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

TAMIRIS TREVISAN DE BARROS

Análise do perfil proteômico e sua relação com dano de DNA e dosagem sanguínea de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 de cadeia longa em crianças e adolescentes

Ribeirão Preto
2022

TAMIRIS TREVISAN DE BARROS

Análise do perfil proteômico e sua relação com dano de DNA e dosagem sanguínea de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 de cadeia longa em crianças e adolescentes

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

Área de Concentração: Nutrição

Orientadora: Profa. Dra. Jacqueline Pontes Monteiro

Ribeirão Preto
2022

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
Análise do perfil proteômico e sua relação com dano de DNA e dosagem sanguínea de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 de cadeia longa em crianças e adolescentes. Ribeirão Preto, 2022.
85 p. : 3 il.

Tese de Doutorado, 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. DHA. 4. EPA. 5. Proteômica.

Nome: Tamiris Trevisan de Barros

Título: Análise do perfil proteômico e sua relação com dano de DNA e dosagem sanguínea de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 de cadeia longa em crianças e adolescentes

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora 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 meu esposo, com amor e carinho, pelo suporte durante esta jornada, à minha orientadora, pelo apoio concedido, e a todos os excelentes profissionais que realizaram um surpreendente trabalho em equipe tornando possível a elaboração desta tese.

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.

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

Às minhas colegas, Roberta, Mariana, Carolina, Roseli, Elaine, Maria Olímpa 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 Greggi 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 Hernandes, 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.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pelo apoio ao realizar este trabalho.

Ao *Nestlé Institute os 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.

“Uma pessoa que nunca
cometeu um erro, nunca
tentou nada de novo”

(Albert Einstein)

Resumo

BARROS, T. T. **Análise do perfil proteômico e sua relação com dano de DNA e dosagem sanguínea de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 de cadeia longa em crianças e adolescentes.** 2022, 85f. Tese (Doutorado em Saúde da Criança e do Adolescente) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

O objetivo deste estudo foi explorar diferenças no perfil proteômico entre crianças e adolescentes divididos em grupos opostos de dano de DNA com diferentes nas concentrações sanguíneas de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 de cadeia longa. Metodologia: Meninos e meninas saudáveis (n = 140) de 9 a 13 anos de idade foram divididos com o teste k-means cluster em grupos opostos de dano de DNA, usando a variável tail intensity obtida por meio da técnica de eletroforese em gel de célula única (cluster 1 = 5,9% ± 1,2 e cluster 2 = 13,8% ± 3,1). Foram dosadas concentrações dos ácidos docosahexaenoico e eicosapentaenoico em eritrócitos e o perfil proteômico foi obtido pela SomaLogic Inc®. Resultados: O cluster de maior dano de DNA apresentou níveis mais baixos de DHA (5,4 ± 1,3, p = 0,003 / 6,2 ± 1,6 mg/dL) e EPA (0,5 ± 0,1 mg/dL, p <0,001 / 0,6 ± 0,2 mg/dL), e aumento da expressão das proteínas CDK8-CCNC, PIK3CA-PIK3R1, KYNU e PRKCB, que estão envolvidas em vias pró-inflamatórias. Conclusão: os resultados suportam a hipótese de que o papel protetor de ácidos graxos ômega-3 de cadeia longa contra o dano de DNA pode estar associado a expressão das proteínas CDK8-CCNC, PIK3CA-PIK3R1, KYNU e PRKCB.

Palavras-chave: Dano de DNA. C*omet assay.* Ômega-3. DHA. EPA. Inflamação. Proteômica.

Abstract

BARROS, T. T. **Analysis of proteomic profile and its relation to DNA damage DNA damage and n-3 long chain PUFA blood levels in children and adolescents.** 2022, 85f. Tese (Doutorado em Saúde da Criança e do Adolescente) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

The aim of this study was to explore differences in proteomic profiles and red blood cells levels of n-3 long chain PUFA that may be associated to DNA damage. Healthy boys and girls (n = 140) aged 9 to 13 years old in an urban area of Brazil were divided by k-means cluster test into two clusters of DNA damage (tail intensity) using the comet assay (cluster 1 = 5.9 % ± 1.2 and cluster 2 = 13.8 % ± 3.1). The cluster with higher DNA damage presented lower levels of DHA (6.2 ±1.6 mg/dL; 5.4 ±1.3, p = 0.003) and EPA (0.6 ±0.2 mg/dL; 0.5 ±0.1 mg/dL, p < 0.001), and increased expression of the proteins CDK8-CCNC, PIK3CA-PIK3R1, KYNU and PRKCB, which are involved in pro-inflammatory pathways. Our findings support the hypothesis that nutritional status regarding n-3 long chain PUFA have a protective role against DNA damage and that CDK8-CCNC, PIK3CA-PIK3R1, KYNU and PRKCB are differently expressed in clusters of DNA damage. The aim of this study was to explore differences in proteomic profiles and red blood cells levels of n-3 long chain PUFA that may be associated to DNA damage. Healthy boys and girls (n = 140) aged 9 to 13 years old in an urban area of Brazil were divided by k-means cluster test into two clusters of DNA damage (tail intensity) using the comet assay (cluster 1 = 5.9 % ± 1.2 and cluster 2 = 13.8 % ± 3.1). The cluster with higher DNA damage presented lower levels of DHA (6.2 ±1.6 mg/dL; 5.4 ±1.3, p = 0.003) and EPA (0.6 ±0.2 mg/dL; 0.5 ±0.1 mg/dL, p < 0.001), and increased expression of the proteins CDK8-CCNC, PIK3CA-PIK3R1, KYNU and PRKCB, which are involved in pro-inflammatory pathways. Our findings support the hypothesis that nutritional status regarding n-3 long chain PUFA have a protective role against DNA damage and that CDK8-CCNC, PIK3CA-PIK3R1, KYNU and PRKCB are differently expressed in clusters of DNA damage.

Keywords: DNA damage. Comet assay. Omega-3. DHA. EPA. Inflammation. Proteomic.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Dano oxidativo do DNA por eletroforese em gel de célula única (comet assay) 24

Figura 2 – Estrutura dos ácidos graxos ômega 3 e representação da transformação do ALA em EPA e DHA 26

Figura 3. Heatmap representando a associação entre dano de DNA e concentrações de n-3 LCPUFA entre os cluster 40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Caracterização da população do estudo 37

Tabela 2 – Estado nutricional da população do estudo segundo IMC/idade 38

Tabela 3 - Caracterização dos clusters de dano de DNA 38

Tabela 4 - Estado nutricional, ingestão calórica e colesterol total dos clusters de dano de DNA 39

Tabela 5 - Concentrações de EPA e DHA nos clusters de dano de DNA 39

Tabela 6 – Descrição das proteínas selecionadas 41

Tabela 7 – Concentrações de proteínas nos clusters de dano de DNA 47

Tabela 8 – Modelos da Análise de Regressão Múltipla que explicam a relação entre dano de DNA e proteínas 48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALA	Ácido Alfa-linolênico
ANCOVA	Análise de Covariância
CDK8	Quinase Dependente de Ciclina 8
CCNC	Ciclina C
DHA	Ácido Docosahexaenoico
EPA	Ácido Eicosapentaenoico
IMC	Índice de Massa Corporal
KYN	Quinurenina
KYNU	Quinureninase
LCPUFA	Ácido Graxo Poli-insaturado de Cadeia Longa
LPS	Lipopolissacarídeos
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NF-kB	Fator Nuclear kappa B
OMS	Organização Mundial de Saúde
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PIK3CA	Subunidade Catalítica Alfa da Fosfatidilinositol 3-quinase
PIK3R1	Subunidade Catalítica Alfa da Fosfatidilinositol 3-quinase
PKC	Proteína Quinase C
PRKCB	Proteína Quinase C Beta
QFA	Questionário de Frequência Alimentar
TACO	Tabela Brasileira de Composição de Alimentos

SUMÁRIO

1. Introdução 23

1.1. Dano de DNA 23

1.2. Ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 25

2. Objetivos 28

2.1. Objetivo geral 28

2.2. Objetivos específicos 28

3. Casuística e métodos 29

3.1. Seleção dos Participantes 29

3.1.1. Critérios de Inclusão 29

3.1.2. Critérios de Exclusão 30

3.1.3. Indivíduos Estudados 30

3.2. Delineamento do Estudo 30

3.3. Coleta de Dados 30

3.3.1. Procedimentos Clínicos e Testes Laboratoriais 31

3.3.1.1. Análises laboratoriais 32

3.3.2. Antropometria 34

3.3.4. Análise da Ingestão Alimentar Habitual 34

3.4. Análise Estatística 35

4. Resultados 37

4.1. Caracterização da população amostral 37

4.2. Resultados por cluster de dano de DNA 38

4.3. Análise de proteômica 40

5. Discussão 49

6. Conclusão 55

REFERÊNCIAS 56

ANEXOS 64

1. Introdução

Avanços recentes nas ciências ômicas tem permitido o estudo mais profundo de processos metabólicos em sistemas biológicos, contribuindo para a aproximação do que é chamado medicina personalizada (CORELLA; ORDOVÁS, 2018; PISABARRO, 2006; RAMÍREZ DE PEÑA; MARTÍN, 2014). Tais progressos metodológicos ainda contribuem para o desenvolvimento da nutrição de precisão, por meio da avaliação de big data em genômica, metabolômica, proteômica entre outras análises computacionais. O principal destaque dessas abordagens é a identificação e validação de biomarcadores envolvidos em processos moleculares que podem ser alterados por meio da nutrição (CORELLA; ORDOVÁS, 2018).

Nutrientes, isolada ou sinergicamente, exercem influência em diversos mecanismos biológicos, incluindo a expressão proteica (KUSSMANN; PANCHAUD; AFFOLTER, 2010). Estudos com proteômica tem contribuído para a elucidação de interações entre nutrientes e expressão gênica, levando a um melhor entendimento do papel da nutrição na manutenção e promoção da saúde (KUSSMANN; PANCHAUD; AFFOLTER, 2010). De forma mais detalhada, tais interações podem, por exemplo, afetar processos como a regulação do ciclo celular, impedindo a reprodução de células que sofreram algum tipo de dano ou mutação no DNA (FENECH, 2017).

1.1. Dano de DNA

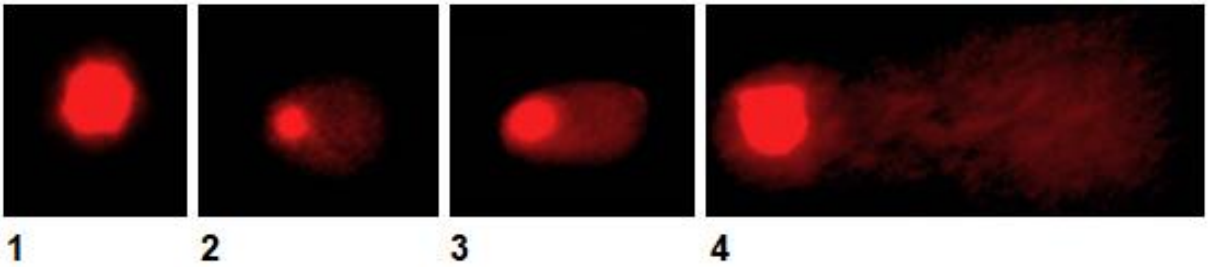
Danos no DNA são causados por diversos fatores, que podem ser intrínsecos ao metabolismo celular, como a geração de espécies reativas de oxigênio, produtos de reações moleculares, ou externos tais como a radiação causada pela exposição solar ou radicais livres oriundos de poluentes ambientais (EVANS; DIZDAROGLU; COOKE, 2004; KRYSTON et al., 2011; SLYSKOVA et al., 2014). Estes agressores podem levar a oxidação de bases, deleção de bases, ligação cruzada de bases, ruptura de fita dupla ou única do DNA sendo estas as lesões mais comumente encontradas (COOKE; OLINSKI; EVANS, 2006; KRYSTON et al., 2011; O'HAGAN, 2014; SLYSKOVA et al., 2014; WASSON; MCKELVEY-MARTIN; DOWNES, 2008).

A aferição do dano de DNA pode ser realizada por meio de diferentes técnicas atualmente existentes. O teste do micronúcleo, dosagem de biomarcadores de dano

de DNA, como a 8-hidroxideoxi-2-guanosina (8-OHdG), utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a eletroforese em gel de célula única são algumas das técnicas metodológicas mais empregadas em estudos científicos para mensurar o dando de DNA (KRYSTON et al., 2011).

A eletroforeses em gel de célula única, também conhecida como *comet assay* ou ensaio do cometa, descrita primeiramente por Ostling e Johanson em 1984 (OSTLING; JOHANSON, 1984), consiste em submeter uma amostra de fluido ou tecido biológico à eletroforese, onde fragmentos de DNA danificado se deslocam pela diferença de potencial criada, para posterior análise microscópica. Os núcleos celulares com DNA danificado se assemelham a um cometa após a eletroforese, em que sua cauda é formada pelos fragmentos do DNA lesionado que foram arrastados no processo. O comprimento e a quantidade de fragmentos na cauda determinam a quantificação do dano de DNA (Figura 1).

Figura 1 – Dano oxidativo do DNA por eletroforese em gel de célula única (*comet assay*).



Classificação de nucleoides segundo dano de DNA, em que 1 representa uma célula sem dano de DNA e 4 uma célula com dano de DNA extenso. Fonte: ARALDI et al., 2015.

A eletroforese em gel de célula única tem sido largamente empregada para a análise do dano de DNA em pesquisas científicas por ser um método de simples e rápida execução, de baixo custo, necessita de pequena quantidade de amostra e pode ser adaptado para a detecção de danos específicos (WASSON; MCKELVEY-MARTIN; DOWNES, 2008).

Lesões no DNA podem ser evitadas por meio da ação de antioxidantes que atuam amenizando o efeito prejudicial de espécies reativas de oxigênio (ROS), podem ser reparadas por meio da remoção das bases e nucleotídeos que sofreram alterações, ou a célula com DNA danificado pode sofrer apoptose programada, com o objetivo de impedir que uma mutação ocorra e que esta célula seja reproduzida, dando origem a

patologias tais como neoplasias malignas (EVANS; DIZDAROGLU; COOKE, 2004; SLYSKOVA et al., 2014).

Uma resposta eficiente ao dano de DNA visando sua reparação depende da adequada regulação do ciclo celular, por meio da ação de proteínas em reações moleculares (DEMIRBAG; YILMAZ; KOCYIGIT, 2005; EVANS; DIZDAROGLU; COOKE, 2004; FENECH, 2017; KRYSTON et al., 2011; SLYSKOVA et al., 2014). Este processo se inicia com o reconhecimento da região danificada por meio do recrutamento de complexos de sensores, como o complexo Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) e o complexo Rad9-Rad1-Hus1 relacionado ao Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA).(HUANG et al., 2020; RAI et al., 2007). Quinases dependentes de ciclinas também estão envolvidas na resposta ao dano de DNA, uma vez que atuam na regulação do ciclo celular e desempenham um papel na transcrição gênica, atuando como moduladores da resposta ao dano de DNA (CHOU et al., 2020; VON STECHOW; OLSEN, 2017). Por outro lado, proteínas pró-inflamatórias como o Fator Nuclear Kappa B (NF-κB), o Receptor Toll-like 4 (TLR4), e interleucinas pro-inflamatórias contribuem para a ocorrência de dano de DNA (ZIEGLER et al., 2020). Análises de proteômica podem ser usadas para um melhor entendimento do papel destas e outras proteínas nos mecanismos que envolvem a ocorrência e a resposta ao dano de DNA.

A relação inversa entre dano de DNA e alguns micronutrientes e antioxidantes como retinol, vitamina C, vitamina E, vitamina B12, zinco e carotenoides é bem estabelecida na literatura científica. Há uma diversa gama de estudos que demonstram o fator protetor destes nutrientes contra o dano de DNA. Lipídios também parecem desempenhar um papel significativo na proteção celular, como é o caso dos ácidos graxos ômega 3, pela sua ação anti-inflamatória, porém publicações ainda são escassas (ELIA et al., 2016).

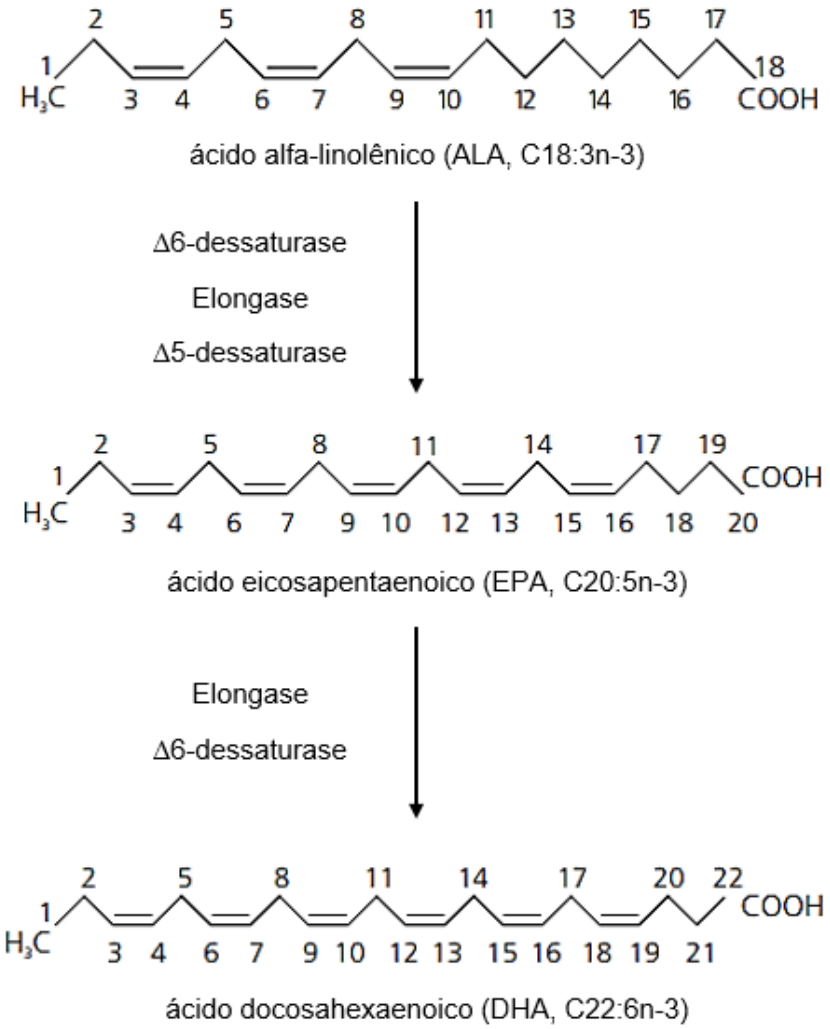
1.2. Ácidos graxos poli-insaturados ômega 3

Ácidos graxos ômega 3 são caracterizados pela presença de ligação dupla entre o terceiro e o quarto átomo de carbono da extremidade metil da cadeia (Figura 3), e podem ser monoinsaturados, com uma única ligação dupla, ou poli-insaturado com duas ou mais ligações duplas entre carbonos na cadeia (CHOLEWSKI; TOMCZYKOWA; TOMCZYK, 2018). O ácido alfa-linolênico (ALA), ácido graxo ômega 3 cuja cadeia possui 18 carbonos com 3 ligações insaturadas (C18:3n-3) é

considerado essencial por não ser produzido pelo organismo humano, portanto deve ser obtido por fontes alimentares (SAINI; KEUM, 2018).

Derivados do ALA, os ácidos graxos ômega 3 poli-insaturados de cadeia longa (n-3 LC-PUFA), eicosapentaenoico (EPA, C20:5n-3) e docosahexaenoico (DHA, C22:6n-3), são sintetizados em humanos por meio da ação de enzimas elongases e dessaturases (Figura 3), que respectivamente catalisam o alongamento da cadeia de carbono e a adição de insaturações à cadeia do ácido alfa-linolênico (SAINI; KEUM, 2018).

Figura 2 – Estrutura dos ácidos graxos ômega 3 e representação da transformação do ALA em EPA e DHA



O ácido alfa-linolênico (ALA) sofre aumento da cadeia de carbono por meio da ação de elongases e adição de insaturações à sua cadeia pelas enzimas Δ5-dessaturase e Δ6-dessaturase, dando origem aos ácidos graxos eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenoico (DHA). Fonte: PERINI et al., 2010; SAINI; KEUM, 2018

Estes ácidos graxos têm importante função biológica por serem constituintes de fosfolipídios presentes nas membranas celulares e, portanto, desempenham papel na estrutura e comportamento de células e tecidos em diversos órgãos como retina, coração, fígado e cérebro. As principais fontes alimentares de ALA são os óleos vegetais de canola e soja, oleaginosas, sementes como linhaça e chia, vegetais folhosos de coloração verde-escura e peixes. Os ácidos graxos EPA e DHA também podem ser obtidos pela alimentação, sobretudo com o consumo de peixes como atum, salmão e sardinha (SAINI; KEUM, 2018; STEFANELLO; PASQUALOTTI; PICHLER, 2019). Seu consumo está associado à prevenção de doenças cardiovasculares, inflamatórias, infecções, e contribui para a redução do declínio cognitivo no envelhecimento (STEFANELLO; PASQUALOTTI; PICHLER, 2019).

Os n-3 LCPUFA podem proteger contra o dano de DNA por sua propriedade anti-inflamatória pois estimulam a síntese de mediadores pro-resolução e reduzem a formação de eicosanoides derivados do ácido araquidônico (ARA) uma vez que seu precursor, o ácido graxo ômega 6 linoleico (AL), compete pela enzima Δ6-dessaturase com o ácido alfa-linolênico, do qual os ácidos graxos EPA e DHA são derivados (BARDEN; MAS; MORI, 2016; KAWANISHI et al., 2017; MARION-LETELLIER; SAVOYE; GHOSH, 2015; MURATA, 2018). Além disso, evidências recentes sugerem que os n-3 LCPUFA desempenham um importante papel na modulação do ciclo celular relacionado à indução da apoptose de células com DNA lesionado, impedindo a replicação de material genético danificado (NEWELL et al., 2017).

Considerando as potenciais interações entre n-3 LCPUFA, componentes de sistemas inflamatórios e o dano de DNA, formulamos a hipótese de que indivíduos com maior dano de DNA e menores concentrações de DHA e EPA apresentam perfis proteômicos distintos de indivíduos com menor dano de DNA.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral:

- Verificar se a expressão proteica e a concentração sanguínea de DHA e EPA diferem em crianças e adolescentes divididas em grupos opostos de dano de DNA

2.2. Objetivos específicos

- Determinar as concentrações de DHA e EPA em grupos opostos de dano de DNA;
- Identificar proteínas associadas à inflamação e reparo no dano de DNA;
- Determinar a concentração destas proteínas em grupos opostos de dano de DNA.

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 dados da ingestão alimentar 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 (MATHIAS et al., 2018).

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 estivessem sob dieta supervisionada e que tivessem diagnóstico prévio de doença crônica.

3.1.3. Indivíduos Estudados

Inicialmente, 150 crianças e adolescentes atenderam os critérios de inclusão 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, porventura, 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 das variáveis dano de DNA, estadiamento puberal, estado nutricional, dosagem eritrocitária de EPA e DHA e perfil proteômico em crianças e adolescentes 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 (TANNER, 1962), 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 ingestão alimentar para determinação da ingestão calórica e à coleta de sangue para dosagem do colesterol total, dos ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, DHA e EPA, para a determinação do dano de DNA e proteômica.

3.3.1. Procedimentos Clínicos e Testes Laboratoriais

Foram coletadas amostras de sangue de cada indivíduo, após jejum de 12 horas, dos quais 4 mL foram utilizados para dosagem de EPA e DHA, 2 mL para análise do dano de DNA e 2 mL análise da proteômica. A coleta de sangue foi realizada por flebotomistas treinados, o 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 enviadas para as amostras foram imediatamente centrifugadas, separadas e congeladas a -80ºC.

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 da coleta. Foi fornecido café da manhã a todos os participantes, imediatamente após a coleta de sangue e aferição dos dados antropométricos.

3.3.1.1. Análises laboratoriais

A análise bioquímica do colesterol total foi realizada imediatamente após a coleta de sangue, no laboratório do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. A análise do dano de DNA foi realizada na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP. As demais análises foram realizadas no *Nestlé Institute of Health Sciences* em Lausanne na Suíça, para onde as amostras foram encaminhadas através do World Courier® (World Courier do Brasil Transportes Internacionais Ltda, São Paulo, SP, Brasil), em um prazo de 48 horas. Os métodos utilizados para as análises laboratoriais estão descritos a seguir.

Colesterol total

O colesterol total foi dosado no plasma, por meio do método enzimático para determinação de colesterol em soro ou plasma (kit comercial Colestat enzimático AA®, linha líquida, Wiener lab. 2000 Rosario – Argentina).

Dosagens de DHA e EPA

Foi realizada a dosagem eritrocitária dos ácidos graxos poliinsaturados, EPA e DHA. 200 µL de hemácias peletizadas foram adicionadas a 200 µL de tampão de lise (NH_4Cl 82,29 mg/mL, $NaHCO_3$ 10,00 mg/mL e EDTA 292,2 mg/mL), misturados dez vezes em vórtex e então congelados a -80ºC. As amostras foram processadas de acordo com protocolo descrito por Masood et al (2005). Os ácidos graxos foram

quantificados por meio da cromatografia gás-líquido (MASOOD; STARK; SALEM, 2005).

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 (SINGH et al., 1988; TICE et al., 2000).

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 4ºC 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 4ºC 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, foi utilizada a média da variável *Tail Intensity* de 100 nucleoides de cada indivíduo, que representa a porcentagem de fragmentos de DNA danificado na cauda em relação ao tamanho total do nucleoide.

Análise da proteômica

As proteínas foram quantificadas pela SomaLogic proteomic Somascan assay versão 1® (SomaLogic Inc., 2945 Wilderness Place, Boulder, CO 80301, USA). A

técnica usa aptâmeros de DNA, estruturas formadas por ácidos nucleicos, similares em função a anticorpos monoclonais, denominados SOMAmers, que incluem uma biotina foto-clivável (PCB) e um marcador fluorescente na extremidade 5'. As proteínas se ligam fortemente ao seu respectivo e específico SOMAmer, formando um complexo que é capturado por estruturas revestidas com estreptavidina. SOMAmers não ligados são lavados e descartados. O PCB é clivado pela emissão de luz ultravioleta e os complexos proteína-SOMAmer são liberados na solução, e os aptâmeros são então quantificados, obtendo-se a quantificação das proteínas correspondentes (BRODY et al., 2010; GOLD et al., 2010). Esta análise laboratorial foi conduzida pela SomaLogic Inc. Foram realizadas buscas no banco de dados NCBI para a seleção de proteínas que conhecidamente guardam relação com inflamação e dano de DNA, sendo selecionadas 117 proteínas de um total de 1129 para o presente estudo.

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 Jellife (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 ≤ IMC < Percentil 15; peso adequado, se Percentil 15 < IMC < Percentil 85; sobrepeso, se Percentil 85 ≤ IMC < Percentil 97 e obesidade se IMC ≥ Percentil 97, conforme curvas de IMC para idade, para indivíduos de 5 a 19 anos, da OMS (2007).

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) (ANEXO C) para quantificação da ingestão calórica (FUMAGALLI, 2008). A aplicação do QFA teve como objetivo investigar a ingestão alimentar dos 30 dias à sua aplicação, informação que pôde ser transformada em consumo alimentar diário médio. 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; ROBSON, 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. Para cálculo e análise da ingestão dietética dos indivíduos estudados, foi usado o Software *DietWin*®, versão *Profissional*, 2011. Este programa contém as informações da 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 Brasileira de Composição de Alimentos (TACO).

3.4. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do programa SPSS versão 20.0. Os indivíduos foram divididos em dois grupos opostos de dano de DNA pelo método de agrupamento k-means cluster. Os testes T de Student, Mann-Whitney e qui-quadrado foram usados para avaliar diferenças na caracterização dos clusters em relação à idade, sexo, estadiamento puberal, estado nutricional e ingestão calórica. A análise de covariância (ANCOVA) foi usada para comparar resultados da proteômica entre os clusters, com ajuste para variáveis de confusão como idade, sexo, índice de massa corporal (IMC) e ingestão calórica. A análise de regressão múltipla foi usada para avaliar a força da relação entre as varáveis estudadas, criando um modelo que

inclui a variável Tail Intensity de dano de DNA, as proteínas que diferiram entre os cluster de dano de DNA, os n-3 LCPUFA e variáveis de confusão.

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. O teste qui-quadrado foi utilizado para a comparação de proporções entre os grupos.

4. Resultados

4.1. Caracterização da população amostral

Dos 141 participantes recrutados, um foi excluído da amostra por não apresentar um resultado válido de dano de DNA, totalizando 140 indivíduos estudados. Possuem idade média de 11,4 ± 1,1 anos, sendo a maioria do sexo feminino (56,4%). Em relação ao estadiamento puberal a maioria dos indivíduos se encontra entre os estágios 2 e 3 de maturação sexual segundo critério estabelecido por Tanner (1962). A caracterização dos indivíduos estudados está descrita na tabela 1.

Tabela 1 – Caracterização da população do estudo

Variáveis	n (%)
Idade (anos)	11.4 ± 1.1
Sexo	
Masculino	61 (43.6)
Feminino	79 (56.4)
Estadiamento puberal	
1	14 (10.0)
2	61 (43.6)
3	48 (34.3)
4	13 (9.3)
5	4 (2.9)

A tabela 2 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 encontra-se eutrófica (51,4%).

A avaliação do consumo alimentar dos últimos 30 dias obtida pela aplicação do QFA determinou uma ingestão calórica média de 2063,6 ± 769,9 kcal/dia. Em relação ao dano de DNA, o valor médio da variável Tail Intensity foi de 10,3% com desvio padrão 4,6%. Os indivíduos apresentaram concentrações sanguíneas médias de 0,5 ± 0,2 mg/dL de EPA e 5,7 ± 1,5 mg/dL de DHA, e colesterol total plasmático de 164,6 ± 31,0 mg/dL.

Tabela 2 – Estado nutricional da população do estudo segundo IMC/idade

Classificação de IMC/idade*		Frequência (n / %)
Entre percentil 3 e percentil 85	Eutrofia	72 (51,4%)
Entre percentil 85 e percentil 97	Sobrepeso	33 (23,6%)
> percentil 97	Obesidade	35 (25,0%)

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

4.2. Resultados por cluster de dano de DNA

Os indivíduos estudados foram divididos pelo teste estatístico k-means cluster em 2 grupos opostos de dano de DNA de acordo com valores de Tail Intensity. O cluster 1, de menor dano de DNA, formado por 62 indivíduos, apresenta um valor médio de Tail Intensity de 5,9 ± 1,2 %, enquanto o cluster 2, de maior dano de DNA, com 78 indivíduos, apresenta uma média de 13,8 ± 3,1 % ($p < 0,001$).

A caracterização dos dois grupos em relação a idade, sexo, estadiamento puberal não foram estatisticamente diferentes (Tabela 3).

Tabela 3 - Caracterização dos clusters de dano de DNA

Variável	Cluster 1 (n = 62)	Cluster 2 (n = 78)	p-valor
Idade (anos)	11,4 ± 1,1	11,4 ± 1,1	0,989[a]
Sexo (n; %)			0,728[b]
Masculino	26 (41,9)	35 (44,9)	
Feminino	36 (58,1)	43 (55,1)	
Estadiamento puberal (n; %)			0,497[b]
1	4 (6,4)	10 (12,8)	
2	29 (46,8)	32 (41,0)	
3	21 (33,9)	27 (34,6)	
4	5 (8,1)	8 (10,3)	
5	3 (4,8)	1 (1,3)	

Cluster 1: menor dano de DNA, cluster 2: maior dano de DNA. [a]Teste T de Student. [b]Teste qui-quadrado.

As variáveis de confusão estado nutricional, ingestão calórica e colesterol total também não diferiram estatisticamente entre os grupos (Tabela 4).

Tabela 4 – Estado nutricional, ingestão calórica e colesterol total dos clusters de dano de DNA

Variável	Cluster 1 (n = 62)	Cluster 2 (n = 78)	p-valor
Estado nutricional (n; %)[a]			0,332[b]
Eutrófico	29 (46,8)	43 (55,1)	
Sobrepeso	19 (30,6)	14 (17,9)	
Obesidade	14 (22,6)	21 (26,9)	
Ingestão calórica (kcal/dia)	2061,6 ± 664,5	2065,2 ± 848,6	0,978[c]
Colesterol total	162,5 ± 28,1	166,3 ± 33,2	0,477[c]

Cluster 1: menor dano de DNA, cluster 2: maior dano de DNA. [a]O estado nutricional foi definido pela classificação do IMC/idade de acordo com curvas de crescimento da OMS (2006-2007). [b]Teste qui-quadrado. [c]Teste T de Student.

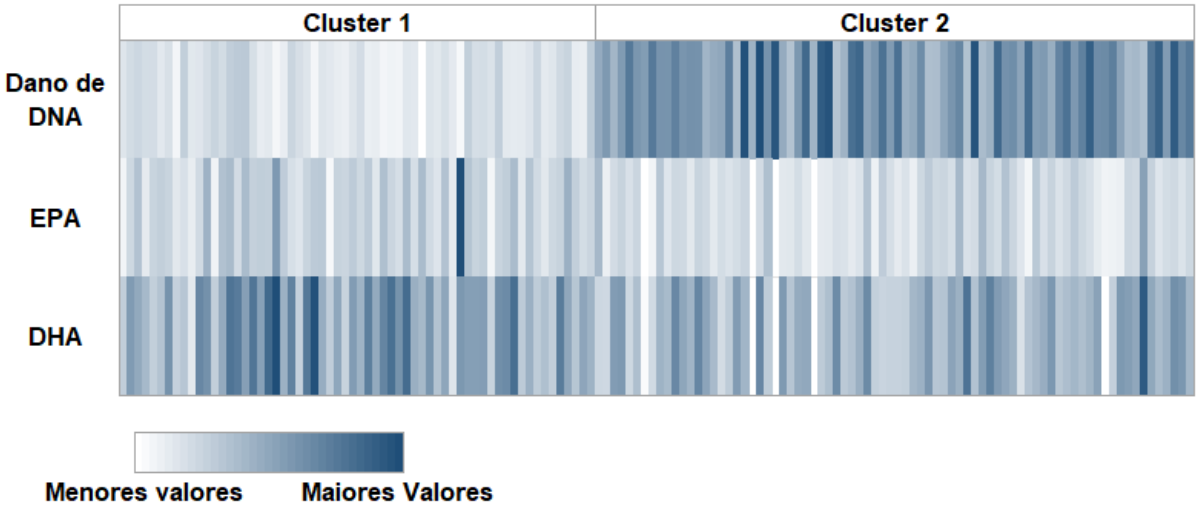
As concentrações sanguíneas de EPA e DHA diferiram entre os grupos de dano de DNA. O cluster 1, de menor dano de DNA, apresentou maior valor médio de ambos os ácidos graxos comparado ao cluster 2 (Tabela 5). Para melhora ilustrar a relação inversa encontrada entre o dano de DNA e as concentrações sanguíneas de dos n-3 LCPUFA EPA e DHA, foi elaborado um heatmap, ou mapa de calor, que categoriza os valores utilizando a intensidade da cor (Figura 4).

Tabela 5 – Concentrações de EPA e DHA nos clusters de dano de DNA

	Cluster 1 (n = 62)	Cluster 2 (n = 78)	p-valor*
EPA (mg/dL)	0,6 ± 0,2	0,5 ± 0,1	<0,001
DHA (mg/dL)	6,2 ± 1,6	5,4 ± 1,3	0,003

Cluster 1: menor dano de DNA, cluster 2: maior dano de DNA. *ANCOVA, ajustado para idade, sexo, ingestão calórica e colesterol total.

Figura 3. Heatmap representando a associação entre dano de DNA e concentrações de n-3 LCPUFA entre os cluster



4.3. Análise de proteômica

Das 1129 proteínas quantificadas pela SomaLogic proteomic Somascan assay, foram selecionadas 117 proteínas relacionadas a processos inflamatórios e dano de DNA em organismo humano após busca na base de dados *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). A tabela 6 apresenta uma descrição das proteínas selecionadas para o presente estudo.

Tabela 6 – Descrição das proteínas selecionadas

NCBI ID	Sigla	Nome	Ação
2	A2M	alfa-2-macroglobulina	anti-inflamatória
9370	ADIPOQ	Adiponectinas	pro-inflamatória
197	AHSG	glicoproteína alfa-2-HS ou fetuína-A	proteína de fase aguda
213	ALB	Albumina	proteína de fase aguda
335	APOA1	apolipoproteína A1	anti-inflamatória
338	APOB	apolipoproteína B	pro-inflamatória
348	APOE	apolipoproteína E	anti-inflamatória
10776	ARPP19	fosfoproteína regulada por cAMP 19	ciclo celular
56624	ASAH2	N-acil-esfingosina amidohidrolase 2 (ceramidase neutra)	pro-inflamatória, apoptose celular
718	C3	complemento C3	pro-inflamatória
720	C4A	complemento C4A	pro-inflamatória
721	C4B	complemento C4B	pro-inflamatória
6347	CCL2	proteína quimiotatica de monócitos (MCP-1)	pro-inflamatória
6348	CCL3	proteína inflamatória de macrófagos-3-alfa (MIP-1α)	pro-inflamatória
6452	CCL5	quimiocina RANTES (Regulada sob Ativação, Expressa e Secretada por Células T Normais)	pro-inflamatória
6364	CCL20	proteína inflamatória de macrófagos-3-alfa (MIP-3α)	pro-inflamatória
6366	CCL21	Quimiocina de Tecido Linfóide Secundário (SLC)	pro-inflamatória

Tabela 6: continuação

NCBI ID	Sigla	Nome	Ação
890	CCNA2	ciclina A2	ciclo celular
891	CCNB1	ciclina B1	ciclo celular
892	CCNC	ciclina C	pro e anti-inflamatória
959	CD40LG	CD40 ligante	pro-inflamatória
983	CDC2 / CDK1	quinase dependente de ciclina 1 (CDK1)	ciclo celular
1017	CDK2	quinase dependente de ciclina 2	ciclo celular
1020	CDK5	quinase dependente de ciclina 5	pro-inflamatória, apoptose celular
8851	CDK5R1	subunidade reguladora 1 da quinase dependente de ciclina 5	pro-inflamatória
1024	CDK8	quinase dependente de ciclina 8	pro-inflamatória
1027	CDKN1B	inibidor de quinase dependente de ciclina 1B	ciclo celular
1111	CHEK1	checkpoint quinase 1	resposta ao dano de DNA, ciclo celular
11200	CHEK2	checkpoint quinase 2	resposta ao dano de DNA, ciclo celular
64581	CLEC7A	lectina tipo C pertencente à família 7A	pro-inflamatória
1215	CMA1	quinase 1	pro-inflamatória
1401	CRP	Proteína C reativa	pro-inflamatória
1493	CTLA4	antígeno 4 de linfócito T citotóxico	anti-inflamatória

Tabela 6: continuação

NCBI ID	Sigla	Nome	Ação
2919	CXCL1	proteína α reguladora de crescimento (GRO-α)	pro-inflamatória
6374	CXCL5	peptídeo ativador de neutrófilo derivado de células epiteliais (ENA-78)	pro-inflamatória
6372	CXCL6	proteína quimiotática de granulócitos 2 (GCP-2)	pro-inflamatória
3627	CXCL10	proteína induzida por IFN-γ (IP-10)	pro-inflamatória
6373	CXCL11	quimiocina de linfócito T induzida por IFN (I-TAC)	pro-inflamatória
6387	CXCL12	fator 1 derivado de células do estroma	pro-inflamatória
10563	CXCL13	quimiocina ativadora de células B (BLC)	pro-inflamatória
58191	CXCL16	Ligante 16 de quimiocina C-X-C / receptor scavenger de fosfatidilserina e LDL oxidada	pro-inflamatória
1956	EGFR	receptor do fator de crescimento epidérmico	pro-inflamatória
2147	F2	trombina (fator II ativado)	coagulação
2153	F5	fator V	coagulação
356	FASLG	FAZ ligante	pro-inflamatória, apoptose celular
2243	FGA	cadeia alfa do fibrinogênio	coagulação

Tabela 6: continuação

NCBI ID	Sigla	Nome	Ação
2244	FGB	cadeia beta do fibrinogênio	coagulação
2266	FGG	cadeia gama do fibrinogênio	coagulação
2247	FGF2	fator de crescimento fibroblástico 2	reparação tecidual, anti-inflamatória
55869	HDAC8	histona-desacetilase 8	regulação da transcrição
3182	HNRNPAB	ribonucleoproteína heterogênea nuclear A/B	regulação da transcrição
3240	HP	haptoglobina	proteína de fase aguda
3263	HPX	hemopexina	proteína de fase aguda
3383	ICAM1	molécula de adesão intercelular-1	pro-inflamatória
3458	IFNG	interferon gama	pro-inflamatória
3479	IGF1	fator de crescimento I semelhante à insulina	proliferação celular, inibição da apoptose
3485	IGFBP2	proteína ligadora 2 de IGF	proliferação celular, inibição da apoptose celular
3486	IGFBP3	proteína ligadora 3 de IGF	proliferação celular, inibição da apoptose
3552	IL1A	interleucina 1 alfa	pro-inflamatória
3553	IL1B	interleucina 1 beta	pro-inflamatória, apoptose celular
3558	IL2	interleucina 2	pro-inflamatória
3559	IL2RA	subunidade alfa do receptor de IL2	pro-inflamatória

Tabela 6: continuação

NCBI ID	Sigla	Nome	Ação
3562	IL3	interleucina 3	anti-inflamatória, apoptose celular
3569	IL6	interleucina 6	pro-inflamatória
3570	IL6R	Receptor de IL6	pro-inflamatória
3572	IL6ST	transdutor de sinal da IL-6	pro-inflamatória
3586	IL10	interleucina 10	pro-inflamatória
3588	IL10RB	subunidade beta do receptor de IL10	pro-inflamatória
3593	IL12B	interleucina 12B	pro-inflamatória
3596	IL13	interleucina 13	pro e anti-inflamatória
3597	IL13RA1	subunidade alfa do receptor IL13	pro-inflamatória
10068	IL18BP	proteína ligadora da IL18	anti-inflamatória
8809	IL18R1	receptor 1 da IL18	pro-inflamatória
51561	IL23A	subunidade alfa da IL23	pro-inflamatória
149233	IL23R	receptor da IL23	pro-inflamatória
3630	INS	insulina	metabolismo de carboidratos e lpídios
3643	INSR	receptor de insulina	metabolismo de carboidratos e lpídios
5653	KLK6	calicreína 6 humana	pro-inflamatória
3845	KRAS	GTPase	regulação da proliferação celular

Tabela 6: continuação

NCBI ID	Sigla	Nome	Ação
8942	KYNU	quinureninase	pro-inflamatória
4048	LTA4H	leucotrieno-A4-hidrolase	pro-inflamatória
23643	LY96	antígeno 96 de linfócito	pro-inflamatória

Destas 117 proteínas selecionadas, 6 proteínas apresentaram concentrações estatisticamente diferentes entre os dois grupos de dano de DNA. As concentrações das proteínas quinase dependente de ciclina 8 (CDK8), ciclina C (CCNC), quinureninase (KYNU), as subunidades catalítica alfa (PIK3CA) e regulatória 1 (PIK3R1) da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e a proteína quinase C beta (PRKCB) foram menores no cluster 1, de menor dano de DNA (Tabela 7).

Tabela 7 – Concentrações de proteínas nos clusters de dano de DNA

Proteína (pM)	Cluster 1 (n = 62)	Cluster 2 (n = 78)	p-valor*
CDK8-CCNC	22655 (1989,0; 2468,1)	2399,5 (2093,7; 2708,4)	0,008
KYNU	985,4 (837,7; 1150,2)	1061,8 (906,0; 1207,8)	0,028
PIK3CA-PIK3R1	1332,7 (1132,4; 1523,0)	1424,0 (1228,6; 1614,8)	0,044
PRKCB	24843,2 (20265,4; 27851,2)	25460,1 (21616,7; 29323,1)	0,024

Cluster 1: menor dano de DNA, cluster 2: maior dano de DNA. *ANCOVA, ajustado para idade, sexo, IMC e ingestão energética. CDK8: quinase dependente de ciclina 8 (CDK8); CCNC: ciclina C; KYNU: quinureninase, PIK3CA: subunidade catalítica alfa da fosfatidilinositol-3-quinase; PIK3R1: subunidade regulatória 1 da fosfatidilinositol-3-quinase; PRKCB: proteína quinase C beta.

Foi observada uma relação estatisticamente significante entre estas 6 proteínas e o dano de DNA por meio da análise de regressão múltipla. O modelo incluindo todas as proteínas, as concentrações de DHA e EPA, e as variáveis de confusão explica 13% da variação no dano de DNA (Tabela 8). A análise de regressão múltipla também foi realizada com cada proteína separadamente, e a relação se manteve semelhante (Tabela 8).

Tabela 8 – Modelos da Análise de Regressão Múltipla que explicam a relação entre dano de DNA e proteínas

Modelos	R	R2	R2 ajustado	Durbin-Watson	Significância (p)
Todas as proteínas	0.44	0.19	0.13	1.93	0.002
CDK8.CCNC	0.42	0.18	0.13	1.98	0.001
KYNU	0.42	0.18	0.13	1.94	0.001
PIK3CA.PIK3R1	0.41	0.17	0.12	1.98	0.002
PRKCB	0.42	0.18	0.13	1.97	0.001

Preditoress: DHA, EPA, idade, sexo, IMC, ingestão energética, colesterol total.

5. Discussão

No presente estudo, foi investigada a relação entre o dano de DNA, os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa ácido eicosapentaenoico e docosahexaenoico e proteínas relacionadas à inflamação e resposta ao dano de DNA em crianças e adolescente de 9 a 13 anos de idade do município de Ribeirão Preto.

Após a divisão dos indivíduos em dois grupos opostos de dano de DNA pelo teste de k-means cluster, foi encontrada uma maior concentração de EPA e DHA no cluster de menor dano de DNA, demonstrando um papel protetor destes n-3 LCPUFA na integridade do material genético.

Estudos prévios obtiveram achados similares. Um experimento in vitro realizado com sangue periférico tratado com diferentes concentrações de EPA (2,5, 5, 10, 20 e 40 mg/ml) e Imazzalil®, um fungicida com efeito genotóxico, evidenciou menor frequência de aberrações cromossômicas e menor ocorrência de micronúcleo, ambos marcadores de dano de DNA, em células tratadas com maiores concentrações de EPA (TURKEZ; AYDIN, 2013), em uma relação dose-dependente.

Outro estudo investigou o efeito de tratamento in vitro com EPA e DHA, em relação ao dano de DNA induzido por peróxido de hidrogênio (H2O2) em células do endotélio vascular (SAKAI et al., 2017). Os autores encontraram redução na ocorrência de quebras de fita duplas nas células tratadas com os n-3 LCPUFA, demonstrando seu efeito protetor (SAKAI et al., 2017).

Em um ensaio clínico, indivíduos adultos diabéticos que receberam intervenção com aumento da ingestão de vegetais e óleo vegetal enriquecido com n-3 LCPUFA apresentaram redução do dano de DNA, avaliado tanto pela técnica de eletroforese em gel de célula única em células do sangue periférico quanto pela excreção urinária de 8-OHdG (MÜLLNER et al., 2013).

Os ácidos graxos poli-insaturados EPA e DHA são substratos para a síntese de mediadores pró-resolução que desempenham papel fundamental na inibição e equilíbrio da resposta inflamatória (BARDEN; MAS; MORI, 2016). Essa atividade reguladora de inflamação é uma das vias pelas quais os n-3 LCPUFA atuam na redução do dano de DNA (KAWANISHI et al., 2017; MURATA, 2018).

No presente estudo avaliamos a dosagem sanguínea dos ácidos graxos poli-insaturados EPA e DHA. Foi demonstrado previamente que as concentrações sanguíneas destes lipídios estão associadas à sua ingestão por meio de fontes alimentares (ANDO et al., 2020; BUCKLAND et al., 2022). Um estudo multicêntrico avaliou a ingestão de ácidos graxos em crianças de 1 a 7 anos de idade em 33 países e foi encontrado que o consumo de EPA e DHA esteve abaixo das recomendações de ingestão preconizadas pela OMS (MONNARD; FLEITH, 2021). No Brasil, um estudo com idosos demonstrou que o consumo de fontes de ácidos graxos ômega 3, especialmente de peixes, a principal fonte de EPA e DHA, é menor em indivíduos de menores níveis socioeconômicos(STEFANELLO; PASQUALOTTI; PICHLER, 2019).

O padrão alimentar da população brasileira vem apresentando mudanças nas últimas décadas, sendo caracterizado por um aumento crescente no consumo de industrializados em detrimento de alimentos in natura, segundo dados da Pesquisa de Orçamento Familiar (POF) (IBGE, 2010), e o consumo de fontes de ácidos poli-insaturados ômega 3 de cadeia longa é pouco frequente. Além disso, a composição de n-3 LCPUFA em peixes considerados fontes como o salmão, a sardinha e o atum é variável, se provenientes de pisciculturas ou pesca marítima, uma vez que a sua alimentação predominante em algas marinhas é a principal responsável pelo teor destes ácidos graxos (CHOLEWSKI; TOMCZYKOWA; TOMCZYK, 2018).

Além da obtenção direta por fontes alimentares, os ácidos graxos EPA e DHA podem ser obtidos pela conversão de ALA catalisada pelas enzimas $\Delta 5$ e $\Delta 6$-dessaturases e elongases, um ácido graxo ômega 3 presente em óleos vegetais de soja e canola, de mais fácil acesso à população. No entanto, esta conversão é responsável apenas pela origem de 10 a 14% dos n-3 LCPUFA (CHOLEWSKI; TOMCZYKOWA; TOMCZYK, 2018). Dietas ocidentais, caracterizadas por elevada razão ômega 6 : ômega 3, também podem estar associadas a menor conversão do ALA em EPA e DHA, uma vez que compete com o ômega 6 ácido linoleico pelas enzimas que catalisam essa reação (BARDEN; MAS; MORI, 2016; MARION-LETELLIER; SAVOYE; GHOSH, 2015). Este cenário traz preocupações, considerando os achados neste trabalho, uma vez que o EPA e DHA estão inversamente relacionados ao dano de DNA, portanto podem atuar na prevenção de patologias associadas a alterações da integridade do material genético. Sendo assim,

uma dieta pobre em ácidos graxos ômega 3 pode trazer prejuízos a crianças e adolescentes no que diz respeito à ocorrência de dano de DNA.

Outros achados do estudo estão relacionados à análise de proteômica. Foi encontrado que o cluster de menor dano de DNA, e maiores concentrações de DHA e EPA, apresentou menores valores das proteínas quinase dependente de ciclina 8 (CDK8), ciclina C (CCNC), quinureninase (KYNU), subunidades catalítica alfa (PIK3CA) e regulatória 1 (PIK3R1) da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e quinase C beta (PRKCB).

A CDK8 em conjunto com a CCNC compõe a região reguladora do complexo mediador de transcrição, que atua tanto na ativação quanto na inibição da transcrição gênica. A CDK8 fosforila o domínio carboxi-terminal da maior subunidade do fator de transcrição RNA polimerase II (BREGMAN; PESTELL; KIDD, 2000; FANT; TAATJES, 2019; GALBRAITH; DONNER; ESPINOSA, 2010). Ciclinas e quinases dependente de ciclinas (CDKs) participam da regulação do ciclo celular porém com diferentes substratos e funções. As CDKs associadas a transcrição, incluindo CDK7, CDK8, CDK9, CDK12 e CDK13, são reguladores críticos da expressão gênica (CHOU et al., 2020). Evidências recentes sugerem uma série de novas funções para estas CDKs, que envolvem a regulação de modificações epigenéticas, poliadenilação de íntrons, resposta ao dano de DNA e estabilidade genômica (CHOU et al., 2020). A proteína CDK8 é uma é uma serina-treonina quinase e uma subunidade do módulo CDK e opera como regulador de transcrição positivo, por meio da fosforilação da polimerase II em vias específicas, incluindo vias de sinalização de oncogenes (BREGMAN; PESTELL; KIDD, 2000; BROUDE et al., 2015; DONNER et al., 2010; FANT; TAATJES, 2019; GALBRAITH; DONNER; ESPINOSA, 2010; LIANG et al., 2018).

A CDK8 também atua na patogênese do câncer como um mediador de atividades parácrinas promotoras de tumor induzidas por dano (PORTER et al., 2012). O gene supressor de tumor, p53, que exerce papel crucial no controle do ciclo celular, é regulado pela CDK8 (GALBRAITH; DONNER; ESPINOSA, 2010). Sob condições de estresse que induzem dano de DNA, o gene p53 atua bloqueando o ciclo celular, permitindo assim o reparo do DNA ou a indução da apoptose celular (CAVALCANTI JÚNIOR; KLUMB2; MAIA, 2002; ESPINOSA; VERDUN; EMERSON, 2003). O dano de DNA aumentado está relacionado à etiologia do câncer, e em alguns tipos de tumor, a CDK8 tem sua expressão aumentada (DEMIRBAG; YILMAZ; KOCYIGIT,

2005; EVANS; DIZDAROGLU; COOKE, 2004; KRYSTON et al., 2011; POSS et al., 2016; SLYSKOVA et al., 2014). A CDK8 também atua na fosforilação de outras proteínas, muitas relacionadas ao reparo do DNA e transcrição gênica (CAVALCANTI JÚNIOR; KLUMB2; MAIA, 2002; CHOU et al., 2020). A ciclina C (CCNC), também componente do módulo CDK, é a subunidade regulatória da proteína CDK8. Stieg et al demonstraram que a CCNC também desempenha um papel na resposta ao estresse oxidativo e atua na indução da apoptose (STIEG et al., 2019; STIEG; COOPER; STRICH, 2020).

No presente estudo, foi identificada uma expressão aumentada do complexo CDK8-CCNC no cluster de maior dano de DNA e menores concentrações de DHA e EPA (cluster 2). Estudos recentes demonstraram que a dupla CDK8-CCNC atua como repressores da expressão de genes com papel lipogênico, inibindo a lipogênese de-novo e o acúmulo de lipídios em mamíferos. Esta função da CDK8-CCNC ocorre por meio da fosforilação sítio-específica da proteína 1c de ligação do elemento regulador de esterol (SREBP-1c), resultando na rápida degradação deste regulador central do metabolismo lipídico (ZHAO et al., 2012).

As proteínas PIK3CA e PIK3R1 são, respectivamente, a subunidade catalítica e a subunidade regulatória da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), uma proteína de sinalização componente da membrana celular que atua em uma variedade de funções celulares, como sobrevivência, crescimento, metabolismo e quimiotaxia (DONATO; FRAZÃO; ELIAS, 2010; YANG et al., 2019). No presente estudo, estes dois componentes da PI3K tem maior expressão no grupo de maior dano de DNA e menores concentrações de DHA e EPA (cluster 2). A expressão aumentada de PI3K é considerada um marcador do câncer (FRUMAN et al., 2017; YANG et al., 2019).

O complexo mediador Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) tem sua expressão aumentada relacionada a aumento do dano de DNA, relacionada a sua função no reconhecimento de quebras de fita dupla do DNA (HUANG et al., 2020). A subunidade NBS1 do complexo MRN interage com a PI3K, estimulando sua atividade, o que poderia explicar seus níveis mais elevados no cluster 2 (HUANG et al., 2020). Outros autores encontraram associações semelhantes. Chandra Pal et al. demonstraram uma redução na inflamação e no dano de DNA induzido por exposição à radiação UVB através da inibição da sinalização da PI3K (CHANDRA PAL et al., 2015). Nguyen

et al. descobriram que a inibição da via PI3K/AKT pode levar a uma redução no dano ao DNA através da modulação de células T CD4 (NGUYEN et al., 2021).

Kim et al demonstraram que o tratamento com DHA levou a uma redução da expressão da PI3K em células de câncer de pulmão in vitro, e induziu a apoptose pela inibição da via de sinalização PI3K/AKT, corroborando os resultados encontrados no presente estudo, uma vez que o cluster de menor dano de DNA e maiores concentrações de DHA e EPA, apresentou menor expressão da PIK3CA-PIK3R1 (KIM et al., 2015). A apoptose é um dos mecanismos regulados pelo ciclo celular para proteção contra a proliferação de células com dano de DNA (DEMIRBAG; YILMAZ; KOCYIGIT, 2005; EVANS; DIZDAROGLU; COOKE, 2004; KRYSTON et al., 2011; SLYSKOVA et al., 2014).

A proteína PI3K parece também ser regulada pela quinureninase (KYNU), tendo sua expressão reduzida com a inibição desta proteína (CI et al., 2020), o que corrobora com outro achado do presente estudo, uma vez que a KYNU também está mais expressa no cluster de maior dano de DNA. A KYNU catalisa a degradação do seu metabólito, quinurenina (KYN), produzida na primeira etapa do catabolismo do triptofano, possibilitando a biossíntese de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) (HARDEN et al., 2016). Sob condições de inflamação, a KYNU tem sua expressão aumentada. (HARDEN et al., 2016; KOLODZIEJ; PALEOLOG; WILLIAMS, 2011; MÁNDI; VÉCSEI, 2012)

Gomes et al induziram a inflamação por meio da administração de lipopolissacarídeos (LPS) em ratos, obtendo um aumento da quinurenina e do triptofano. Este aumento foi atenuado nos ratos tratados com óleo de peixe contendo EPA e DHA, contribuindo também para a redução de marcadores inflamatórios (GOMES et al., 2018). Tais achados podem explicar a maior expressão da KYNU no cluster de maior dano de DNA e menores concentrações de EPA e DHA (cluster 2), encontrada no presente estudo, demonstrando uma potencial relação do efeito protetor destes n-3 LC PUFA contra o dano de DNA, mediado pela via metabólica da quinurenina.

A proteína quinase C beta (PRKCB) também estava mais expressa no cluster de maior dano de DNA. PRKCB é um membro da família da proteína quinase C (PKC),

que atua na fosforilação de uma série de proteínas alvo e estão envolvidas em diversas vias de sinalização celular (KAWAKAMI; KAWAKAMI; KITAURA, 2002; PATERGNANI et al., 2013). Os membros dessa família também atuam como principais receptores para uma classe de promotores de tumor(KAWAKAMI; KAWAKAMI; KITAURA, 2002). A PRKCB tem sido associada a diferentes funções celulares como ativação de células B e regulação da apoptose.(KAWAKAMI; KAWAKAMI; KITAURA, 2002) Patergnani et al encontraram que a ativação deste proteína leva a inibição da apoptose, sugerindo uma regulação negativa deste mecanismo (PATERGNANI et al., 2013). A inibição da apoptose quando há dano de DNA pode causar a perpetuação de danos na estrutura do material genético por permitir a proliferação de células danificadas (PATERGNANI et al., 2013). No estudo de Davidson et al, uma dieta rica em n-3 LCPUFA levou a redução da expressão da PRKCB e um aumento da apoptose em células de câncer de cólon, em comparação a uma dieta rica em ácidos graxos ômega-6, demonstrando o efeito protetor dos n-3 LCPUFA por meio da supressão da expressão da PRKCB (DAVIDSON et al., 2000).

Denys et al. mostraram que os ácidos graxos DHA e EPA substituem o ácido araquidônico (ARA) na composição dos fosfolipídios de membrana e suprimem a expressão do gene IL-2, inibindo o recrutamento da proteína quinase C (PKC) e bloqueando a translocação do fator nuclear kappa B (NF-kB) envolvido na proliferação de células T, interrompendo a via inflamatória, e portanto, contribuem para a menor ocorrência de dano de DNA (DENYS; HICHAMI; KHAN, 2005; MURATA, 2018; SIMOPOULOS, 2002).

Os resultados encontrados sugerem que os ácidos graxos poli-insaturados ômega 3, DHA e EPA, podem ter um papel importante na redução do dano de DNA, que pode estar relacionado à menor expressão de proteínas envolvidas em vias pró-inflamatórias. A importância destes achados reside no impacto negativo do dano de DNA aumentado a longo prazo em detrimento à saúde, visto que está associado ao desenvolvimento de patologias, tais como doenças neurodegenerativas, aterosclerose e neoplasias malignas (DEMIRBAG; YILMAZ; KOCYIGIT, 2005; EVANS; DIZDAROGLU; COOKE, 2004; KRYSTON et al., 2011; SLYSKOVA et al., 2014).

6. Conclusão

Foi demonstrado que o papel protetor de ácidos graxos ômega-3 poli-insaturados de cadeia longa, DHA e EPA, contra o dano de DNA está associado a regulação da expressão de proteínas envolvidas em processos inflamatórios. Estudos adicionais de intervenção são necessários para confirmar e melhor compreender os mecanismos inerentes dessa relação, buscando a prevenção de doenças a longo prazo.

REFERÊNCIAS[1]

ANDO, E. et al. Association between dietary intake and serum biomarkers of long-chain PUFA in Japanese preschool children. **Public Health Nutrition**, v. 59, n. 2, p. 279-293, 2020.

ARALDI, R. P. et al. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 72, p. 74-82, 2015.

BARDEN, A. E.; MAS, E.; MORI, T. A. n-3 Fatty acid supplementation and proresolving mediators of inflammation. **Current Opinion in Lipidology**, v. 27, n. 1, p. 26–32, 2016.

BREGMAN, D. B.; PESTELL, R. G.; KIDD, V. J. Cell cycle regulation and RNA polymerase II. **Frontiers in Bioscience**, v. 5, p. d244-257, 2000.

BRODY, E. N. et al. High-content affinity-based proteomics: Unlocking protein biomarker discovery. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 10, n. 8, p. 1013–1022, 2010.

BROUDE, E. V. et al. Expression of CDK8 and CDK8-interacting Genes as Potential Biomarkers in Breast Cancer. **Curr Cancer Drug Targets**, v. 15, n. 8, p. 739–749, 2015.

BUCKLAND, G. et al. The relationship between dietary intakes and plasma concentrations of PUFA in school-age children from the Avon Longitudinal Study of Parents and Children (ALSPAC) cohort. **British Journal of Nutrition**, v. 127, n. 9, p. 1367–1377, 2022.

CAVALCANTI JÚNIOR, G. B.; KLUMB2, C. E.; MAIA, R. C. p53 in hematological malignancies. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 3, p. 419–427, 2002.

CHANDRA PAL, H. et al. Fisetin inhibits UVB-induced cutaneous inflammation and activation of PI3K/AKT/NFκB signaling pathways in SKH-1 hairless mice. **Photochem Photobiol.**, v. 91, n. 1, p. 225–234, 2015.

CHOLEWSKI, M.; TOMCZYKOWA, M.; TOMCZYK, M. A comprehensive review of chemistry, sources and bioavailability of omega-3 fatty acids**. Nutrients**, v. 10, n. 11, p. 1662, 2018.

CHOU, J. et al. Transcription-associated cyclin-dependent kinases as targets and biomarkers for cancer therapy. **Cancer Discovery**, v. 10, n. 3, p. 351–370, 2020.

CI, C. et al. Downregulation of kynureninase restrains cutaneous squamous cell carcinoma proliferation and represses the PI3K/AKT pathway. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 45, n. 2, p. 194–201, 2020.

COOKE, M. S.; OLINSKI, R.; EVANS, M. D. Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance? **Clinica Chimica Acta**, v. 365, n. 1, p. 30-49, 2006.

CORELLA, D.; ORDOVÁS, J. M. Papel de las ómicas en la nutrición de precisión: fortalezas y debilidades. **Nutrición Hospitalaria**, v. 35, n. 4, p. 10–18, 2018.

DAVIDSON, L. A. et al. Morphodensitometric analysis of protein kinase C β II expression in rat colon: modulation by diet and relation to in situ cell proliferation and apoptosis. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 8, p. 1513–1519, 2000.

DEMIRBAG, R.; YILMAZ, R.; KOCYIGIT, A. Relationship between DNA damage, total antioxidant capacity and coronary artery disease. **Mutation Research**, v. 570, n. 2, p. 197–203, 2005.

DENYS, A.; HICHAMI, A.; KHAN, N. A. n-3 PUFAs modulate T-cell activation via protein kinase C-α and -ε and the NF-κB signaling pathway. **Journal of Lipid Research**, v. 46, n. 4, p. 752–758, 2005.

DONATO, J.; FRAZÃO, R.; ELIAS, C. F. The PI3K signaling pathway mediates the biological effects of leptin. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 54, n. 7, p. 591–602, 2010.

DONNER, A. J. et al. CDK8 is a positive regulator of transcriptional elongation within the serum response network. **Nat Struct Mol Biol**, v. 17, n. 2, p. 194–201, 2010.

ELIA, A. E. H. et al. Quantitative Proteomic Atlas of Ubiquitination and Acetylation in the DNA Damage Response. **Molecular Cell**, v. 59, n. 5, p. 867–881, 2016.

ESPINOSA, J. M.; VERDUN, R. E.; EMERSON, B. M. p53 Functions through Stress- and Promoter- Specific Recruitment of Transcription Initiation Components before and after DNA Damage. **Molecular Cell**, v. 12, n. 4, p. 1015–1027, 2003.

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

FANT, C. B.; TAATJES, D. J. Regulatory functions of the Mediator kinases CDK8 and CDK19. **Transcription**, v. 10, n. 2, p. 76–90, 2019.

FENECH, M. Vitamins Associated with Brain Aging, Mild Cognitive Impairment, and Alzheimer Disease: Biomarkers, Epidemiological and Experimental Evidence, Plausible Mechanisms, and Knowledge Gaps. **Advances in Nutrition**, v. 8, n. 6, p. 958–970, 2017.

FRUMAN, D. A. et al. The PI3K Pathway in Human Disease. **Cell**, v. 170, n. 4, p. 605–635, 2017.

FUMAGALLI, F. ; M. J. P. ; S. D. S. ; V. M. N. C. M. ; B. 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 abr. 2022.

GALBRAITH, M. D.; DONNER, A. J.; ESPINOSA, J. M. CDK8: A positive regulator of transcription. **Transcription**, v. 1, n. 1, p. 4–12, 2010.

GOLD, L. et al. Aptamer-based multiplexed proteomic technology for biomarker discovery. **PLoS ONE**, v. 5, n. 12, 2010.

GOMES, M. G. et al. Fish oil ameliorates sickness behavior induced by lipopolysaccharide in aged mice through the modulation of kynurenine pathway. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 58, p. 37–48, 2018.

HARDEN, J. L. et al. The Tryptophan Metabolism Enzyme, L-Kynureninase, is a Novel Inflammatory Factor in Psoriasis and other Inflammatory Diseases. **J Allergy Clin Immunol**, v. 137, n. 6, p. 1830–1840, 2016.

HUANG, T. T. et al. Targeting the PI3K pathway and DNA damage response as a therapeutic strategy in ovarian cancer. **Cancer Treatment Reviews**, v. 86, n. February, p. 102021, 2020.

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

KAWAKAMI, T.; KAWAKAMI, Y.; KITAURA, J. Protein kinase C beta (PKC beta): normal functions and diseases. **Journal of biochemistry**, v. 132, n. 5, p. 677–82, 2002.

KAWANISHI, S. et al. Crosstalk between DNA damage and inflammation in the multiple steps of carcinogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 8, p. 1808, 2017.

KIM, N. et al. Docosahexaenoic acid induces cell death in human non-small cell lung cancer cells by repressing mTOR via AMPK activation and PI3K/Akt inhibition. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 239764, 2015.

KOLODZIEJ, L. R.; PALEOLOG, E. M.; WILLIAMS, R. O. Kynurenine metabolism in health and disease. **Amino Acids**, v. 41, n. 5, p. 1173–1183, 2011.

KRYSTON, T. B. et al. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. **Mutation Research**, v. 711, n. 1–2, p. 193–201, 2011.

KUSSMANN, M.; PANCHAUD, A.; AFFOLTER, M. Proteomics in nutrition: Status quo and outlook for biomarkers and bioactives. **Journal of Proteome Research**, v. 9, n. 10, p. 4876–4887, 2010.

LIANG, J. et al. CDK8 selectively promotes the growth of colon cancer metastases in the liver by regulating gene expression of TIMP3 and matrix metalloproteinases. **Cancer Res**, v. 78, n. 23, p. 6594–6606, 2018.

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

MÁNDI, Y.; VÉCSEI, L. The kynurenine system and immunoregulation. **Journal of Neural Transmission**, v. 119, n. 2, p. 197–209, 2012.

MARION-LETELLIER, R.; SAVOYE, G.; GHOSH, S. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. **IUBMB Life**, v. 67, n. 9, p. 659–667, 2015.

MASOOD, A.; STARK, K. D.; SALEM, N. A simplified and efficient method for the analysis of fatty acid methyl esters suitable for large clinical studies. **Journal of Lipid Research**, v. 46, n. 10, p. 2299–305, 2005.

MATHIAS, M. G. et al. Clinical and Vitamin Response to a Short-Term Multi-Micronutrient Intervention in Brazilian Children and Teens: From Population Data to Interindividual Responses. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 62, n. 6, p. 1700613, 2018.

MONNARD, C.; FLEITH, M. Total fat and fatty acid intake among 1–7-year-old children from 33 countries: Comparison with international recommendations. **Nutrients**, v. 13, n. 10, p. 3547, 2021.

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

MÜLLNER, E. et al. Vegetables and PUFA-rich plant oil reduce DNA strand breaks in individuals with type 2 diabetes. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 57, n. 2, p. 328–338, fev. 2013.

MURATA, M. Inflammation and Cancer. **Enironmental Health and Preventive Medicine**, v. 23, n. 1, p. 50, 2018.

NCBI. **National Center for Biotechnology Information**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 11 dez. 2021.

NEWELL, M. et al. A critical review on the effect of docosahexaenoic acid (Dha) on cancer cell cycle progression. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 8, p. 1784, 2017.

NGUYEN, L. N. et al. Immune activation induces telomeric DNA damage and promotes short-lived effector T cell differentiation in chronic HCV infection. **Hepatology**, 2021.

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.

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

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. 291–298, 1984.

PATERGNANI, S. et al. PRKCB/protein kinase C, beta and the mitochondrial axis as key regulators of autophagy. **Autophagy**, v. 9, n. 9, p. 1367–1385, 2013.

PERINI, J. Â. DE L. et al. Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6: metabolismo em mamíferos e resposta imune. **Rev. Nutr**, v. 23, n. 6, p. 1075–1086, 2010.

PISABARRO, R. Nutrigenética y nutrigenómica la revolución sanitaria del nuevo milenio. Implicancias clínicas en síndrome metabólico y diabetes tipo 2. **Revista Médica del Uruguay**, v. 22, n. 2, p. 100–107, 2006.

PORTER, D. C. et al. Cyclin-dependent kinase 8 mediates chemotherapy-induced tumor-promoting paracrine activities. **PNAS**, v. 109, n. 34, p. 13799–13804, 2012.

POSS, Z. C. et al. Identification of Mediator kinase substrates in human cells using cortistatin A and quantitative phosphoproteomics. **Cell Reports**, v. 15, n. 2, p. 436–450, 2016.

RAI, R. et al. DNA damage response: The players, the network and the role in tumor suppression. **Cancer Genomics and Proteomics**, v. 4, n. 2, p. 99–106, 2007.

RAMÍREZ DE PEÑA, D.; MARTÍN, A. Á. Genómica nutricional como control de la enfermedad cardiovascular en el futuro próximo. **Acta Bioquimica Clinica Latinoamericana**, v. 48, n. 3, p. 375–381, 2014.

SAINI, R. K.; KEUM, Y. S. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance — A review**. Life Sciences**, v. 203, p. 255-267, 2018.

SAKAI, C. et al. Fish oil omega-3 polyunsaturated fatty acids attenuate oxidative stress-induced DNA damage in vascular endothelial cells. **PLoS ONE**, v. 12, n. 11, p. 1–13, 2017.

SIMOPOULOS, A. P. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 21, n. 6, p. 495–505, 2002.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184–91, 1988.

SLYSKOVA, J. et al. Both genetic and dietary factors underlie individual differences in DNA damage levels and DNA repair capacity. **DNA Repair**, v. 16, n. 1, p. 66–73, 2014.

STEFANELLO, F. P. DA S.; PASQUALOTTI, A.; PICHLER, N. A. Análise do consumo de alimentos fontes de ômega 3 por participantes de grupos de convivências. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 22, n. 6, p. 1-9, 2019.

STIEG, D. C. et al. Cyclin C regulated oxidative stress responsive transcriptome in mus musculus embryonic fibroblasts. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 9, n. 6, p. 1901–1908, 2019.

STIEG, D. C.; COOPER, K. F.; STRICH, R. The extent of cyclin C promoter occupancy directs changes in stress-dependent transcription. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 48, p. 16280–16291, 2020.

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.

TICE, R. R. et al. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206–21, 2000.

TURKEZ, H.; AYDIN, E. Anti-genotoxic role of eicosapentaenoic acid against imazalil-induced DNA damage in vitro. **Toxicology and Industrial Health**, v. 29, n. 7, p. 584–590, 2013.

VON STECHOW, L.; OLSEN, J. V. Proteomics insights into DNA damage response and translating this knowledge to clinical strategies. **Proteomics**, v. 17, n. 3–4, p. 1600018, 2017.

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. 153–162, 2008.

YANG, J. et al. Targeting PI3K in cancer: mechanisms and advances in clinical trials. **Molecular Cancer**, v. 18, n. 1, p. 26, 2019.

ZHAO, X. et al. Regulation of lipogenesis by cyclin-dependent kinase 8-mediated control of SREBP-1. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 7, p. 2417–2427, 2012.

ZIEGLER, K. et al. Chemical modification of pro-inflammatory proteins by peroxynitrite increases activation of TLR4 and NF-κB: Implications for the health effects of air pollution and oxidative stress. **Redox Biology**, v. 37, p. 101581, 2020.

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)

<u>Declaração do Investigador:</u> 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 freqüência alimentar para crianças e adolescentes. Estes resultados serão utilizados para avaliação da ingestão habitual de energia, proteínas, gorduras, açucares, 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).

<u>Declaração do Investigador:</u> 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**	**Unidade** **1 2 3**	**P25 P50 P75** **P(1) M(2) 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**	**Unidade** **1 2 3**	**P25 P50 P75** **P(1) M(2) 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, croissant	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	25 g ---------- 50g ---------- 60g	
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, MandiocaPolenta (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, nhoque	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	100g.---------- 125g ---------- 200g	
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 P50 P75** **P(1) M(2) 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 P50 P75** **P(1) M(2) 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 P50 P75** **P(1) M(2) 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 ervas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	85ml -------165ml ---------- 200ml	
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	
Refrigera-nte diet	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	100ml ------ 165ml ------ 250ml	
Refrigera-nte normal	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	165ml.------ 200ml ---------- 240ml	
Refrigera-nte fosfatado	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M	165ml.------ 200ml ---------- 240ml	
Grupo de doces e miscelâ-neas	**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 freqüência 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

(01) Margarina

(02) Manteiga

(03) Azeite de oliva

(04) Óleo de soja/milho/outros

(05) Bacon

(06) Banha

(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 freqüência 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