

ASSOCIAÇÃO ENTRE O CONSUMO DE FRUTAS, VERDURAS E LEGUMES E A ATIVIDADE DA PARAOXONASE-1 EM CRIANÇAS

CAROLINE SILVA MACIEL¹; TAINÁ DA SILVA SIGALES²; GABRIELA DE LEMOS ULIANO³; LUDMILA MUNIZ⁴; AUGUSTO SCHNEIDER⁵; SANDRA COSTA VALLE⁶

¹ Faculdade de Nutrição - Universidade Federal de Pelotas – karol-maciel@hotmail.com

² Faculdade de Nutrição - Universidade Federal de Pelotas – tainasigales@hotmail.com

³ PPG Nutrição e Alimentos - Universidade Federal de Pelotas – gabiuliano@hotmail.com

⁴ Faculdade de Nutrição - Universidade Federal de Pelotas – ludmuniz@yahoo.com.br

⁵ Faculdade de Nutrição - Universidade Federal de Pelotas – augustoschneider@gmail.com

⁶ Faculdade de Nutrição - Universidade Federal de Pelotas – sandracostavalle@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O consumo adequado de frutas, verduras e legumes (FV&L) tem sido associado à proteção contra diversas doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), especialmente a doença cardiovascular (DCV). Outro importante fator preventivo da DCV com destaque na área clínica é a atividade da enzima antioxidante paraoxonase 1 (PON1) (SCHRADER, RIMBACH, 2011; KLEMOLA, 2011). Por outro lado, a exposição a fatores de risco como uma alimentação habitual de má qualidade, a presença de dislipidemia e de obesidade relacionam-se a lesão endotelial e ao aumento da DCV (PANAGIOTAKOS, 2003). Esses fatores de risco têm alta prevalência na infância, caracterizando a população pediátrica como altamente vulnerável para o início de lesões endoteliais (PANAGIOTAKOS, 2003). As FV&L podem auxiliar na prevenção da DCV por meio de substâncias protetoras como vitaminas e minerais antioxidantes e diferentes componentes fenólicos. Panagiotakos et al. identificaram que os indivíduos que consumiram FV&L por mais de 3 dias por semana tinham 70% menor risco de doenças cardiovasculares e, verificaram também que um aumento de uma porção de fruta por dia reduziu o risco de DCV em 10%.

Estudos mostram que uma baixa concentração sérica da partícula de lipoproteína de alta densidade (HDL) é um fator de risco independente para DCV. Em contraste, uma alta concentração de HDL protege contra o surgimento e o avanço de lesões endoteliais, sendo as funções antiaterogênicas do HDL atribuídas à enzima antioxidante paraoxonase 1 (PON1). Baixos níveis de atividade da PON1 são consistentemente correlacionados ao aumento da DCV. A PON1 tem capacidade de mediar a proteção das partículas de lipoproteína de baixa densidade (LDL) contra alterações oxidativas e consequentes eventos desencadeantes do ateroma. Uma modificação da atividade sérica da PON1 tem sido verificada frente ao consumo de alimentos ricos em substâncias antioxidantes e sugere uma modulação dietética da enzima (JARVIK, 2002; DANIELS, 2014). Jarvik et al.(2002), observaram que a atividade arilesterase da PON 1 mostrou correlação positiva quando relacionada a maior ingestão de vitaminas.

A má qualidade da alimentação das crianças tem sido amplamente investigada quanto a sua relação ao risco cardiovascular precoce. Entretanto, são escassos os estudos sobre a relação entre o consumo alimentar na infância e um importante fator cardioprotetor, a atividade arilesterase da PON1. Este estudo teve como objetivo avaliar a associação entre o consumo de frutas, verduras e legumes, o perfil lipídico e a atividade da PON1 em crianças de 5 a 7 anos de idade.

2. METODOLOGIA

Foi realizado um estudo transversal no Ambulatório de Pediatria da Universidade Federal de Pelotas-RS, no período de janeiro a outubro de 2014. A amostra foi constituída por crianças de ambos os gêneros, com idades entre 5 e 7 anos de idade que procuraram atendimento durante o período do estudo. Foram excluídas crianças que apresentaram doenças hepáticas, paralisia cerebral, displasia óssea ou neoplasias, portadoras de necessidades especiais e alterações genéticas. Inicialmente, os responsáveis foram devidamente esclarecidos e, após autorizarem a participação da criança, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Os dados foram obtidos por entrevista e dosagens bioquímicas. No momento da entrevista foram coletados os dados: gênero, idade, peso, estatura e frequência de consumo alimentar. Na entrevista foi entregue a solicitação para coleta de sangue. As dosagens bioquímicas de HDL e LDL foram realizadas após jejum de 12h, em laboratório de análises bioquímicas com certificação de qualidade nos serviços.

Os dados de peso (kg) e estatura (cm) foram utilizados para o cálculo do IMC(kg/m²), e o diagnóstico nutricional baseou-se na classificação percentil do índice IMC-para-idade, tendo como referência as curvas da Organização Mundial da Saúde de 2007. O consumo de FL&V foi avaliado através do formulário de marcadores de consumo alimentar, adotado pelo Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional proposto pelo Ministério da Saúde do Brasil.

Do soro coletado em laboratório duas alíquotas foram separadas e estocadas a -20°C para análise da atividade da PON1 no soro e nas frações HDL e N-HDL. A atividade arilesterase da PON1 foi medida a partir da velocidade de formação de fenol através do aumento da absorbância a 270nm, temperatura de 25°C, em espectrofotômetro. As amostras foram diluídas 1:3 em 20mM de Tampão Tris/HCl, pH 8,0, contendo 1mM de CaCl₂ a qual foram adicionados 4mM de fenilacetato. A reação foi determinada após 20 segundos de retenção e a absorbância foi medida por 60 segundos. Uma unidade de atividade arilesterase da PON1 foi considerada igual a 1uM de fenol/minuto e expressa em kU/L, com base no coeficiente de extinção de fenol. Amostras em branco contendo água foram utilizadas para corrigir a hidrólise não enzimática.

A medida da atividade arilesterase da PON1 foi realizada nas frações HDL e N-HDL, mediante precipitação do HDL e das frações LDL e VLDL por método indireto. Após precipitação com Tungstênio e consequente centrifugação a 3500 rpm por 15' a fração HDL obtida foi retirada, seu volume medido e atividade da PON1 dosada conforme descrito anteriormente. O precipitado constituído, essencialmente, de VLDL e LDL foi reconstituído em tampão PBS em volume similar ao extraído na fração HDL. Na sequência, a atividade da enzima na fração N-HDL foi medida conforme descrito anteriormente.

Os dados coletados foram analisados utilizando-se o software BioEstat 5.0. Inicialmente, a normalidade dos dados foi testada a partir do teste *Kolmogorov-Smirnov*. A descrição das variáveis foi realizada usando frequências absolutas e relativas para variáveis categóricas. Para as variáveis numéricas utilizou-se média e desvio padrão (DP). Médias e DP do desfecho segundo as principais exposições categóricas foram comparadas por teste t de *Student* ou ANOVA. Adotou-se um nível de significância de 5%. O protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina da UFPEL (504.362/2013).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo contou com a participação de 81 crianças, sendo 50,6% (n=41) do masculino, com média de idade de $5,4 \pm 2,2$ anos. A atividade arilesterase da PON1 no HDL significou, aproximadamente, 40% da atividade encontrada no soro total. Estudos sugerem que a atividade arilesterase da PON1 é majoritária no HDL, quando comparada às demais lipoproteínas, alcançando até 85% da atividade sérica total (SCHRADER, 2011; KLEEMOLA, 2011; LEVIEV et al., 2001). Já no LDL, seria esperada uma atividade da PON1 de aproximadamente, 3% a 5%. No presente estudo encontrou-se 9%, mas deve-se considerar a associação ao VLDL, o qual tem quantidade igualmente pequena de apolipoproteínas A-I e J, mas que asseguram atividade da PON1 (SCHRADER, 2011; KLEEMOLA, 2011).

Neste trabalho a PON1 não se modificou com a idade (Tab.1), resultado que condiz com o encontrado em outros estudos com crianças (SUMEGOVÁ et al., 2007). Entretanto, na coorte CHAMACOS, foi mostrado que aos sete anos de idade a média da PON1 eleva-se comparada aos 5 anos. Em relação ao sexo, foram observadas médias superiores entre as meninas, tanto em soro total quanto nas frações HDL e N-HDL, sendo diferença significativa apenas na fração HDL ($p < 0,01$) (HUEN et al., 2009). Outro trabalho mostrou maior atividade da PON1 no sexo feminino (KLEEMOLA et al., 2011). No entanto, esse efeito protetor relacionado à PON1 já na infância é um resultado que motiva uma maior investigação. Em relação ao estado nutricional, a atividade da enzima foi maior nas crianças com sobrepeso.

Tabela 1: Análise da atividade arilesterase da PON1 (KU/L) em soro total, nas frações HDL e N-HDL, segundo o sexo, a idade e o estado nutricional em crianças entre 5 e 7 anos de idade, RS-Brasil, 2014 (n 81).

	SORO TOTAL				FRAÇÃO HDL				FRAÇÃO N-HDL			
	N	MÉDIA	DP	p	N	MÉDIA	DP	p	N	MÉDIA	DP	p
Sexo				0,38				0,004*				0,57
Feminino	40	91,5	27,9		37	41,5*	18,4		37	9	4,6	
Masculino	41	86,4	24,6		38	29,7	16,7		37	8,3	5,7	
Idade (anos)				0,59				0,6				0,49
5	30	85,3	21,3		27	36,9	18,9		27	9,2	5,7	
6	29	92,3	30,4		28	36,5	17,5		28	8,8	5,6	
7	22	88,9	26,3		20	31,8	18,6		19	7,4	3,5	
HDL (mg/dL)				0,07				0,01*				0,08
<45	30	82	28,2		27	28,8	11,4		27	7,3	5,6	
≥45	51	92,9	24,4		48	39,3	20,2		47	9,4	4,8	10
EN				0,05*				0,16				0,06
Eutrófico	46	83	24,8		44	32,9	17,6		43	7,8	4,6	
Sobrepeso	15	99,8	22,4		14	43,6	18,7		14	7,5	2,5	
Obesidade	20	94,2	29,3		17	35,4	18,2		17	11,2	7,2	

O consumo de FV&L foi capaz de alterar a PON1, mas os efeitos diferem quando isolamos os grupos alimentares (Tab.2). O consumo de salada crua em uma frequência igual ou superior a 4 vezes por semana impactou em aumento significativo ($p < 0,05$) da PON1 em soro total. Já o maior consumo de V&L cozidos refletiu em um aumento da atividade arilesterase na fração HDL. Essa diferença não foi observada quando comparadas as frequências de consumo semanal de frutas (Tab.2).

Tabela 2: Análise da atividade arilesterase da PON1 (kU/L) em soro total, nas frações HDL e N-HDL, segundo o consumo alimentar em crianças entre 5 e 7 anos de idade, RS-Brasil, 2014 (n 81).

	SORO TOTAL				FRAÇÃO HDL				FRAÇÃO N-HDL			
	N	MÉDIA	DP	p	N	MÉDIA	DP	p	N	MÉDIA	DP	p
Consumo de Frutas				0,6				0,85				0,52
≤ 3 Vezes	31	90,8	26,6		29	35	19,5		29	8,1	4,2	
≥ 4 Vezes	50	87,7	26,2		46	35,8	17,5		45	8,9	5,8	
Consumo de salada crua				0,001*				0,14				0,27
≤ 3 Vezes	64	84,2	23,8		58	33,8	17,8		57	8,3	4,9	
≥ 4 Vezes	17	106,6	28,1		17	41,1	18,5		17	9,8	5,9	
Consumo de V&L Cozidos				0,1				0,05*				0,78
≤ 3 Vezes	69	86,9	23,5		63	33,8	16,8		62	8,5	5,3	
≥ 4 Vezes	12	100,1	37,7		12	44,5	22,9		12	9	4,9	

4. CONCLUSOES

Conclui-se que o consumo regular de salada crua relacionou-se a níveis mais elevados de atividade da PON1 já em crianças entre 5 e 7 anos de idade. O método desenvolvido para a dosagem da PON1 nas frações HDL e N-HDL permitiu uma abordagem inicial e deverá ser ajustado para reavaliação e emprego em futuras abordagens.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- SCHRADER, C. RIMBACH, G. Determinants of Paraoxonase 1 status: genes, drugs and nutrition. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 36, p. 5624-43, 2011.
- KLEEMOLA, P., *et al.* Dietary determinants of serum paraoxonase activity in healthy humans. **Atherosclerosis**, v. 160, p. 425-32, 2011.
- DANIELS, JA., *et al.* A randomised controlled trial of increasing fruit and vegetable intake and how this influences the carotenoid concentration and activities of PON-1 and LCAT in HDL from subjects with type 2 diabetes. **Cardiovascular Diabetology**. p. 13-16, 2014.
- HUEN, K., *et al.* Developmental changes in PON1 enzyme activity in young children and effects of PON1 polymorphisms. **Environmental Health Perspectives**, v. 117, n. 10, 2009.
- PANAGIOTAKOS, DB., *et al.* Consumption of fruits and vegetables in relation to the risk of developing acute coronary syndromes; the CARDIO2000 case-control study. **Nutr J**, v. 8, p. 2, 2003.
- JARVIK, GP, *et al.* Vitamin C and E intake is associated with increased paraoxonase activity. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. v. 22, p. 1329-1333, 2002.