,

apresenta tendência de consumo maior desse componente comparado ao grupo de menor dano.

Em relação a pontuação do componente cereais integrais, também é possível observar uma tendência de diferença entre os grupos, porém, os valores de mediana e quartis não representam adequadamente esse resultado, impossibilitando a visualização da diferença. Para essa variável o *cluster* 1 apresenta uma média de $9,37 \pm 1,90$, e o *cluster* 2, $8,95 \pm 2,11$, mostrando que o grupo de menor dano apresenta tendência de maior consumo deste componente.

Houve também diferença significativa sobre a concentração plasmática de riboflavina, o grupo com maior dano de DNA apresentou menores concentrações do micronutriente (Tabela 12). Após realização do teste de ANCOVA, corrigido para IMC, os resultados se mantiveram.

Tabela 12 – Concentração plasmática de vitaminas entre os *clusters* formados segundo valores de *Tail Intensity* e *Tail Moment*

	<i>Cluster</i> 1 (n = 73)	<i>Cluster</i> 2 (n = 47)	p [#]
Retinol (mol/L)	$0,34 \pm 0,08$	$0,34 \pm 0,09$	1,000
Betacaroteno (mol/L)	$0,23 \pm 0,14$	$0,19 \pm 0,11$	0,148
Riboflavina (mol/L)	$4,17 \pm 3,11$	$2,68 \pm 1,83$	0,004*

* valor de p estatisticamente significativo. [#] Teste T *Student* para variáveis com distribuição normal.

4.4. Resultados do agrupamento segundo escala de classificação do dano de DNA:

O maior valor de *Tail Intensity* encontrado foi de 20,15%, portanto não há indivíduos inseridos nas classes IV e V. O grupo 1, com 108 indivíduos, apresentou um valor médio de *Tail Intensity* de $9,39 \pm 3,91$ e o grupo 2, composto por 12 indivíduos, de $18,68 \pm 0,93$ ($p < 0,001$). Os valores médios de *Tail Moment* foram, respectivamente, $4,28 \pm 1,94$ e $9,30 \pm 2,02$ ($p < 0,001$).

Os grupos não diferem estatisticamente em relação às variáveis gênero, idade e estágio do desenvolvimento puberal, conforme resultados apresentados na tabela 13 a seguir.

Tabela 13 – Caracterização segundo sexo, desenvolvimento puberal e idade dos grupos divididos de acordo com escala de classificação de dano de DNA

	Grupo 1 (n =108)	Grupo 2 (n =12)	*p
Sexo (n / %)			0,40
Masculino	50 (46,3%)	4 (33,3%)	
Feminino	58 (53,7%)	8 (66,6%)	
Estadiamento puberal (n / %)			0,60
1	10 (9,5%)	2 (16,7%)	
2	47 (43,5%)	4 (33,3%)	
3	35 (32,4%)	5 (41,7%)	
4	12 (11,1%)	1 (8,3%)	
5	4 (3,7%)	-	
Idade (anos)	11,43 ± 1,09	11,25 ± 1,14	0,60
MET	2,40 ± 0,51	2,55 ± 0,68	0,36

MET: equivalente metabólico, ≤ 1,4: sedentário, 1,5 a 2,9: atividade física leve, 3,0 a 5,9: atividade física moderada, ≥ 6,0: atividade física vigorosa. Classificação do estadiamento puberal segundo Tanner (1962). *Teste T *Student* e Qui-Quadrado.

Em relação à classificação do estado nutricional segundo IMC/idade, estabelecida pela OMS (2007), foi encontrada diferença significativa através do teste qui-quadrado, com um valor de $p = 0,047$ (Tabela 14).

Tabela 14 – Estado nutricional segundo IMC/idade dos grupos divididos de acordo com escala de classificação de dano de DNA

Classificação de IMC/idade*	Grupo 1 (n = 108)	Grupo 2 (n = 12)
< percentil 3	4 (5,5%)	0 (0,0%)
Entre percentil 3 e percentil 15	7 (5,5%)	2 (16,7%)
Entre percentil 15 e percentil 85	42 (38,3%)	9 (75,0%)
Entre percentil 85 e percentil 97	27 (30,1%)	0 (0,0%)
> percentil 97	28 (20,5%)	1 (8,3%)

*Classificação do índice de massa corporal por idade segundo curvas de crescimento da OMS (2007) de 5 a 19 anos. < p3: magreza grave; entre percentil 3 e 15: magreza, entre percentil 15 e 85: peso adequado; entre p85 e p97: sobrepeso; > p97: obesidade. # Teste qui-quadrado $p=0,047$

Na tabela 14 é possível observar que o grupo 1 de menor dano de DNA apresenta maior porcentagem de indivíduos acima do percentil 85, classificados como sobrepeso e obesidade, e menor porcentagem de indivíduos classificados como magreza, abaixo do percentil 15, comparado ao grupo 2, de maior dano de DNA.

Apesar da diferença encontrada em relação a classificação do estado nutricional segundo valores da variável IMC/idade, os grupos não apresentam diferença estatisticamente significativa em relação a composição corporal, com um valor de $p = 0,082$, conforme apresentado na tabela 15 a seguir.

Tabela 15 – Classificação da composição corporal entre os grupos formados de acordo com escala de classificação de dano de DNA

Classificação de Porcentagem de gordura corporal/idade* [#]	Grupo 1 (n = 108)	Grupo 2 (n = 12)
< percentil 2	5 (4,6%)	2 (16,7%)
Entre percentil 2 e percentil 85	54 (50,0%)	7 (58,3%)
Entre percentil 85 e percentil 95	24 (22,2%)	2 (16,7%)
> percentil 95	25 (23,1%)	1 (8,3%)

*Classificação da porcentagem de gordura corporal por idade segundo classificação de McCarthy (2006). < p2: redução de gordura corporal; entre percentil 2 e 85: normalidade; entre percentil 85 e 95: excesso de gordura corporal; > p95: obesidade. [#]Teste qui-quadrado $p=0,082$.

A tabela 16 a seguir descreve a ingestão energética, de macro e de micronutrientes aferida através do Questionário de Frequência Alimentar. É possível observar que os grupos não apresentam diferença estatisticamente significativa em relação ao consumo dos nutrientes analisados.

Os grupos também não diferem em relação a ingestão alimentar conforme resultados do IQD-R, apresentados na tabela 17.

Tabela 16 – Consumo de energia, macronutrientes e micronutrientes obtidos através do cálculo do QFA entre os grupos divididos de acordo com escala de classificação de dano de DNA

	Grupo 1 (n = 108)	Grupo 2 (n = 12)	p*	p [#]
Energia (kcal)	1993,30 ± 544,16	2131,50 ± 600,39	0,410	-
Carboidratos (mg)	271,46 ± 87,02	309,04 ± 106,39	0,168	-
Lipídios (g)	68,82 ± 20,38	68,73 ± 19,29	0,989	-
Colesterol (g)	226,74 ± 92,95	209,54 ± 127,83	0,560	-
Ácido Linoleico (g)	9,36 ± 3,68	9,60 ± 4,47	0,834	-
Ácido α-Linolênico (g)	0,99 ± 0,41	0,96 ± 0,30	0,835	-
Gordura saturada (g)	21,37 ± 7,21	21,50 ± 5,96	0,954	-
Fibra alimentar (g)	20,12 ± 8,28	20,50 ± 9,33	0,880	-
Proteínas (g)	71,20 ± 21,45	69,26 ± 22,82	0,767	-
Retinol (µg)	421,37 ± 221,97	382,75 ± 205,21	0,566	-
Vitamina D (µg)	3,28 ± 2,35	3,11 ± 2,26	0,810	-
(Vitamina E (mg)	14,30 ± 5,82	11,79 ± 4,99	0,155	-
Vitamina C (mg)	120,15 ± 124,01	76,58 ± 64,94	0,234	-
Folato (µg)	99,70 ± 46,60	90,88 ± 58,07	0,545	-
Tiamina (mg)	1,21 (0,97; 1,65)	1,24 (0,91; 1,67)	-	0,903
Riboflavina (mg)	1,56 ± 0,60	1,66 ± 0,67	0,597	-
Niacina (mg)	18,31 ± 6,77	18,04 ± 6,32	0,895	-
Piridoxina (mg)	1,34 ± 0,49	1,29 ± 0,47	0,745	-
Vitamina B12 (µg)	2,68 (1,91; 3,72)	2,59 (1,83; 3,59)	-	0,594
Cálcio (mg)	721,23 ± 298,41	745,28 ± 388,79	0,798	-
Ferro (mg)	10,01 ± 3,68	9,45 ± 4,01	0,623	-
Magnésio (mg)	276,24 ± 97,66	244,18 ± 59,71	0,269	-
Zinco (mg)	10,15 ± 3,60	9,08 ± 2,27	0,317	-

* Teste T *Student* para variáveis com distribuição normal; [#] Teste Mann Whitney para variáveis com distribuição não normal.

Tabela 17 – Índice de Qualidade da Dieta Revisado (IQD-R) dos grupos divididos de acordo com escala de classificação de dano de DNA

	Grupo 1 (n = 108)	Grupo 2 (n = 12)	p [#]	p ^{&}
Cerais total	5,00 (4,43; 5,00)	5,00 (4,98; 5,00)	-	0,758
Cereais integrais	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 0,00)	-	0,141
Vegetais total	2,88 ± 2,01	2,31 ± 2,14	0,357	-
VVAL	5,00 (0,88; 5,00)	3,73 (0,00; 5,00)	-	0,498
Frutas total	0,00 (0,00; 4,19)	0,00 (0,00; 0,00)	-	0,038*
Frutas integral	0,00 (0,00; 1,66)	0,00 (0,00; 0,00)	-	0,188
Laticínios	5,32 ± 3,47	7,96 ± 2,67	0,012*	-
Carnes, ovos e leguminosas	10,00 (10,0; 10,0)	10,00 (9,13; 10,0)	-	0,917
Óleo	10,00 (10,0; 10,0)	10,00 (10,0; 10,0)	-	0,964
Gordura saturada	7,13 ± 3,01	7,31 ± 2,83	0,838	-
Sódio	6,44 ± 3,72	7,43 ± 3,33	0,380	-
GordAA	0,00 (0,00; 6,01)	0,00 (0,00; 3,84)	-	0,429
IQD total	55,24 ± 9,91	53,82 ± 9,84	0,637	-

VVAL: vegetais verdes escuro, alaranjados e leguminosas; GordAA: gordura saturada, gordura trans, álcool e açúcar. * valor de p estatisticamente significativo. [#] Teste T *Student* para variáveis com distribuição normal; [&] Teste Mann Whitney para variáveis com distribuição não normal.

Na tabela 18 é possível observar que os grupos são diferentes ou estão próximos à diferença estatística em relação a concentrações plasmáticas de micronutrientes. A concentração plasmática de retinol é maior no grupo de menor dano de DNA. Há também uma tendência de maiores concentrações de betacaroteno e riboflavina neste grupo, quando comparado ao grupo de maior dano de DNA.

Uma vez que os grupos diferiram em relação ao IMC, essa variável pode ter exercido influência sobre os resultados descritos abaixo. No entanto, após aplicação do teste de ANCOVA ajustado para IMC, obteve-se um valor de p = 0,010 para retinol, confirmando a diferença significativa entre os grupos.

Além disso, após o ajuste, as variáveis betacaroteno e riboflavina apresentaram um valor de $p = 0,017$, e $p = 0,046$, respectivamente, indicando que os grupos também diferem significativamente em relação às concentrações plasmáticas desses micronutrientes.

Tabela 18 – Concentrações plasmáticas de vitaminas entre os grupos divididos de acordo com escala de classificação de dano de DNA

	<i>Cluster</i> 1 (n = 108)	<i>Cluster</i> 2 (n = 12)	p [#]	p ^{&}
Retinol (mol/L)	0,35 ± 0,08	0,27 ± 0,09	0,004*	-
Betacaroteno (mol/L)	0,22 ± 0,13	0,15 ± 0,10	0,055	-
Riboflavina (mol/L)	3,74 ± 2,84	2,25 ± 1,65	-	0,077

* valor de p estatisticamente significativo. [#] Teste T *Student* para variáveis com distribuição normal; [&] Teste Mann Whitney para variáveis com distribuição não normal.

4.5. Resultados baseados no padrão do consumo alimentar determinado pela clusterização *Robust Sparse k-means Cluster*

Nesse modelo os indivíduos foram divididos em dois *clusters* de acordo com o consumo, obtido através do QFA, dos aminoácidos aromáticos fenilalanina e triptofano, dos aminoácidos de cadeia ramificada valina, leucina, isoleucina e dos micronutrientes e metabólitos, fósforo, ácido pantotênico, niacina, cianocobalamina, purinas, cromo, manganês, zinco, cobre, magnésio, inositol, colina, formando os seguintes grupos: *Cluster* 1 (n = 27) com maior ingestão desses nutrientes, e *cluster* 2 (n = 58), com menor ingestão.

Ao analisar o consumo energético entre os grupos, verificou-se que o *cluster* 1 apresentou uma ingestão menor de energia em relação ao *cluster* 2 ($1854,51 \pm 322,3$ versus $2234,05 \pm 535,8$, $p = 0,001$).

Em relação ao dano de DNA, o *cluster* 1 (maior ingestão dos nutrientes) apresentou uma média de *Tail Intensity* de $9,41\% \pm 4,17$, e o *cluster* 2, $11,54\% \pm 4,90$, com um valor de $p = 0,056$. Para a variável *Tail Moment*, os valores médios foram, respectivamente, $4,39 \pm 2,38$ e $5,45 \pm 2,76$, com $p = 0,090$, não representando diferença estatisticamente relevante.

Uma vez que a ingestão energética diferiu entre os grupos, o teste de ANCOVA foi aplicado para dano de DNA com ajuste para essa variável, obtendo-se então um valor de $p = 0,063$ para *Tail Intensity* e de $0,081$ para *Tail Moment*, representando tendência, porém não uma diferença estatisticamente significativa.

5. Discussão

O presente estudo descreve o dano de DNA de crianças e adolescentes de uma microrregião do município de Ribeirão Preto, através das variáveis *Tail Intensity* e *Tail Moment*, obtidas por meio do método *comet assay*. Um estudo semelhante realizado na Croácia também avaliou o dano de DNA através do referido método em crianças e adolescentes saudáveis. Foi observado um valor médio de $0,73 \pm 0,06$ para *Tail Intensity* e de $0,08 \pm 0,01$ para *Tail Moment* (GAJSKI, 2013), menores do que os valores encontrados no presente estudo ($10,32 \pm 4,35\%$ e $4,78 \pm 2,46$ respectivamente). Essa diferença pode, em parte, estar relacionada ao tempo de exposição à luz solar entre as populações dos dois estudos, considerando que este é um fator determinante para elevação do dano de DNA devido à citotoxicidade dos raios UVB (PETERSEN, 2014; PEHNEC, 2007; DUQUIA, 2013).

Os resultados encontrados apontam diferença no estado nutricional entre os grupos de dano de DNA ($p < 0,05$). O grupo com maior dano de DNA apresentou menor prevalência de indivíduos com sobrepeso. Um estudo realizado na Turquia demonstrou que indivíduos adultos obesos, sem outra doença crônica, apresentam maior dano de DNA quando comparados a indivíduos eutróficos, não corroborando nossos resultados (DONMEZ-ALTUNTAS, 2014). De forma semelhante, Scarpato e cols. (2011), encontraram maior frequência de micronúcleo em crianças obesas e com sobrepeso comparadas a crianças eutróficas.

Comparando o padrão alimentar através da ferramenta IQD-R entre os diferentes *clusters* de dano de DNA, foi observado um maior consumo de vegetais, incluindo vegetais verde-escuros, vegetais alaranjados e leguminosas no grupo caracterizado por menores valores de *Tail Moment* e *Tail Intensity*. Este resultado mostra um papel protetor dessa categoria de alimentos contra o dano de DNA.

Outros estudos têm demonstrado a relação entre a ingestão de hortaliças e dano de DNA de forma semelhante. Kim e cols. (2009), realizaram um estudo em camundongos alimentados com uma dieta rica em gordura e colesterol, em que o grupo alimentado também com uma mistura de vegetais diversos apresentou menor dano de DNA, através do teste *comet assay*. O estudo de Galas e cols. (2015), demonstrou fator protetor do consumo de vegetais crus contra agentes genotóxicos em linfócitos humanos. Da mesma forma, estudo de Staruchová e cols. (2006), encontrou uma relação inversa entre a ingestão de vegetais em geral e dano de DNA.

Um estudo de intervenção demonstrou uma redução no dano de DNA em linfócitos de adultos saudáveis após o consumo de produtos contendo tomate, cenoura e espinafre, por um período de duas semanas, corroborando o papel da ingestão de vegetais verde-escuros e alaranjados em relação ao dano de DNA encontrado no presente estudo (POOL-ZOBEL, 1997). Thompson e cols. (2005), em um estudo caso-controle com mulheres saudáveis, demonstraram uma redução no dano de DNA em linfócitos periféricos, através da aferição de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-oxo-dG) no grupo que recebeu intervenção dietética com um consumo médio de 12 porções de frutas e hortaliças em relação ao grupo controle, com um consumo médio de 3,6 porções.

Os dados do IQD-R também mostram que o grupo com maior dano de DNA apresentou um maior escore no grupo de laticínios, caracterizando maior consumo desse gênero alimentício. Dündaröz e cols. (2003), observaram que bebês alimentados com leite de vaca apresentaram dano de DNA elevado comparados a bebês alimentados com leite materno. Porém, por se tratar de um estudo realizado em lactentes, esse resultado demonstra os malefícios do consumo de leite de vaca em substituição a amamentação em uma fase do desenvolvimento em que é indicada a alimentação exclusivamente com leite materno.

Um outro estudo relacionou concentrações plasmáticas de micronutrientes em crianças saudáveis de 3, 6 e 9 anos de idade, e encontrou uma relação direta entre cálcio plasmático e a presença de micronúcleo e necrose, caracterizando um papel deletério deste mineral sobre o DNA celular. Esses achados explicam, em parte, os resultados encontrados no presente estudo, uma vez que o leite de vaca e seus

derivados são os alimentos em que este mineral é encontrado em maior quantidade, sendo naturalmente as principais fontes de cálcio da dieta (MILNE, 2015).

Outro fator a ser levado em consideração na relação encontrada é a possibilidade da presença de contaminantes em produtos lácteos. A aflatoxina M1 (AFM1) é um composto potencialmente carcinogênico, oriundo da biotransformação de aflatoxina B1 (AFB1) produzido por espécies fúngicas pertencentes ao gênero *Aspergillus* e resistente à pasteurização. Essas espécies se desenvolvem em grãos e cereais, matéria-prima comumente presente em rações de bovinos. A síntese de AFM1 a partir de AFB1 é um processo que ocorre no organismo de alguns animais, sendo as aflatoxinas excretadas pela urina e pelo leite (OLIVEIRA, 2001; DENNIS, 1981). Essa hipótese deverá ser comprovada em estudos futuros.

Um estudo analisou a presença de AFM1 em 43 amostras de leite comercial de 27 municípios do Estado de São Paulo, Brasil, em que 11 destas apresentaram concentração superior ao limite máximo preconizado pela ANVISA, de 0,5 µg/L (GONÇALEZ, 2005). Garrido e cols. (2003) em um estudo semelhante, detectou a presença de AFM1 em 20,9% das amostras de leite analisadas na cidade de Ribeirão Preto, estado de São Paulo, Brasil. Um estudo mais recente em Londrina, Paraná, Brasil, estimou um consumo médio de 0.468 ng/kg de aflatoxina proveniente do leite de vaca em adolescentes (SANTOS, 2015), apresentando risco toxicológico para a população estudada.

É preciso ressaltar que para o cálculo desse escore considerou-se inclusive o consumo de produtos lácteos industrializados, portanto levanta-se a hipótese de que o maior dano de DNA possa ter sofrido influência também de aditivos presentes nesses alimentos, tais como sacarose e corantes artificiais. Sabe-se que a ingestão elevada de produtos alimentícios ricos em açúcar e em aditivos alimentares, tais como corantes sintéticos, está associada ao surgimento de diversos tipos de câncer e outras doenças crônicas não transmissíveis, que podem estar relacionadas ao dano de DNA (WANG, 2014; SULAIMAN, 2014; TASEVSKA, 2014; POLÔNIO, 2009).

Os grupos diferiram estatisticamente em relação ao consumo do componente carnes, ovos e leguminosas do IQD-R, relacionando uma maior ingestão deste grupo com um menor dano de DNA. Os achados são controversos na literatura.

Djuric e cols. (1998), demonstraram que o consumo de carnes está relacionado positivamente ao dano de DNA em mulheres com risco para câncer de mama. Outros estudos relacionam o consumo de carne à ingestão de aminas heterocíclicas, compostos conhecidamente cancerígenos oriundos do processamento térmico de proteínas de origem animal (CARVALHO, 2016; ROHRMANN, 2009). Ishikawa e cols. (2010), por sua vez, demonstraram que a ingestão de heme presente em carnes vermelhas está associada ao aumento no dano de DNA em células do cólon. A proteção encontrada pelo maior consumo desse grupo no presente estudo pode estar relacionada ao fato de que este grupo também consumiu mais vegetais.

Os resultados encontrados sugerem uma relação inversa entre dano de DNA e estado nutricional relativo aos micronutrientes retinol, betacaroteno e riboflavina, corroborando achados da literatura.

No estudo de Ghyasvand e cols. (2015) foi encontrado que o sêmen de indivíduos inférteis apresentou maior dano de DNA, e que este grupo teve menores concentrações séricas de licopeno, betacaroteno e retinol, quando comparados a homens sem alteração no espermograma. Outro estudo demonstrou efeito protetor de uma dieta enriquecida com vitamina A em relação ao dano de DNA em ratos expostos a carcinógenos (MORIN, 2008). Em uma pesquisa semelhante, Slamenova e cols. (2002) observaram que a suplementação de vitamina A também reduziu o dano de DNA em ratos.

Duas análises distintas demonstraram fator protetor da riboflavina plasmática contra o dano de DNA, semelhante a resultados de outros autores. O estudo de Manthey e cols. (2006) demonstrou que a deficiência de riboflavina pode danificar proteínas e o DNA em células hepáticas. Já no estudo de Alam e cols. (2015), os autores encontraram efeitos benéficos envolvendo a suplementação deste micronutriente, levando à regeneração do DNA danificado em células de ratos com diabetes tipo 2.

Apesar da diferença nas concentrações sanguíneas destes micronutrientes entre os grupos de dano de DNA, não foi encontrada diferença na ingestão dos mesmos através do questionário de frequência do consumo alimentar. No entanto, houve diferença em relação à ingestão de hortaliças e vegetais verdes escuros, alaranjados e leguminosas através da ferramenta IQDR, os quais são fontes de

carotenoides e riboflavina, indicando o papel destes nutrientes provenientes da alimentação como agentes protetores (MOSER, 2011; KRAJCOVICOVA, 2004).

Nos *clusters* formados a partir da ingestão de aminoácidos, vitaminas e minerais, o grupo de maior consumo destes micronutrientes apresentou uma tendência de menores valores de dano DNA. Apesar de ser uma tendência, gostaríamos de enfatizar a importância biológica desses achados apresentando outros dados da literatura.

O consumo de vitamina B12 foi uma das variáveis utilizadas nesta análise com o uso de *Robust Sparse k-means cluster*. Seu potencial efeito já foi estudado por diversos autores. O trabalho de Minnet e cols. (2011) mostrou que lactentes com deficiência de vitamina B12 apresentam maior dano de DNA comparados a outros com adequado estado nutricional em relação a essa vitamina, e que após a suplementação do nutriente, o dano no DNA foi reduzido.

Estudos com Niacina também têm sido realizados. Abdullah e cols. (2017), demonstraram efeito inibitório da vitamina B3 sobre a produção de espécies reativas de oxigênio *in vitro*, protegendo contra o dano de DNA em albumina sérica de humanos.

De forma semelhante, a atuação dos minerais zinco e magnésio no dano de DNA está bem esclarecida. Em uma revisão sistemática, Ho (2004) descreve o fator protetor do zinco contra o dano de DNA, enfatizando seu papel na transcrição, como componente de proteínas ligadoras do DNA, e como antioxidante. Sharif e cols. (2015) demonstraram um efeito benéfico da suplementação de zinco em idosos com baixos níveis plasmáticos deste mineral. Em um outro estudo publicado em 2012, a deficiência e o excesso de zinco estiveram relacionados a um aumento no dano de DNA em queratinócitos humanos (SHARIF, 2011).

Em relação ao magnésio, Shah e cols. (2014) avaliaram o efeito a curta prazo de uma dieta deficiente neste micronutriente em ratos, levando a indução do dano oxidativo do DNA em tecidos cardiovasculares, estando associado a aterogênese. Outro estudo demonstrou um efeito benéfico da suplementação de magnésio em jovens atletas e sedentários, contra o dano de DNA (PETROVIĆ, 2016).

A ingestão de colina também fez parte da clusterização. Sabe-se que esse nutriente possui função estrutural e de sinalização em membranas celulares, atuando inclusive na neurotransmissão (ZEISEL, 2012). Da Costa e cols. (2008) analisaram os efeitos de uma dieta controle, com quantidades recomendadas de colina, e de uma dieta deficiente. Os autores encontraram o dobro de dano de DNA nos linfócitos dos indivíduos após a exposição à dieta deficiente em comparação a dieta controle.

Os resultados apresentam uma tendência de fator protetor de aminoácidos em relação ao dano de DNA, no entanto, excesso aminoácidos têm sido associados a aumento do estresse oxidativo e dano de DNA em estudos *in vitro*, e uma alimentação restrita em proteínas previne envelhecimento e o surgimento de doenças como o câncer, com etiologia relacionada ao dano de DNA (MIRZAEI, 2014).

Não é possível, com precisão, afirmar que foi o padrão de aminoácidos encontrado que determinou o menor dano de DNA, uma vez que o *cluster* estudado também incluiu a presença de vitaminas e minerais, sendo, portanto, uma explicação mais plausível e que corrobora os achados da análise do índice de qualidade da dieta.

Como resultado significativo da clusterização em diferentes padrões alimentares, o grupo de maior consumo de micronutrientes apresentou menor ingestão energética. Tal achado corrobora o fato de que um padrão alimentar rico em produtos alimentícios de alta densidade energética está habitualmente associado a um menor consumo de micronutrientes (BATISTA FILHO, 2008; KAC, 2003), e consequentemente, pode estar relacionado a um aumento no dano de DNA (SCHMID, 2012).

Não foram considerados alguns agentes externos genotóxicos, como horas de exposição à luz solar e a presença de algum familiar tabagista (PETERSEN, 2014; PEHNEC, 2007; DUQUILA, 2013), sendo esta uma limitação. O presente estudo destaca-se pelo cuidado em excluir da amostra indivíduos com provável sub ou super relato de ingestão, assim como pela correção para variáveis de confusão como atividade física e IMC. Além disso, o estudo apresenta forte evidência

demonstrada por diferentes análises estatísticas de que o consumo de vitaminas e antioxidantes protege contra o dano de DNA.

6. Conclusão

Os resultados encontrados revelam que um maior consumo de vegetais e leguminosas, menor consumo energético e maiores concentrações plasmáticas de retinol, betacaroteno e riboflavina em crianças e adolescentes estão associados a menores valores de dano de DNA, sugerindo que um adequado estado nutricional em relação a micronutrientes atua de forma protetora contra o dano no DNA nesta faixa etária.

Dessa forma conclui-se que um modelo alimentar carente em alimentos fontes de micronutrientes pode estar relacionado a um aumento de lesões no DNA celular em crianças e adolescentes. Considerando que existe uma relação entre o dano de DNA celular e o aparecimento de algumas doenças, é importante evidenciar a necessidade da implementação de políticas públicas de educação nutricional para crianças e adolescentes, visando a formação de padrões alimentares saudáveis, com a maior proporção de verduras, legumes, leguminosas e carnes magras, com o objetivo de prevenir o desenvolvimento de patologias relacionadas a genotoxicidade. Além disso, fica evidente a necessidade de mais estudos clínicos randomizados de intervenção nutricional explorando o dano de DNA nessa faixa etária.

Referências¹

ABDULLAH, K. M.; QAIS, F. A.; AHMAD, I.; NASEEM, I. Inhibitory effect of vitamin B3 against glycation and reactive oxygen species production in HSA: An in vitro approach. **Arch Biochem Biophys**, v. 1, n. 627, p. 21-29, 2017.

AINSWORTH, B. E.; HASKELL, W. L.; LEON, A. S.; JACOBS, D. R. Jr. e cols. Compendium of physical activities: classification of energy costs of human physical activities. **Med Sci Sports Exerc**, v. 25, n. 1, p. 71-80, 1993.

ALAM, M.; IQBAL, S.; NASEE, I. Ameliorative effect of riboflavin on hyperglycemia, oxidative stress and DNA damage in type-2 diabetic mice: Mechanistic and therapeutic strategies. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 584, p.10-19, 2015.

BAILEY, K. D. Numerical Taxonomy and Cluster Analysis. In: **Typologies and Taxonomies: An Introduction to Classification Techniques**. Sage Publications, 1994, 90 p, série n. 07-102.

BATISTA FILHO, M.; SOUZA, A. I.; MIGLIOLI, T. C.; SANTOS, M. C. Anemia e obesidade: um paradoxo da transição nutricional brasileira. **Cad. Saúde Pública**, v. 24, 2008.

BELTOWSKI, J.; WOJCICKA, G.; GORNY, D.; MARCINIAK, A. The effect of dietary-induced obesity on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and total plasma antioxidant capacity. **J. Physiol. Pharmacol**, v. 51, p. 883–896, 2000.

BENEDET, J.; ASSIS, M. A. A.; CALVO, M. C. M.; ANDRADE, D. F. Excesso de peso em adolescentes: explorando potenciais fatores de risco. **Rev Paul Pediatr**, v. 31, n. 2, p. 172-181, 2013.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

BLACK, A. E.; BINGHAM, S. A.; JOHANSSON, G.; COWARD, W. A. Validation of dietary intakes of protein and energy against 24 hour urinary N and DLW energy expenditure in middle-aged women, retired men and post-obese subjects: comparisons with validation against presumed energy requirements. **Eur J Clin Nutr**, v. 51, n. 6, p. 405-13, 1997.

BOUCHARD, C.; SHEPARD, R.; STEPHENS, T. **Physical activity, fitness and health**: consensus statement. Human Kinetics, 1993.

BRASIL. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição. **Guia alimentar para a população brasileira**: promovendo a alimentação saudável. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

CARVALHO, A. M.; CARIOCA, A. A.; FISBERG, R. M.; Q. I. L.; MARCHIONI, D. M. Joint association of fruit, vegetable, and heterocyclic amine intake with DNA damage levels in a general population. **Nutrition**, v. 32, n. 2, p. 260-4, 2016.

COLLINS, A. R.; OLMEDILLA, B.; SOUTHON, S.; GRANADO, F.; DUTHIE, S. J. Serum carotenoid and oxidative DNA damage in human lymphocytes. **Carcinogenesis**, v. 19, n.12, p. 2159-2162, 1998.

COMINETTI, C.; BORTOLI, M. C.; PURGATTO, E.; ONG, T. P.; MORENO, F. S.; GARRIDO J. R.; COZZOLINO, S. M. F. Associations between glutathione peroxidase-1 Pro198Leu polymorphism, selenium status, and DNA damage levels in obese women after consumption of Brazil nuts. **Nutrition**, v. 27, p. 891-896, 2011.

COOKE M. S.; OLINSKI R.; EVANS, M. D. Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance? **Clinica Chimica Acta**, v. 365, p. 30-49, 2006.

DA COSTA, K. A.; NICULESCU, M. D.; CRACIUNESCU, C. N.; FISCHER, L. M.; ZEISEL, S. H. Choline deficiency increases lymphocyte apoptosis and DNA damage in humans. **Am J Clin Nutr**, v. 84, p. 88–94, 2006.

DANFORD, L. C.; SCHOELLER, D. A.; KUSHNER, R. F. Comparison of two bioelectrical impedance analysis models for total body water measurement in children. **Ann Hum Biol**, v. 19, n. 6, p. 603-607, 1992.

DEMIRBAG, R.; YILMAZ, R.; KOCYIGIT, A. Relationship between DNA damage, total antioxidant capacity and coronary artery disease. **Mutation Research**, v. 570, p. 197–203, 2005.

DENNIS, P.; HSIEH, H. Metabolism and transmission of mycotoxins. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM AND WORKSHOP ON MYCOTOXINS, Cairo, 1981. **Proceedings...** Cairo, 1983. p. 151-165.

DEPARTAMENTO DE ATEROSCLEROSE DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. **IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose**. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, v. 88, 2007.

DJURIC, Z.; DEPPER, J. B.; UHLEY, V.; SMITH, D. e cols. Oxidative DNA damage levels in blood from women at high risk for breast cancer are associated with dietary intakes of meats, vegetables, and fruits. **J Am Diet Assoc**, v. 98, n. 5, p. 524-8, 1998.

DONMEZ-ALTUNTAS, H.; SAHIN, F.; BAYRAM, F.; BITGEN, N. e cols. Evaluation of chromosomal damage, cytostasis, cytotoxicity, oxidative DNA damage and their association with body-mass index in obese subjects. **Mutation Research**, v. 771, p. 30–36, 2014.

DRIVER, H. E.; KROEBER, A. L. **Quantitative expression of cultural relationships**. University of California Publications in American Archeology and Ethnology, 1932.

DÜNDARÖZ, R.; ULUCAN, H.; AYDIN, H. I.; GÜNGÖR, T. e cols. Analysis of DNA damage using the comet assay in infants fed cow's milk. **Biol Neonate**, v. 84, n. 2, p. 135-41, 2003.

DUQUIA, R. P.; MENEZES, A. M.; ALMEIDA, H. L. Jr.; REICHERT, F. F. e cols. Prevalence of sun exposure and its associated factors in southern Brazil: a population-based study. **An Bras Dermatol**. v. 88, n. 4, p. 554-61, 2013.

ESTIVILL-CASTRO, V. Why so many clustering algorithms – A Position Paper. **ACM SIGKDD Explorations Newsletter**, v. 4, n. 1, p. 65-75, 2002.

EVANS, M. D.; DIZDAROGLU, M.; COOKE, M. S. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. **Mutation Research**, v. 567, p. 1-61, 2004

FUMAGALLI, F.; MONTEIRO, J. P.; SARTORELLI, D. S.; VIEIRA, M. N. C. M.; BIANCHI, M. L. P. Validation of a food frequency questionnaire for assessing dietary nutrients in Brazilian children 5 to 10 years of age. **Nutrition**, v. 24, p. 427-432, 2008.

FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009**. Avaliação nutricional da disponibilidade domiciliar de alimentos no Brasil. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv47310.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2017.

GAJSKI, G.; GERIĆ, M.; OREŠČANIN, V.; GARAJ-VRHOVAC, V. Cytogenetic status of healthy children assessed with the alkaline comet assay and the cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Mutat Res**, v. 750, p. 55-62, 2013.

GALAS, A.; CEBULSKA-WASILEWSKA, A. Can consumption of raw vegetables decrease the count of sister chromatid exchange? Results from a cross-sectional study in Krakow, Poland. **Eur J Nutr**, v. 54, n. 2, p. 161-71, 2015.

GARRIDO, N. S.; IHA, M. H.; SANTOS, O. M. R.; DUARTE, R. M. F. Occurrence of aflatoxins M1 and M2 in milk commercialized in Ribeirão Preto-SP, Brasil. **Food Additives and Contaminants**, v. 20, n. 1, p. 70-73, 2003.

GIOVANNELLI, L.; COZZI, A.; GUARNIERI, I.; DOLARA, P.; MORONI, F. Comet assay as a novel approach for studying DNA damage in focal cerebral ischemia:

differential effects of NMDA receptor antagonists and poly (ADP-Ribose) polymerase inhibitors. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 22, p. 697-704, 2002.

GHYASVAND, T.; GOODARZI, M. T.; AMIRI, I.; KARIMI, J.; GHORBANI M. Serum levels of lycopene, beta-carotene, and retinol and their correlation with sperm DNA damage in normospermic and infertile men. **J. Reprod. Biomed. (Yazd)**, v. 13, n. 12, p. 787-92, 2015.

GOLDBERG, G. R.; BLACK, A. E.; JEBB, S. A.; COLE, T. J.; MURGATROYD, P. R.; COWARD, W. A.; PRENTICE, A. M. Critical evaluation of energy intake data using fundamental principles of energy physiology. Derivation of cut-off limits to identify under-recording. **Eur J Clin Nutr**, v. 45, p. 569-81, 1991.

GONÇALEZ, E.; FELICIO, J. D.; PINTO, M. M.; ROSSI, M. H. e cols. Ocorrência de aflatoxina M1 em leite comercializado em alguns municípios do estado de São Paulo. **Arq Inst Biol**, v. 72, n. 4, p. 435-438, 2005.

HARANGI, M.; REMENYIK, E.; SERES, I.; VARGA, Z.; KATONA, E.; PARAGH, G. Determination of DNA damage induced by oxidative stress in hyperlipidemic patients. **Mutat. Res**, v. 513, p. 17–25, 2002.

HASSAN, I.; CHIBBER, S.; KHAN, A. A.; NASEEM, I. Riboflavin Ameliorates Cisplatin Induced Toxicities under Photoillumination. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, e36273, 2012.

HEYWARD, V. H.; STOLARCZYK, L. M. **Applied body composition assessment**. Champaign, IL: Human Kinetics, 1996. 221 p.

HO, E. Zinc deficiency, DNA damage and cancer risk. **J Nutr Biochem**, v. 15, n. 10, p. 572-8, 2004.

HOUTKOOPER, L. B.; GOING, S. B.; LOHMAN, T. G.; ROCHE, A. F.; VAN LOAN, M. Bioelectrical impedance estimation of fat-free body mass in children and youth: a cross-validation study. **J Appl Physiol**, v. 72, n. 1, p. 366-73, 1992.

INSTITUTE OF MEDICINE (IOM). **Dietary Reference Intakes for Water, Potassium, Sodium, Chloride, and Sulfate**. Washington, D.C.: The National Academies Press, 2004.

ISHIKAWA, S.; TAMAKI, S.; OHATA, M.; ARIHARA, K.; ITOH, M. Heme induces DNA damage and hyperproliferation of colonic epithelial cells via hydrogen peroxide produced by heme oxygenase: a possible mechanism of heme-induced colon cancer. **Mol Nutr Food Res**, v. 54, n. 8, p. 1182-91, 2010.

JELLIFE, D. B. Evaluacion del estado de nutricion de la comunidad: serie de monografias. **Geneva: World Health Organization**, p. 191, 1968.

KAC, G.; VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ, G. A transição nutricional e a epidemiologia da obesidade na América Latina. **Cad. Saúde Pública**, v.19, 2003.

KENNEDY, E. T.; OHLS, J.; CARLSON, S.; FLEMING, K. The Healthy Eating Index: design and applications. **J Am Diet Assoc** v. 95, p. 1103-9, 1995.

KIM, M. Y.; CHEONG, S. H.; KIM, M. H.; SON, C. e cols. Leafy Vegetable Mix Supplementation Improves Lipid Profiles and Antioxidant Status in C57BL/6J Mice Fed a High Fat and High Cholesterol Diet. **Journal of Medicinal Food**, v. 12, n. 4, p. 877-884, 2009.

KONDO, Y.; SALIBIAN-BARRERA, M.; ZAMAR, R. **A robust and sparse K-means clustering algorithm**. Vancouver, Canada: Department of Statistics, The University of British Columbia, 2012.

KONOPACKA, M.; RZESZOWSKA-WOLNY, J. Antioxidant Vitamins C, E and β -carotene reduce DNA damage before as well as after g-ray irradiation of human lymphocytes in vitro. **Mutation Research**, v. 491, p. 1-7, 2001.

KRAJCOVICOVA-KUDLACKOVA, M.; DUSINSKA, M. Oxidative DNA damage in relation to nutrition. **Neoplasma**, v. 51, p. 30-33, 2004.

KRYSTON, T. B.; GEORGIEV, A. B.; PISSIS, P.; GEORGAKILAS, A. G. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. **Mutation Research**, v. 711, p. 193–201, 2011.

LIVINGSTONE, M. B.; ROBSON, P. J. Measurement of dietary intake in children. **Proc Nutr Soc**, v. 59, p. 279-93, 2000.

LUKASKI, H. C. Methods for the assessment of human body composition: traditional and new. **Am J Clin Nutr**, v. 46, p. 537-56, 1987.

MAHAM, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. **Krause: Alimentos, nutrição e dietoterapia**. 10ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2002.

MANTHEY, K.; RODRIGUEZ-MELELENDEZA, R.; HOIA, J. T.; ZEMPLINI, J. Riboflavin Deficiency Causes Protein and DNA Damage in HepG2 cells, Triggering Arrest in G1 Phase of the Cell Cycle. **J Nutr Biochem**, v. 17, n. 4, p. 250-56, 2006.

MARTINEZ, C. A. R.; RIBEIRO, M. L.; GAMBERO, A.; MIRANDA, D. D. C.; PEREIRA, J. A.; NADAL, S. R. The importance of oxygen free radicals in the etiopathogenesis of diversion colitis in rats. **Acta Cir Bras**, v. 25, n. 5, p. 387-95, 2010.

MCCARTHY, H. H.; COLE, T. J.; FRY, T.; JEBB, S. A.; PRENTICE A.M. Body fat reference curves for children. **Int J Obes (Lond)**, v. 30, p. 598-602, 2006.

MILNE, E.; GREENOP, K. R.; RAMANKUTTY, P.; MILLER, M. e cols. Blood micronutrients and DNA damage in children. **Mol Nutr Food Res**, v. 59, n. 10, p. 2057-65, 2015.

MINNET, C.; KOC, A.; AYCICEK, A.; KOCYIGIT, A. Vitamin B12 treatment reduces mononuclear DNA damage. **Pediatrics International**, v. 53, p. 1023-7, 2011.

MIRZAEI, H.; SUAREZ, J. A.; LONGO, V. D. Protein and amino acid restriction, aging and disease: from yeast to humans. **Trends Endocrinol Metab**, v. 25, n. 11, p. 558-66, 2014.

MONTEIRO, J. P. **Consumo Alimentar**: Visualizando porções. 1ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

MORIN, B.; NARBONNE, J. F.; RIBERA, D.; BADOUARD, C.; RAVANAT, J. L. Effect of dietary fat-soluble vitamins A and E and proanthocyanidin-rich extract from grape seeds on oxidative DNA damage in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 787-96, 2008.

MOSER, B. e cols. Impact of spinach consumption on DNA stability in peripheral lymphocytes and on biochemical blood parameters: results of a human intervention trial. **Eur J Nutr**, v. 50, n. 7, p. 587-94, 2011.

O'HAGAN, H. M. Chromatin Modifications During Repair of Environmental Exposure-Induced DNA Damage: A Potential Mechanism for Stable Epigenetic Alterations. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 55, p. 278-91, 2014.

OLIVEIRA, C. A. F.; GERMANO, P. M. L. Aflatoxina M1 em leite e derivados. In: GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. J. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. Ed. São Paulo: Livraria Varela, 2001.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Physical status**: the use and interpretation of anthropometry. Geneva: WHO, 1995.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Global Strategy on diet, physical activity and health**: list of all documents and publications. Fifty-seventh World Health Assembly, 2004.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Grow reference 5-19 years**. Body mass index for age (5-19 years) percentiles, 2007.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 123, n. 1, p. 291-8, 1984.

PATE, R. R.; PFEIFFER, K. A.; TROST, S. G.; ZIEGLER, P.; DOWDA, M. Physical Activity Among Children Attending Preschools. **Pediatrics**, v. 114, n. 5, p.1258-63, 2004.

PEHNEC, G.; KEZELE, N.; SORGO, G. Estimation of uv exposure in croatia over the summer using a simple approximate formula. **Arh Hig Rada Toksikol**, v. 58, p. 387-397, 2007.

PETERSEN, B.; WULF H. C.; TRIGUERO-MAS, M.; PHILIPSEN, P. A. e cols. Sun and ski holidays improve vitamin D status, but are associated with high levels of DNA damage. **J Invest Dermatol**, v. 134, n. 11, p. 2806-13, 2014.

PETROVIĆ, J.; STANIĆ, D.; DMITRAŠINOVIĆ, G.; PLEĆAŠ-SOLAROVIĆ, B. e cols. Magnesium Supplementation Diminishes Peripheral Blood Lymphocyte DNA Oxidative Damage in Athletes and Sedentary Young Man. **Oxid Med Cell Longev**, id: 2019643, 7 p., 2016.

POLÔNIO, M. L. T.; PERES, F. Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira. **Cad. Saúde Pública**, v. 25, n. 8, 2009.

POOL-ZOBEL, B. L.; BUB, A.; MÜLLER, H.; WOLLOWSKI, I.; RECHKEMMER, G. Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods. **Carcinogenesis**, v. 18, n. 9, p. 1847-50, 1997.

PREVIDELLI, A. N.; ANDRADE, S. C.; PIRES, M. M.; FERREIRA, S. R. G. e cols. Índice de Qualidade da Dieta Revisado para população brasileira. **Rev Saúde Pública**, v. 45, n. 4, p. 794-8, 2011.

ROBICHOVÁ, S.; SLAMENOVÁ, D.; CHALUPA, I.; SEBOVÁ, L. DNA lesions and cytogenetic changes induced by N-nitrosomorpholine in HepG2, V79 and VH10 cells: the protective effects of Vitamins A, C and E. **Mutat Res**, v. 560, n. 2, p. 91-9, 2004.

ROHRMANN, S.; JUNG SU, L.; LINSEISEN, J.; PFAU, W. Dietary intake of meat and meat-derived heterocyclic aromatic amines and their correlation with DNA adducts in female breast tissue. **Mutagenesis**, v. 24, n. 2, p. 127-32, 2009.

SANTOS, J. S.; FRANÇA, V. R.; KATTO, S.; SANTANA, E. H. Aflatoxin M1 in pasteurized, UHT milk and milk powder commercialized in Londrina, Brazil and estimation of exposure. **Arch Latinoam Nutr**, v. 65, n. 3, p. 181-5, 2015.

SCARPATO, R.; VEROLA, C.; FABIANI, B.; BIANCHI, V e cols. Nuclear damage in peripheral lymphocytes of obese and overweight Italian children as evaluated by the gamma-H2AX focus assay and micronucleus test. **FASEB J**, v. 25, n. 2, p. 685-93, 2011.

SERPELONI, J. M.; GROTTTO, D.; MERCADANTE, A. Z.; BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES L. M. Lutein improves antioxidant defense in vivo and protects against DNA damage and chromosome instability induced by cisplatin. **Arch Toxicol**, v. 84, n. 10, p. 811-22, 2010.

SCHOFIELD, W. N. Predicting basal metabolic rate, new standards and review of previous works. **Hum Nutri Clin Nutr**, v. 39, p. 5-42, 1985.

SHAH, N. C.; SHAH, G. J.; LI, Z.; JIANG, X. C.; ALTURA, B. T.; ALTURA, B. M. Short-term magnesium deficiency downregulates telomerase, upregulates neutral sphingomyelinase and induces oxidative DNA damage in cardiovascular tissues: relevance to atherogenesis, cardiovascular diseases and aging. **Int J Clin Exp Med**, v. 7, n. 3, p. 497-514, 2014.

SHARIF, R.; THOMAS, P.; ZALEWSKI, P.; FENECH, M. Zinc supplementation influences genomic stability biomarkers, antioxidant activity, and zinc transporter

genes in an elderly Australian population with low zinc status. **Mol Nutr Food Res**, v. 59, n. 6, p. 1200-12, 2015.

SHARIF, R.; THOMAS, P.; ZALEWSKI, P.; GRAHAM, R. D.; FENECH, M. The effect of zinc sulphate and zinc carnosine on genome stability and cytotoxicity in the WIL2-NS human lymphoblastoid cell line. **Mutat Res**, v. 720, p. 22-33, 2011.

SCHMID, T. E.; ESKENAZI, B.; MARCHETTI, F.; YOUNG, S. e cols. Micronutrients intake is associated with improved sperm DNA quality in older men. **Fertil Steril**, v. 98, n. 5, p. 1130-7, 2012.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp Cell Res**, v. 175, n. 1, p. 84-191, 1988.

SLAMENOVA, D.; CHALUPA, I.; ROBICHOVA, S.; GABELOVA, A. Effect of Dietary Intake of Vitamin A or E on the Level of DNA Damage, Chromosomal Aberrations, and Micronuclei Induced in Freshly Isolated Rat Hepatocytes by Different Carcinogens. **Nutrition and cancer**, v. 42, n. 1, p. 117-24, 2002.

SLYSKOVA, J.; LORENZO, Y.; KARLSEN, A.; CARLSEN, M. H. e cols. Both genetic and dietary factors underlie individual differences in DNA damage levels and DNA repair capacity. **DNA Repair**, v. 16, p. 66-73. 2014.

STARUCHOVÁ, M.; VOLKOVÁ, K.; LAJDOVÁ, A.; MISL'ANOVÁ, C. e cols. Importance of diet in protection against oxidative damage. **Neuro Endocrinol**, v. 2, p.112-5, 2006.

STEINLEY, D. Local optima in K-means clustering: What you don't know may hurt you. **Psychological Methods**, v. 8, p. 294-304, 2003.

STEINLEY D. K-means clustering: A half-century synthesis. **British Journal of Mathematical and Statistical Psychology**, v. 59, p. 1-34, 2006a.

STEINLEY, D. Profiling local optima in K-means clustering: Developing a diagnostic technique. **Psychological Methods**, v. 11, p. 178-92, 2006b.

SULAIMAN, S.; SHAHRIL, M. R.; WAFI, S. W.; SHAHARUDIN, S. H.; HUSSIN, S. N. Dietary carbohydrate, fiber and sugar and risk of breast cancer according to menopausal status in Malaysia. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 15, n. 14, p. 5959-64, 2014.

TANNER, J. Growth at adolescence: with a general condition of the effects of hereditary and environmental factors upon growth and maturation from birth to maturity. 2nd edition. **Oxford: Blackwell Scientific**; 1962.

TASEVSKA, N.; JIAO, L.; CROSS, A. J.; KIPNIS, V. e cols. Sugars in diet and risk of cancer in the NIH-AARP Diet and Health Study. **Int J Cancer**, v. 130, n. 1, p. 159-69, 2012.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, n. 3 p. 206-221, 2000.

THOMPSON, H. J.; HEIMENDINGER, J.; GILLETTE, C.; SEDLACEK, S. M. e cols. In vivo investigation of changes in biomarkers of oxidative stress induced by plant food rich diets. **J Agric Food Chem**, v. 53, n. 15, p. 6126-32, 2005.

VEIGA, G. V.; COSTA, R. S.; ARAÚJO, M. C.; SOUZA, A. M.; BEZERRA, I. N.; BARBOSA, F. S.; SICHIERI, R.; PEREIRA, R. A. Inadequação do consumo de nutrientes entre adolescentes brasileiros. **Rev Saúde Pública**, v. 47, n. 1, p. 212S-21S, 2013.

WANG, Z.; UCHIDA, K.; OHNAKA, K.; MORITA, M. Sugars, sucrose and colorectal cancer risk: the Fukuoka colorectal cancer study. **Scand J Gastroenterol**, v. 49, n. 5, p. 581-8, 2014.

WASSON, G. R.; MCKELVEY-MARTIN, V. J.; DOWNES, C. S. The use of the comet assay in the study of human nutrition and cancer. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 153-62, 2008.

WEBSTER, R. P.; GAWDE, M. D.; BHATTACHARYA, R. K. Modulation of carcinogen-induced DNA damage and repair enzyme activity by dietary riboflavin. **Cancer Letters**, v. 98, p. 129-35, 1996.

WOLLOWSKI, I.; JI, S. T.; BAKALINSKY, A. T.; NEUDECKER, C.; POOL-ZOBEL, B. L. Bacteria used for the production of yogurt inactivate carcinogens and prevent DNA damage in the colon of rats. **J Nutr**, v. 129, p. 77–82, 1999.

YANG, Q.; HERGENHAHN, M.; WENINGER, A.; BARTSCH, H. Cigarette smoke induces direct DNA damage in the human B-lymphoid cell line Raji. **Carcinogenesis**, v. 20, p. 1769–1775, 1999.

ZEISEL, S. H. Dietary choline deficiency causes DNA strand breaks and alters epigenetic marks on DNA and histones. **Mutat Res**, v. 733, p. 34-8, 2012.

Anexos

ANEXO A - Termo de Assentimento para Crianças e Adolescentes

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PUERICULTURA E PEDIATRIA

Av. Bandeirantes, 3900. Cep 14049-900 – Ribeirão Preto – SP
Telefone: (16) 3602-2573 - FAX: (16) 3602-2700

TERMO DE ASSENTIMENTO PARA CRIANÇAS E ADOLESCENTES

Eu, PROFESSORA DOUTORA JACQUELINE PONTES MONTEIRO e a Nutricionista ROBERTA GARCIA SALOMÃO, pesquisadoras do Departamento de Puericultura e Pediatria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP-SP), estamos desenvolvendo a pesquisa intitulada **“Nova estratégia para analisar interações gene-nutriente em crianças e adolescentes”** e estamos convidando você a participar deste trabalho.

A obesidade, em crianças e adolescentes, é uma doença causada pelo excesso da ingestão de calorias. Baixa ingestão de vitaminas e minerais (substâncias vitais para o nosso organismo) pode determinar o aparecimento de doenças associadas à obesidade. Nós achamos que a suplementação de vitaminas e alguns minerais irá melhorar a condição nutricional de crianças e adolescentes por aumentar substâncias no sangue chamadas S-adenosilmetionina (SAM) e S-adenosilhomocisteína (SAH). Os níveis dessas substâncias no seu sangue podem estar associados à condição de saúde ou doença, inclusive a obesidade. Também achamos que os diferentes níveis dessas substâncias (SAM e SAH) estão associados às diferentes variações genéticas (diferenças nos seus genes). O que são genes? São pequenas estruturas no nosso corpo que definem nossa aparência e nossa condição de saúde e de doença. Ou seja, somos o que somos por causa da interação entre estas estruturas internas com o meio em que vivemos.

Este estudo tem como objetivo a melhor compreensão de como a suplementação de vitaminas e minerais pode afetar os níveis no sangue de substâncias específicas e como estes níveis estão associados às mudanças nos genes. A importância destes achados está no fato de que indivíduos com diferentes genes irão necessitar de diferentes orientações sobre alimentação para obterem melhores condições de saúde, ou seja, você receberá uma orientação sobre a alimentação mais adequada para você.

Se você concordar em participar neste estudo, terá que ingerir barrinhas de leite da Nestlé ricas em vitaminas e minerais (2 barrinhas para crianças entre 9 e 11 anos e 3 barrinhas para aqueles com idade maior ou igual a 12 anos), durante seis semanas porém apenas durante os dias escolares. Essas barrinhas de leite deverão ser entregues a você no seu colégio, antes do início das aulas e deverão ser comidas imediatamente após a entrega das mesmas, condição **IMPORTANTE** para a participação neste estudo. Você não receberá as barrinhas aos sábados, domingos e feriados. Você receberá as barrinhas de leite por pesquisadores

estrategicamente posicionados em frente à sua escola e em um carro de apoio à pesquisa, a fim de não constranger ou expor você no ambiente escolar.

Você deve encontrar os pesquisadores durante 3 momentos diferentes para coleta de dados importantes para essa pesquisa. Essa coleta de dados durará entre 2 a 3 horas em cada momento. Em cada um destes momentos, você receberá ajuda de custo para pagar transporte (ida e volta) até o local da coleta e pagar almoço para você e para seu responsável legal.

- Momento 1: antes de receber as barrinhas de leite
- Momento 2: após 6 semanas do recebimento das barrinhas de leite
- Momento 3: após mais 6 semanas SEM receber as barrinhas de leite

Em cada momento, as seguintes atividades serão desenvolvidas:

1. Coleta de sangue: 12 ml no momento 1 (4 colheres de sopa cheias) e 9 ml nos momentos 2 e 3 (aproximadamente 3 colheres de sopa cheias).
2. Medidas de peso, estatura e circunferência da cintura.
3. Simples avaliação da quantidade da gordura do seu corpo através de um aparelho chamado impedância bioelétrica, sem qualquer risco, desconforto ou dor.
4. Responder a questionários sobre a alimentação usual, sobre a atividade física e sobre a condição econômica com a ajuda de seus pais ou responsáveis legais.

Na semana que antecede cada coleta de sangue vocês serão procurados pelos pesquisadores para responderem a 3 recordatórios de 24 horas (o que você comeu ou bebeu no dia anterior).

A coleta de sangue será feita por pessoal capacitado para essa função e o risco é mínimo (**Riscos: A coleta de sangue tem risco mínimo**). Em alguns casos verifica-se pequena luxação no local. Estas amostras serão coletadas após um jejum de pelo menos 6 horas. Será fornecido café de manhã imediatamente após a coleta de sangue. Nenhum outro procedimento do trabalho confere qualquer outro risco a você.

Seu sangue será usado para análise de genes e de outras substâncias no sangue. Para essas análises, seu sangue será enviado para o laboratório de pesquisa do Instituto de Pesquisa em Saúde da Nestlé (NIHS) na cidade de *Lausanne*, na Suíça e, se necessário, para outros laboratórios externos ligados ao NIHS. No primeiro dia da pesquisa você receberá um número e todos os pesquisadores envolvidos com as dosagens de sangue (NACIONAIS E ESTRANGEIROS) passarão a reconhecer você apenas por esse número e não pelo nome.

Você deverá usar um bracelete que mede o número de passos, a atividade física e o gasto energético da pessoa. Veja a ilustração abaixo. Esse bracelete chama-se “BodyBugg” e não confere desconforto ou qualquer risco a você. Esse bracelete será fornecido pelos pesquisadores e deverá ser usado durante três dias determinados pelo pesquisador. Além disso, o número exato de passos que você dará no dia será medido, durante 8 horas diárias por 7 dias, através de um aparelhinho que pode ser colocado no seu bolso chamado “pedômetro”. Os pesquisadores lhe fornecerão esse aparelhinho também.

Figura: BodyBug para avaliação da atividade física

Você terá toda a garantia de esclarecimento a respeito da pesquisa, a qualquer momento que precisar. Para isso, você, bem como seus responsáveis, poderão entrar em contato direto com as pesquisadoras JACQUELINE PONTES MONTEIRO (FONE: 16 9154 88 93) e ROBERTA GARCIA SALOMÃO (FONE: 16 9128 0494), além de poder contatar o comitê de ética em pesquisa do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, de 8:30hs até 17:00hs, de segunda-feira a sexta-feira, caso julgar necessário (FONE: 16 3602-2228; ENDEREÇO: Av. Bandeirantes sem número. Hospital das Clínicas, andar térreo. Campus USP).

Você também terá a liberdade para se recusar a participar da pesquisa ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma.

O benefício desta pesquisa está no fato de que você receberá uma orientação sobre a sua dieta (4 cardápios semanais com substitutos de alimentos), mais adequada à sua realidade. Estes cardápios personalizados só poderão ser entregues após o término de todos os exames de sangue e de todas as análises destes resultados. Além disso, você e seus familiares receberão orientação nutricional geral (BOAS PRÁTICAS DE ALIMENTAÇÃO). Esta última, poderá ser entregue para você e para toda a família, já à partir do final da coleta dos dados.

Não está previsto qualquer dano ou complicação a você decorrentes da pesquisa.

Assinale abaixo caso você concorde em ser contatado mais tarde para participar de outras pesquisas.

- Concordo em ser contatado mais tarde para participar em outras pesquisas ().
- Não concordo em ser contatado mais tarde para participar em outras pesquisas ().

PARA VOCÊ ENTENDER MELHOR O QUE ESTAMOS PROPONDO VAMOS CONTAR COMO SERÁ SUA PARTICIPAÇÃO NO PROJETO

VEJA AS FIGURAS ABAIXO:

Avaliação do
Pediatra

Coleta de sangue

Café da manhã

Pesar
e
medir

Circunferência da cintura

Responder questionários

Impedância

Comer a barrinha de leite
por 6 semanas

Usar BodyBugg por 3 dias e
pedômetro por 7 dias

EU _____ abaixo assinado,
_____, confirmo ter recebido

todas as informações sobre a pesquisa a ser desenvolvida e estou ciente de como vou participar. Estou de acordo em participar. Eu tive tempo suficiente para tomar minha decisão. Eu fui informado, pelo pesquisador abaixo, verbalmente ou por escrito sobre os objetivos do estudo bem como sobre os benefícios e desvantagens. Eu estou participando desta pesquisa por livre e espontânea vontade. Eu posso voltar atrás na minha decisão em consentir a minha participação nesta pesquisa a qualquer momento, sem ter que dar uma explicação e sem ser submetido a qualquer consequência desagradável.

Participante da Pesquisa (criança ou adolescente)

Ribeirão Preto, _____ (data)

Declaração do Investigador: Eu, abaixo assinado, certifico que expliquei à criança ou adolescente, voluntário da pesquisa, a natureza, a significância e os objetivos deste estudo. Eu declaro que tenho cumprido com todas as obrigações relacionadas a este ensaio clínico.

Roberta Garcia Salomão

Ribeirão Preto, _____ (data)

Jacqueline Pontes Monteiro

Ribeirão Preto, _____ (data)

ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para os Pais

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PUERICULTURA E PEDIATRIA

Av. Bandeirantes, 3900. Cep 14049-900 – Ribeirão Preto – SP
Telefone: (16) 3602-2573 - FAX: (16) 3602-2700

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA OS PAIS

Eu, PROFESSORA DOUTORA JACQUELINE PONTES MONTEIRO e a Nutricionista ROBERTA GARCIA SALOMÃO, pesquisadoras do Departamento de Puericultura e Pediatria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP-SP), estamos desenvolvendo a pesquisa intitulada **“Nova estratégia para analisar interações gene-nutriente em crianças e adolescentes”** e estamos convidando seu filho (a) a participar deste trabalho.

A obesidade e suas complicações são causadas pelo excesso da ingestão de calorias, mas também a baixa ingestão de vitaminas e minerais pode determinar o aparecimento de doenças associadas à obesidade. Nós achamos que a suplementação de vitaminas e alguns minerais (substâncias vitais para o nosso organismo) irá melhorar a condição nutricional de crianças e adolescentes por aumentar substâncias chamadas S-adenosilmetionina (SAM) e S-adenosilhomocisteína (SAH) no sangue. Os níveis dessas substâncias no sangue de seu (sua) filho (a) podem estar associados à condição de saúde ou doença, inclusive a obesidade. Também achamos que os diferentes níveis dessas substâncias (SAM e SAH) estão associados às diferentes variações genéticas (diferenças nos genes de cada indivíduo). O que são genes? São pequenas estruturas no nosso corpo que definem nossa aparência e nossa condição de saúde e de doença. Ou seja, somos o que somos por causa da interação entre estas estruturas internas com o meio em que vivemos. A importância destes achados está no fato de que indivíduos com diferentes genes irão necessitar de diferentes orientações sobre alimentação para obterem melhores condições de saúde, ou seja, seu (sua) filho (a) receberá uma orientação sobre a alimentação mais adequada para ele (a). Essa pesquisa se justifica por que cada indivíduo responde diferentemente a um tratamento nutricional, conforme as interações entre gene e o meio ambiente em que vive. Exemplo: pessoas obesas respondem diferentemente a uma intervenção nutricional; umas emagrecem muito facilmente, enquanto outras têm uma enorme dificuldade para emagrecer. Dessa forma, com os resultados dessa pesquisa pretendemos descobrir em que grupo de resposta (valores de SAM e SAH) seu (sua) filho (a) se encontra, para melhor orientarmos sua alimentação.

Diante disso, essa pesquisa tem como objetivos:

(1) analisar a resposta da razão SAM/SAH à suplementação de um conjunto de vitaminas e minerais (barrinha de leite da Nestlé - 5 gramas - suplementada com vitaminas e minerais) em indivíduos. Essa barrinha de leite (2 barrinhas para crianças entre 9 e 11 anos e 3 barrinhas para aqueles com idade igual ou superior a 12 anos) deverão ser entregues nos colégios dos participantes, antes do início das aulas e deverão ser comidas imediatamente após a entrega das mesmas, condição **IMPORTANTE** para a participação neste estudo. Cada participante receberá as barrinhas de leite por pesquisadores estrategicamente posicionados em frente às escolas e em um carro de apoio à pesquisa, a fim de não constranger ou expor seu (sua) filho (a) no ambiente

escolar. Cada participante deverá ingerir as barrinhas durante 6 semanas, apenas durante os 5 dias letivos. Aos sábados, domingos e feriados, os participantes não receberão as barrinhas.

(2) analisar variações genéticas no DNA e associar à resposta determinada pela razão SAM/SAH. Para isso, não procuraremos especificamente um gene, mas qualquer diferença genética que tenha relação com a resposta acima.

(3) Avaliar a ingestão de energia e nutrientes através da aplicação de recordatórios de 24 horas (perguntaremos a seu (sua) filho (a) o que comeu e bebeu no dia anterior) e questionários de frequência alimentar para crianças e adolescentes. Estes resultados serão utilizados para avaliação da ingestão habitual de energia, proteínas, gorduras, açúcares, vitaminas e minerais para que possamos achar possíveis alterações na dieta habitual que possam interferir nos resultados.

(4) verificar como as proteínas e outras substâncias, tais como vitaminas e lipídios, no sangue de seu (sua) filho (a) respondem à suplementação de vitaminas e minerais. O que são proteínas? Conjunto de pequenas estruturas corporais que são responsáveis pela estrutura, defesa e transporte no seu corpo. O que são lipídios? São as gorduras no sangue.

(5) separar os participantes do estudo em diferentes grupos, conforme os níveis de SAM e SAH e associar esses grupos com os resultados genéticos e de metabólitos no sangue. Dessa forma poderemos orientar quais são os alimentos que devem ser mais ingeridos e quais são aqueles que devem ser menos ingeridos, para ter melhor saúde.

A coleta de dados acontecerá em 3 momentos diferentes na unidade da Casa 5 do Curso de Nutrição e Metabolismo, na rua das Paineiras no Campus da USP em Ribeirão Preto:

- Momento 1: antes da suplementação
- Momento 2: após 6 semanas de suplementação
- Momento 3: após mais 6 semanas SEM a suplementação

Em cada um destes momentos o participante receberá ajuda de custo para pagar transporte (ida e volta) até o local da coleta e almoço do participante e de seu representante legal. Em cada um dos momentos os participantes terão seu sangue colhido: 12 ml no momento 1 (4 colheres de sopa cheias) e 9 ml nos momentos 2 e 3 (aproximadamente 3 colheres de sopa cheias); terão o peso, a altura e a circunferência da cintura medidos, assim como avaliação simples da quantidade das gordura do corpo através de um aparelho chamado impedância bioelétrica, sem qualquer risco, desconforto ou dor; e responderão a questionários sobre a alimentação usual, sobre a atividade física e sobre a condição econômica. O seu (sua) filho (a) poderá ser auxiliado por você, no preenchimento dos questionários. **O tempo previsto para toda a coleta de dados em cada momento é de 2 a 3 horas no total.**

Crianças e adolescentes, além da ajuda dos pais ou responsáveis responderão as perguntas sobre hábitos alimentares com a ajuda de um álbum fotográfico com o tamanho das porções de cada alimento. Dessa forma, será possível indicar a foto que mais se parece com a quantidade ingerida pelo participante. Na semana que antecede cada coleta de sangue os participantes serão procurados pelos pesquisadores para responderem a 3 recordatórios de 24 horas (o que você comeu ou bebeu no dia anterior).

A coleta de sangue será feita por pessoal capacitado para essa função e o risco é mínimo (**Riscos: A coleta de sangue tem risco mínimo**). Em alguns casos verifica-se pequena luxação no local da coleta de sangue. Estas amostras serão coletadas após um jejum de pelo menos 6 horas. Será fornecido café de manhã

imediatamente após a coleta de sangue. Nenhum outro procedimento do trabalho confere qualquer outro risco a seu (sua) filho (a).

Com o objetivo de medir o número de passos, a atividade física e o gasto energético de seu filho (a), cada participante deverá usar um bracelete durante três dias. Veja a ilustração abaixo. Esse bracelete é chamado BodyBugg®, será fornecido pelos pesquisadores e não confere desconforto ou qualquer risco ao indivíduo.

Figura: BodyBugg para avaliação da atividade física

Sua criança terá toda a garantia de esclarecimento a respeito da pesquisa, a qualquer momento que precisar. Para isso, sua criança, bem como os responsáveis legais, poderão entrar em contato direto com as pesquisadoras JACQUELINE PONTES MONTEIRO (FONE: 16 9154 88 93) e ROBERTA GARCIA SALOMÃO (FONE: 16 9128 0494), além de poder contatar o comitê de ética em pesquisa do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, de 8:30hs até 17:00hs, de segunda-feira a sexta-feira, caso julgar necessário (FONE: 16 3602-2228; ENDEREÇO: Av. Bandeirantes sem número. Hospital das Clínicas, andar térreo. Campus USP).

As amostras de sangue serão enviadas para análise da genotipagem (pesquisa de variações genéticas) e dos metabólitos (vitaminas, proteínas, gorduras) para o laboratório de pesquisa do Instituto de Pesquisa em Saúde da Nestlé (NIHS) na cidade de *Lausanne*, na Suíça. Caso seja necessário, para análises específicas, tais como análises de proteínas e lipídios, as amostras também poderão ser encaminhadas para outros laboratórios externos ligados ao NIHS. Isso se deve ao fato de que estes laboratórios estão altamente capacitados para analisar todas as amostras e estão, em conjunto com a Professora Dra. Jacqueline Pontes Monteiro, coordenando essa pesquisa. Após o término de todas as análises para o presente projeto, todas as amostras de seu (sua) filho (a) serão descartadas, respeitando-se as normas vigentes de órgãos técnicos competentes, a confidencialidade e a autonomia dos participantes. Os dados genéticos de seu (sua) filho (a) não serão divulgados e nem ficarão acessíveis a terceiros. A duração desta pesquisa, desde a coleta dos dados até as análises dos resultados pode durar até 3 anos.

IMPORTANTE: Seu (sua) filho (a) tem garantia de sigilo, que assegure a sua privacidade, e os resultados serão publicados, sem que em nenhum momento seja divulgada a identidade de seu (sua) filho (a). Cada participante receberá um número, no primeiro dia de pesquisa, e todos os pesquisadores envolvidos com as dosagens de sangue (NACIONAIS E ESTRANGEIROS) passarão a reconhecer seu (sua) filho (a) apenas por esse número e não pelo nome. Cada participante terá a opção de escolher entre ser informado ou não sobre resultados de seus exames bem como pode ter acesso a seus dados genéticos, assim como tem o direito de retirá-los de bancos onde se encontrem armazenados a qualquer momento. Todos os resultados serão digitados em um banco de dados e a identidade de seu (sua) filho (a) será substituída por um número. Apenas a

coordenadora local (Profa. Dra. Jacqueline Pontes Monteiro), terá acesso ao número que está associado ao nome, para que ela possa descobrir em que grupo de resposta seu (sua) filho (a) se encontra, para fornecer a orientação nutricional individualizada.

Seu (sua) filho (a) também terá a liberdade para se recusar a participar da pesquisa ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma.

O benefício desta pesquisa está no fato de que indivíduos com diferentes padrões de variação genética irão necessitar de diferentes orientações sobre alimentação para obterem melhores condições de saúde, ou seja, sua criança receberá uma orientação sobre a sua dieta (4 cardápios semanais com substitutos de alimentos), mais adequada à sua realidade. Estes cardápios personalizados só poderão ser entregues após o término de todos os exames de sangue e de todas as análises destes resultados. Além disso, você e sua criança receberão orientação nutricional geral (BOAS PRÁTICAS DE ALIMENTAÇÃO). Esta última, poderá ser entregue para toda a família, já à partir do final da coleta dos dados. A fim de acompanharmos melhor o estilo de vida e possíveis alterações que possam interferir nos resultados, visitas domiciliares deverão ocorrer (4 visitas no total, entre 17 e 18hs e visitas adicionais em caso de seu filho (a) faltar na escola e de termos que entregar a barrinha de leite na sua residência).

Não está previsto qualquer dano ou complicação a seu (sua) filho (a) decorrentes da pesquisa. Um pediatra estará no local da pesquisa durante toda a coleta de dados, caso seja necessário. Entretanto, se a sua criança sentir que sofreu qualquer dano a si mesmo por ter participado da pesquisa, o pesquisador principal, a Instituição e o patrocinador assumem a responsabilidade de dar assistência integral e prover indenização determinada por direito, caso assim seja judicialmente estabelecido.

Assinale abaixo caso você concorde em ser contatado mais tarde para permitir a participação de seu (sua) filho (a) em outras pesquisas.

Concordo em ser contatado mais tarde para permitir a participação de meu (minha) filho (a) em outras pesquisas ().

Não concordo em ser contatado mais tarde para permitir a participação de meu (minha) filho (a) em outras pesquisas ().

EU _____,

RG: _____, abaixo assinado, responsável por _____, confirmo que:

- Li e entendi todas as informações contidas neste TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA OS PAIS a mim fornecido e que estou consciente dos meus direitos.
- Eu recebi, de forma satisfatória, todas as respostas às minhas perguntas no que diz respeito à participação de meu (minha) filho (a) nesta pesquisa.
- Eu tive tempo suficiente para tomar a minha decisão.
- Eu fui informado de que indenização será dada, em caso de dano ao meu filho (a) considerado relacionado a este estudo.

- Eu estou consciente de que os dados pessoais de meu (minha) filho (a) serão enviados e processados, na condição de anonimato, para Instituição Internacional a fim de alcançar os objetivos da pesquisa. Eu concordo que os pesquisadores do estudo, bem como autoridades e membros do comitê de ética vejam todos os dados de nosso (a) filho (a) para exame e verificação desde que os dados de meu (minha) filho (a) permaneçam em confidencialidade.
- Eu concordo que meu filho (a) forneça amostras biológicas necessárias para este estudo. Eu confirmo que tenho sido informado (a) de que os dados derivados deste estudo e as amostras biológicas coletadas serão usadas para pesquisa científica que pode resultar, quando aplicável, em publicações e desenvolvimento de produtos. Quando os resultados do estudo forem publicados, os dados serão divulgados com estrita confidencialidade e a identidade de meu (minha) filho (a) nunca será revelada.
- Nós tomamos a decisão em permitir a participação de nosso (a) filho (a) neste estudo por livre e espontânea vontade.
- Eu autorizo a participação de meu (minha) filho (a).
- Eu posso voltar atrás na minha decisão em consentir a participação do meu (minha) filho (a) nesta pesquisa a qualquer momento, sem ter que dar uma explicação e sem ser submetido a qualquer consequência desagradável.

Responsável legal

Ribeirão Preto, _____ (data).

Declaração do Investigador: Eu, abaixo assinado, certifico que expliquei aos pais, ou responsáveis legais do voluntário da pesquisa, a natureza, a significância e os objetivos deste estudo. Eu declaro que tenho cumprido com todas as obrigações relacionadas a este ensaio clínico. Se eu me tornar conhecedor, em qualquer momento durante este estudo, de informação que possa afetar o consentimento dos pais ou responsáveis legais do voluntário da pesquisa no que diz respeito à sua participação, eu concordo em informá-los imediatamente.

Roberta Garcia Salomão

Ribeirão Preto, _____ (data)

Jacqueline Pontes Monteiro

Ribeirão Preto, _____ (data)

ANEXO C - Questionário de Frequência de Consumo Alimentar

Nome / Número de Identificação:

Idade:

Sexo: (1) masculino

(2) feminino

Grupo do leite e derivados	Quantas vezes você come N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	Unidade 1 2 3 D S M	P25 P(1)	P50 M(2)	P75 G(3)	CODIF.
Leite integral	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	200 ml -----	240ml -----	250ml	
Leite desnatado	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	200 ml -----	240ml -----	250ml	
iogurte natural Integral	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	80ml -----	120ml -----	140ml	
iogurte com frutas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	80ml -----	120ml -----	140ml	
Queijo fresco ou ricota	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	15g -----	20g -----	25g	
Queijos amarelos	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	10g -----	15g -----	25g	
Requeijão	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	10g -----	15g -----	30g	
Grupo dos pães e cereais matinais	Quantas vezes você come N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	Unidade 1 2 3 D S M	P25 P(1)	P50 M(2)	P75 G(3)	CODIF.
Pão francês, forma, outros	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	25 g -----	50g -----	75g	
Pão doce, queijo,	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	25 g -----	50g -----	60g	

croissant				
Biscoitos doces/ salgados ou torradas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	30 g ----- 52g ----- 65g	
Aveia, granola, barra de cereais e sucrilhos	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	20g -----38g ----- 40g	
Gorduras	Quantas vezes você come	Unidade 1 2 3	P25 P50 P75 P(1) M(2) G(3)	CODIF.
Margarina comum	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	4 g ----- 6g ----- 10g	
Manteiga	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	4 g ----- 6g ----- 8,5g	
Maionese	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	12g ----- 27g ----- 35g	
Cereais. Tubérculos e massas	Quantas vezes você come		P25 P50 P75 P(1) M(2) G(3)	CODIF.
Arroz branco	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	60g ----- 75g ----- 100g	
Batata, Mandioca Polenta fritas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	50g ----- 65g ----- 112g	
Batata, MandiocaPo lenta (não fritos)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	30 g ----- 50g ----- 100 g	
Milho Verde	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	48g ----- 66g ----- 103g	
Massas: macarrão, lasanha,	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	100g.----- 125g ----- 200g	

nhoque				
Salgados e tortas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	48g ----- 80g ----- 96g	
Pizza	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	55g ----- 125g ----- 180g	
Farofa, farinha de milho	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	15g ----- 20g ----- 30g	
Grupo das frutas	Quantas vezes você come	Unidade 1 2 3	P25 P50 P75 P(1) M(2) G(3)	CODIF.
Laranja, mixirica, pokan	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	90g ----- 107g ----- 180g	
Banana	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	40g ----- 65g ----- 120g	
Maçã, pêra	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	60g ----- 80g ----- 110g	
Mamão, papaya	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	100g ----- 117g ----- 135g	
Melancia, Melão	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	81g ----- 132g ----- 150g	
Uva/ abacaxi/ goiaba na época	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	95g ----- 116g ----- 170g	
Manga, caqui, na época	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	20g ----- 40g ----- 60g	
Outras frutas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	10g ----- 25g ----- 60g	
Suco de laranja natural	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	165ml ----- 200ml ----- 250ml	
Suco de outras frutas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	165 ml ----- 200ml ----- 250ml	

Grupo das leguminosas	Quantas vezes você come		P25 P(1)	P50 M(2)	P75 G(3)	CODIF.
Feijão roxo, carioca	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	34g -----	65g -----	70g	
Feijoada	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	55g -----	140g -----	225g	
Grupo de verduras/ legumes	Quantas vezes você come	Unidade 1 2 3	P25 P(1)	P50 M(2)	P75 G(3)	CODIF.
Alface, escarola, agrião, rúcula, almeirão	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	20g -----	35g -----	40g	
Repolho/ acelga/ couve/ espinafre	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	23,5g -----	33g -----	50g	
Couve-flor/ brócolis	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	25g -----	32g -----	56g	
Cenoura/ abóbora	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	11g -----	20g -----	30g	
Tomate	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	30g -----	37g -----	44g	
Berinjela	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	20g -----	30g -----	62,5g	
Beterraba	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	18g -----	30g -----	48g	
Vagem, chuchu, abobrinha	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	12,5g -----	25g -----	40g	
Sopas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	182g -----	290g -----	325g	
Grupo das carnes e ovos	Quantas vezes você come	Unidade 1 2 3	P25 P(1)	P50 M(2)	P75 G(3)	CODIF.

Carne bovina sem gordura	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	50g ----- 80g ----- 100g	
Carne bovina com gordura	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	50g ----- 80g ----- 100g	
Carne de Porco s/ Gordura	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	50g ----- 80g ----- 100g	
Carne de Porco c/ Gordura	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	50g ----- 80g ----- 100g	
Carne de frango ou de outras aves sem pele	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	46g ----- 90g ----- 125g	
Carne de frango ou de outras aves com pele	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	46g ----- 90g ----- 125g	
Peixes	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	50g ----- 100g ----- 165g	
Lingüiça, salsicha	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	50g ----- 60g ----- 120g	
Ovo cozido	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	25g ----- 50g ----- 75g	
Ovo frito	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	25g ----- 62g ----- 90g	
Presunto, mortadela	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	10g ----- 15g ----- 25g	
Grupo das bebidas	Quantas vezes você come	Unidade 1 2 3	P25 P50 P75 P(1) M(2) G(3)	CODIF.
Café com açúcar	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	50ml ----- 100ml	
Chá preto ou mate	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	85ml ----- 165ml ----- 200ml	
Chá de	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	85ml ----- 165ml ----- 200ml	

ervas				
Água	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	165ml ----- 200ml ----- 240ml	
Sucos artificiais	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	165ml ----- 200ml ----- 240ml	
Refrigerante diet	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	100ml ----- 165ml ----- 250ml	
Refrigerante normal	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	165ml.----- 200ml ----- 240ml	
Refrigerante fosfatado	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	165ml.----- 200ml ----- 240ml	
Grupo de doces e miscelâneas	Quantas vezes você come	Unidade 1 2 3	P25 P50 P75 P(1) M(2) G(3)	CODIF.
Bolo, tortas, pavês	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	30g ----- 50g ----- 60g	
Chocolate ou brigadeiro	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	20g ----- 30g ----- 42g	
Mel ou geléia	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	9g ----- 13,5g ----- 18g	
Sorvetes, milk-shake	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	70g ----- 115g ----- 160g	
Pudins, doces com leite	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	50g ----- 65g ----- 80g	
Doces de frutas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	30g ----- 40g ----- 55g	
Pipoca, Chips, outros	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	20g ----- 50g ----- 75g	
Açúcar	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	12g ----- 24g ----- 48g	

Achocola- tado	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	4g ----- 8g ----- 16g	
-------------------	------------------------	-------	-----------------------	--

1)	Quantas vezes você come	Unidade	CODIF
Com que frequência você usa gordura ou óleo no preparo de suas refeições?	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	
Quantas porções de vegetais (verduras e legumes) você costuma comer, sem incluir batatas ou saladas de maionese?	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	
Quantas porções de frutas você costuma comer, sem incluir sucos de frutas?	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	

2) Por favor, informe qualquer outro alimento ou preparação que você costuma comer ou beber e que não tenha sido citado aqui

Alimento	Frequência	Quantidade Consumida		Código do alimento	Codificação
				--- ---	--- --- ---
				--- ---	--- --- ---
				--- ---	--- --- ---

3) Quantas refeições você faz por dia? __ __

4) Que tipo de óleo/gordura você costuma usar no cozimento/preparo de refeições?

(00) Não usa	(04) Óleo de soja/milho/outros
(01) Margarina	(05) Bacon
(02) Manteiga	(06) Banha
(03) Azeite de oliva	(99) Não sabe/não cozinha

5) **a)** Quando você come carne de boi/vaca ou de porco, você costuma comer a gordura visível?

(1) Nunca/raramente	(2) Algumas vezes	(3) Sempre

b) Quando você come carne de frango, costuma comer a pele?

(1) Nunca/raramente	(2) Algumas vezes	(3) Sempre

6) Você costuma acrescentar sal na comida depois de pronta?

(1) Nunca/raramente (2)Algumas vezes (3) Sempre

7) Quando você come queijo/requeijão, iogurte/sorvete, maionese/molhos para salada, com que frequência esses alimentos são do tipo light?

- Iogurte/sorvete (1) Sempre (2) Algumas vezes (3)raramente ou não come
(9) não sabe

- Maionese/molhos (1) Sempre (2) Algumas vezes (3)raramente ou não come
(9) não sabe

- Queijo/requeijão (1) Sempre (2) Algumas vezes (3)raramente ou não come
(9) não sabe

ANEXO D - Aparelho utilizado para estimar nível de atividade física (*Body Bugg*)

ANEXO E – Análise estatística da caracterização dos indivíduos excluídos ou ausentes em comparação a população amostral

Tabela 19 – Caracterização da população amostral e dos indivíduos ausentes ou excluídos das análises.

	População amostral (n = 120)	Indivíduos excluídos ou ausentes (n = 21)	p*
Idade (anos)	11,41 ± 1,09	11,33 ± 1,15	0,518
Sexo (n / %)			0,421
Masculino	54 (45,0%)	7 (33,3%)	
Feminino	66 (55,0%)	14 (66,7%)	
Estadiamento puberal (n / %)			0,484
1	12 (10,0%)	2 (9,5%)	
2	51 (42,5%)	10 (47,6%)	
3	40 (33,3%)	8 (38,1%)	
4	13 (10,8%)	1 (4,8%)	
5	4 (3,3%)	0 (0,0%)	
MET	2,42 ± 0,53	2,39 ± 0,60	0,896
<i>Tail Moment</i>	4,78 ± 2,46	4,60 ± 2,04	0,751
<i>Tail Intensity (%)</i>	10,32 ± 4,35	10,14 ± 4,41	0,874

MET: equivalente metabólico, ≤ 1,4: sedentário, 1,5 a 2,9: atividade física leve, 3,0 a 5,9: atividade física moderada, ≥ 6,0: atividade física vigorosa. Classificação do estadiamento puberal segundo Tanner (1962). *Teste T *Student* e Qui-quadrado.

Tabela 20 – Estado nutricional segundo IMC/idade dos grupos divididos de acordo com escala de classificação de dano de DNA

Classificação de IMC/idade*	População amostral (n = 120)	Indivíduos excluídos ou ausentes (n = 21)
< percentil 3	4 (3,3%)	2 (9,5%)
Entre percentil 3 e percentil 15	9 (7,5%)	0 (0,0%)
Entre percentil 15 e percentil 85	51 (42,5%)	7 (33,3%)
Entre percentil 85 e percentil 97	27 (22,5%)	6 (28,6%)
> percentil 97	29 (24,2%)	6 (28,6%)

*Classificação do índice de massa corporal por idade segundo curvas de crescimento da OMS (2007) de 5 a 19 anos. < p3: magreza grave; entre percentil 3 e 15: magreza, entre percentil 15 e 85: peso adequado; entre p85 e p97: sobrepeso; > p97: obesidade. #Teste qui-quadrado $p=0,321$.

Tabela 21 – Classificação da composição corporal entre os grupos formados de acordo com escala de classificação de dano de DNA

Classificação de Porcentagem de gordura corporal/idade*#	População amostral (n = 120)	Indivíduos excluídos ou ausentes (n = 21)
< percentil 2	7 (5,8%)	0 (0,0%)
Entre percentil 2 e percentil 85	61 (50,8%)	8 (38,1%)
Entre percentil 85 e percentil 95	26 (21,6%)	7 (33,3%)
> percentil 95	26 (21,6%)	6 (28,6%)

*Classificação da porcentagem de gordura corporal por idade segundo classificação de McCarthy (2006). < p2: redução de gordura corporal; entre percentil 2 e 85: normalidade; entre percentil 85 e 95: excesso de gordura corporal; > p95: obesidade. #Teste qui-quadrado $p=0,402$.