

REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

GISELE QUEIROZ CARVALHO

**INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS DOS GENES
FADS E DO CONSUMO ALIMENTAR NO PERFIL
MATERNO DE ÁCIDOS GRAXOS POLI-
INSATURADOS ÔMEGA 3 E NO RESULTADO
OBSTÉTRICO**

VITÓRIA

2016

GISELE QUEIROZ CARVALHO

**INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS DOS GENES
FADS E DO CONSUMO ALIMENTAR NO PERFIL
MATERNO DE ÁCIDOS GRAXOS POLI-
INSATURADOS ÔMEGA 3 E NO RESULTADO
OBSTÉTRICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia ponto focal Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Iuri Drumond Louro

Coorientador: Prof. Dr. Djanilson Barbosa dos Santos

VITÓRIA

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade
Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

C331i Carvalho, Gisele Queiroz, 1984 -
Influência dos polimorfismos dos genes FADS e do consumo alimentar no perfil materno de ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 e no resultado obstétrico / Gisele Queiroz Carvalho – 2016.
217 f. : il.

Orientador: Iuri Drumond Louro.
Coorientador: Djanilson Barbosa dos Santos.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Nutrigenômica. 2. Polimorfismo de Nucleotídeo Único. 3. Ácidos Graxos Insaturados. 4. Gestantes. 5. Peso ao Nascer. 6. Idade Gestacional. I. Louro, Iuri Drumond. II. Santos, Djanilson Barbosa dos. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

GISELE QUEIROZ CARVALHO

**INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS DOS GENES
FADS E DO CONSUMO ALIMENTAR NO PERFIL
MATERNO DE ÁCIDOS GRAXOS POLI-
INSATURADOS ÔMEGA 3 E NO RESULTADO
OBSTÉTRICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia ponto focal Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Apresentada em 26 de setembro de 2016.

Prof. Dr. Iuri Drumond Louro (Orientador)
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof^a. Dr^a. Adriana Madeira Álvares da Silva
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof^a. Dr^a. Flávia de Paula
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof^a. Dr^a. Cristiane Cominetti
Universidade Federal de Goiás

Prof^a. Dr^a. Flavia Imbroisi Valle Errera
Escola Superior de Ciências da Santa Casa
de Misericórdia de Vitória

VITÓRIA

2016

ESTRUTURA DA TESE

Esta tese é apresentada em formato de Artigo Científico.

As listas de figuras, tabelas e siglas são referentes às ilustrações, tabelas e siglas apresentadas na introdução e na revisão de literatura deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, pela dedicação e amor. Por ser essa pessoa especial em minha vida, que incentiva e me fornece o suporte necessário para enfrentar os desafios.

Ao Nissandro, pelo amor, paciência, cumplicidade e apoio incondicionais, além de todo auxílio e suporte no desenvolvimento da Tese.

Aos meus irmãos, Christiano, Danielle, Fabrício e Guilherme, pelo carinho e incentivo.

Ao Ângelo, por todo apoio, carinho e generosidade. Obrigada por se fazer sempre presente e pronto para ajudar em todas as etapas desse trabalho!

Ao meu orientador, prof. Dr. Iuri Drumond Louro, pelos ensinamentos e por acreditar nesse trabalho, me incentivando e orientando adequadamente.

Ao meu coorientador, prof. Dr. Djanilson Barbosa dos Santos, pelos valiosos ensinamentos e, principalmente, por me convidar a integrar o NISAMI e me incentivar a seguir esse caminho no doutorado.

Ao Marcos, pelo auxílio na coleta de dados e por compartilhar experiências e dificuldades nessa trajetória.

Aos alunos do NISAMI, que, com compromisso, participaram da coleta e tabulação de dados.

À profa. Dra. Maria do Carmo Gouveia Peluzio, pelo carinho, generosidade e profícua parceria desde o meu mestrado. Obrigada por possibilitar a análise do perfil lipídico do plasma no Laboratório de Bioquímica Nutricional do Departamento de Nutrição da UFV.

Ao prof. Dr. Marcilio Delan Baliza Fernandes, por compartilhar seus conhecimentos, e permitir o uso do Laboratório de Genética da UFRB nas análises moleculares.

À Jerusa, pela generosidade em compartilhar seus conhecimentos, e pelo auxílio na análise estatística;

À Letícia (UFV), pelo apoio, amizade e auxílio nas análises do perfil lipídico do plasma.

À Lidiane e Elaine, pelo auxílio na padronização da metodologia de genotipagem. Em especial, à Lidiane, por compartilhar conhecimentos e pelo auxílio nas atividades finais de entrega da Tese.

À Lyvia e Jéssica que, com compromisso e generosidade, auxiliaram nas análises de genotipagem das amostras.

Ao Adriano e à Leda, do Laboratório Fernando Queiroz, por gentilmente cederem o local para a coleta de dados, e por permitirem a participação dos funcionários na coleta sanguínea.

Aos funcionários do Laboratório Fernando Queiroz, pelo acolhimento e cuidado direcionados aos integrantes do NISAMI e às gestantes do estudo durante a coleta de dados.

À prefeitura de Santo Antônio de Jesus - BA, aos funcionários das unidades de saúde da cidade, aos gestores e funcionários do hospital-maternidade Luís Argolo, por oportunizarem ambientes favoráveis para a coleta de dados.

À Taiana, pelo auxílio nas análises de extração de DNA genômico.

À profa. Dra. Patrícia Machado Bueno Fernandes, que permitiu o uso do Nanodrop no Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio para determinação da concentração e pureza do DNA genômico.

À Eldamária, pelo auxílio na análise estatística.

Às gestantes que participaram e, assim, permitiram o desenvolvimento do estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro para desenvolvimento desse trabalho.

À todos, que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento dessa Tese. Muito obrigada!

RESUMO

O perfil de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (LCPUFAs) em gestantes apresenta forte influência no risco de prematuridade e baixo peso ao nascer. A ingestão de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAS) e os polimorfismos dos genes das dessaturases (*FADS*) parecem influenciar as concentrações de LCPUFAs no sangue e em tecidos, mas os estudos são escassos em gestantes. Nesse estudo, foi objetivo avaliar a interação entre a ingestão de PUFAs durante a gestação e os genótipos maternos dos genes *FADS1* (rs174561) e *FADS2* (rs174575 e rs3834458) 1) no perfil materno de ácidos graxos poli-insaturados ômega 3; 2) na duração da gestação e 3) no peso da criança ao nascer. Foram avaliadas as gestantes participantes de uma coorte prospectiva de Santo Antônio de Jesus – BA, Brasil. Durante a gestação, foram realizadas a avaliação socioeconômica e de saúde e a coleta sanguínea. Para estimar a ingestão de PUFAS, foi desenvolvido e validado um questionário de consumo alimentar nutriente-específico. A identificação dos ácidos graxos plasmáticos foi realizada por cromatografia gasosa. A extração do DNA genômico foi realizada a partir do *buffy coat*, com kit comercial. Todas as amostras foram genotipadas com uso de ensaios TaqMan®, utilizando a discriminação alélica no equipamento de PCR em tempo real. Os desfechos gestacionais foram obtidos no Departamento de Vigilância Epidemiológica. Anova one way foi utilizada para comparar as médias das proporções plasmáticas de PUFAS n-3 segundo os genótipos, em cada tercil de ingestão de ácido α -Linolênico (ALA) e da razão ácido Linoléico/ácido α -Linolênico (LA/ALA). Análise de regressão linear foi utilizada para avaliação da interação gene-nutriente na duração da gestação e no peso ao nascer, ajustada para covariáveis. As frequências dos alelos variantes foram de 22,0% a 28,8% nas 250 gestantes avaliadas. Gestantes heterozigotas dos polimorfismos rs174561 e rs3834455 apresentavam menor ingestão de LA. Gestantes homozigotas para o alelo de menor frequência dos SNPs *FADS1* rs174561 (CC) e *FADS2* rs3834458 (Del/Del) apresentaram maiores concentrações plasmáticas de ALA no tercil mais alto de ingestão de ALA e da razão LA/ALA ($p < 0,05$). Para esses polimorfismos, EPA e DHA não foram afetados pela ingestão de ALA e da razão LA/ALA. Para o SNP rs174575, gestantes que carregavam o alelo de menor frequência apresentaram menores proporções de EPA

plasmático no segundo tercil de ingestão da razão LA/ALA, em comparação com as gestantes homozigotas para o alelo de maior frequência ($p < 0,05$). Não foi observada interação gene-nutriente no peso ao nascer para os três polimorfismos avaliados. Entretanto, nas gestantes heterozigotas (CG) do SNP rs174575 a duração da gestação se associou positivamente com a ingestão de ALA e negativamente com a ingestão de LA ($p < 0,05$). Foi possível concluir que o aumento da ingestão de ALA promove o acúmulo plasmático de ALA e parece não favorecer a conversão dos LCPUFAs ácido eicosapentaenoico (EPA) e DHA nas homozigotas de menor frequência dos polimorfismos rs174561 (CC) e rs3834458 (DelDel). A ingestão moderada da razão LA/ALA pode também reduzir as concentrações de EPA nas gestantes que carregavam o alelo de menor frequência do polimorfismo rs174575. Assim, o padrão alimentar caracterizado pela maior ingestão de ALA e redução da ingestão de LA pode ser benéfico, melhorando o perfil lipídico das gestantes. As heterozigotas do SNP rs174575 (CG) podem aumentar o tempo de gestação em resposta à maior ingestão de ALA e menor de LA. Em relação aos polimorfismos rs174561 e rs3834458, a ausência de interação gene-nutriente no peso ao nascer e na duração da gestação pode ter sido reflexo da insuficiente ingestão de PUFAs pelas gestantes que carregavam o alelo de menor frequência, o que dificultaria a observação clara de causalidade em relação aos desfechos. É provável que o nível de ingestão de PUFAs por essas gestantes não promova efeitos evidentes. Uma justificativa para o insuficiente consumo de PUFAs seria uma eventual influência dos genótipos *FADS* na percepção gustativa e na preferência de alimentos fontes de PUFAS, que deve ser investigada em estudos futuros.

Palavras-chave: Nutrigenômica. Polimorfismo de Nucleotídeo Único. Ácidos Graxos Insaturados. Gestantes. Peso ao Nascer. Idade Gestacional.

ABSTRACT

The status of long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFAs) has strong influence on prematurity and low birth weight risks. The polyunsaturated fatty acids intake (PUFA) and polymorphisms in fatty acid desaturases genes (*FADS*) seem to influence levels of LCPUFAs on blood and tissue, however studies with pregnant women are scarce. In this study, the objective was to evaluate the interaction between PUFA intake during pregnancy and *FADS1* (rs174561) and *FADS2* (rs174575 and rs3834358) genes maternal genotypes 1) on the maternal status of plasma LCPUFAs, 2) on the pregnancy duration and 3) on child birth weight. The pregnant women of a prospective cohort of Santo Antônio de Jesus – BA, Brazil, were evaluated. During pregnancy, socioeconomic, health evaluation and blood collection were performed. To estimate PUFA intake, a nutrient-specific food frequency questionnaire (FFQ) was developed and validated. Plasma lipids were extracted by Folch method and the fatty acids were identified by gas chromatography. Genomic DNA extraction was performed from buffy coat. All samples were genotyped with TaqMan® Assay using allelic discrimination on real-time PCR equipment. Pregnancy outcomes were obtained on the Department of Epidemiological Surveillance of the referred city. One-way ANOVA was used to compare the mean of plasma PUFA n-3 status according to the genotypes at each tertile of α -linolenic (ALA) and Linoleic acid/Linolenic acid (LA:ALA) Intake. Linear regression analysis was used to evaluate gene-diet interaction in the pregnancy duration and birth weight, adjusted for covariates. The linear regression, adjusted to covariable, was used on gene-diet interaction analysis. The minor allele frequency varied from 22,0% to 28,8% on 250 pregnancy women evaluated. Heterozygous pregnant women for rs174561 and rs3834458 polymorphisms have a lower intake of LA. Minor allele homozygote pregnant women for SNPs *FADS1* rs174561 (CC) and *FADS2* rs3834458 (Del/Del) exhibited higher plasma levels of ALA on the higher tertile of ALA intake and of LA/ALA intake ($P < 0,05$). For these polymorphisms, EPA and DHA were not affected by the intake of ALA and LA/ALA. For SNP rs174575, minor allele homozygote pregnant women exhibited lowest proportions of plasma EPA on second tertile of LA/ALA intake, in comparison with pregnant women homozygous for the major allele ($p < 0,05$). There was no gene-diet interaction in birth weight for the three polymorphisms evaluated. However, in heterozygous women (CG) for the SNP rs174575 the

duration of pregnancy was positively associated with ALA intake and negatively with the intake of LA ($p < 0.05$). In conclusion, the increase of ALA intake promotes accumulation of ALA plasma and seems not promote the conversion of LCPUFAs EPA and DHA in pregnant homozygotes for the minor allele for rs174561 and rs3834458. The moderate intake of LA/ALA may also reduce EPA levels in pregnant women who carried the minor allele of polymorphism rs174575. Thus, dietary patterns characterized by higher intake of ALA and LA reduced intake can be beneficial by improving the lipid profile of pregnant women. Heterozygous for the SNP rs174575 (CG) can increase the time of pregnancy in response to higher intake of ALA and lower intake of LA. Regarding the polymorphisms rs174561 and rs3834458, the lack of diet-gene interaction on birth weight and pregnancy duration may have been a reflection of insufficient intake of PUFAs by pregnant women who carried the minor allele, which would hinder the clear observation of causality in relation to outcomes. Probably, the level of PUFA intake by these pregnant women does not promote evident effects. A hypothesis for the insufficient PUFAs intake would be an influence of *FADS* genotypes on taste perception and preference of food source of PUFAs, that should be investigated in future studies.

Key-words: Nutrigenomics. Single Nucleotide Polymorphism. Unsaturated Fatty Acids. Pregnant Women. Birth Weight. Gestational Age.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Metabolismo de PUFAS n-3 e n-6. São mostrados os genes que codificam as enzimas dessaturases e os derivados eicosanoides do metabolismo.....27
- Figura 2.** Representação esquemática dos genes *FADS1*, *FADS2* e *FADS3*, localizados no cromossomo 11, com organização de éxons / íntrons e localização de alguns SNPs.....36
- Figura 3.** Diagrama causal da prematuridade e do baixo peso ao nascer relacionado ao metabolismo de ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 e 6, sendo a) variável independente: consumo de PUFAS; b) modificador de efeito: polimorfismos dos genes das dessaturases (*FADS*).....41
- Figura 4.** Fluxograma do desenho do estudo conduzido com gestantes adultas atendidas no serviço público de saúde pré-natal de Santo Antônio de Jesus, Bahia, Brasil, 2016.49
- Figura 5.** Fluxograma de aplicação dos questionários de consumo alimentar em gestantes atendidas no serviço público de saúde pré-natal de Santo Antônio de Jesus, Bahia, Brasil, 2016.....50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação do peso ao nascer e duração da gestação, segundo recomendações da Organização Mundial da Saúde.....	22
Tabela 2. Proporção de nascidos vivos (%) de baixo peso, por tempo de gestação, segundo regiões do Brasil, 1996, 2000, 2004 e 2007.	23
Tabela 3. Características das variantes dos genes <i>FADS1</i> e <i>FADS2</i> em uma coorte de gestantes do NISAMI, 2015.....	52
Tabela 4. Composição das reações de 20 µL para genotipagem de SNPs utilizando Ensaios TaqMan® pré-desenhados em equipamento de PCR em tempo real	54
Tabela 5. Condições de termociclagem para genotipagem de SNPs utilizando Ensaios TaqMan® pré-desenhados e customizados.	54
Tabela 6. Contribuição percentual do consumo total de ácidos graxos e energia dos alimentos que compõem o QFA do Estudo de Validação do Questionário de Frequência de Alimentos para gestantes adultas (n = 49), em Santo Antônio de Jesus, Bahia, Brasil, 2015.....	59

LISTA DE SIGLAS

A	Adenina
AA	Ácido Araquidônico – 20:4 (n-6)
ALA	Ácido α -Linolênico – 18:3 (n-3)
BPN	Baixo peso ao nascer
C	Citosina
D5D	Índice delta-5 dessaturase
D6D	Índice delta-6 dessaturase
DGLA	Ácido Dihomo- γ -linoléico – 20:3 (n-6)
DHA	Ácido Docosa-hexaenoico – 22:6 (n-3)
DPA	Ácido Docosapentaenoico – 22:5 (n-3)
DUM	Data da última menstruação
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EPA	Ácido Eicosapentaenoico – 20:5 (n-3)
FABP	Proteínas de ligação de ácidos graxos (do inglês: <i>fatty acid-binding proteins</i>)
FABPpm	Proteína de ligação de ácidos graxos da membrana plasmática (do inglês: <i>membrane fatty acid binding protein</i>)
<i>FADS1</i>	Gene das dessaturases de ácidos graxos 1 (do inglês: <i>Fatty Acid Dessaturase 1</i>)
<i>FADS2</i>	Gene das dessaturases de ácidos graxos 2 (do inglês: <i>Fatty Acid Dessaturase 2</i>)
<i>FADS3</i>	Gene das dessaturases de ácidos graxos 3 (do inglês: <i>Fatty Acid Dessaturase 3</i>)
FAT	Translocase de ácidos graxos (do inglês: <i>Fatty Acid Translocase</i>)
FATP	Proteínas de transporte de ácidos graxos (do inglês: <i>Fatty Acid Transport Protein</i>)
G	Guanina
HIV	Vírus da Imunodeficiência Adquirida (do inglês: <i>Human Immunodeficiency Virus</i>)

IMC	Índice de Massa Corporal
LA	Ácido Linoléico – 18:2 (n-6)
LCPUFA	Ácido graxo poli-insaturado de cadeia longa (do inglês: <i>Long-chain polyunsaturated fatty acid</i>)
LoA	Limites de concordância (do inglês: <i>Limits of Agreement</i>)
MAF	Menor Frequência Alélica (do inglês: <i>Minor Allele Frequency</i>)
MUFA	Ácidos graxos monoinsaturados (do inglês <i>Monounsaturated fatty acid</i>)
n-3	Ômega 3
n-6	Ômega 6
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa B (do inglês: <i>Nuclear factor kappa B</i>)
NISAMI	Núcleo de Investigação em Saúde Materno Infantil
OMS	Organização Mundial da Saúde
PUFA	Ácido graxo poli-insaturado (do inglês: <i>Polyunsaturated fatty acid</i>)
QFA	Questionário de frequência alimentar
R24h	Recordatório alimentar de 24 horas
R24h1	Primeiro recordatório alimentar de 24 horas
R24h2	Segundo recordatório alimentar de 24 horas
R24h3	Terceiro recordatório alimentar de 24 horas
RCIU	Restrição no crescimento intrauterino
SG	Semanas gestacionais
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único (do inglês: <i>Single-nucleotide polymorphism</i>)
T	Timina
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UV	Ultravioleta
VIEP	Departamento de Vigilância Epidemiológica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos Específicos	20
3 REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1 Baixo peso ao nascer	21
3.2 Ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa na saúde humana .	24
3.3 Perfil materno de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa e crescimento fetal	29
3.4 Polimorfismos dos genes das dessaturases (FADS)	34
3.6 Interação gene-nutriente na gestação	39
4 MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1 Desenho do estudo	47
4.2 Local do estudo	47
4.3 População de estudo	47
4.4 Coleta de dados	48
4.5 Avaliação antropométrica e cálculo da idade gestacional	50
4.6 Coleta sanguínea	51
4.7 Análise molecular	52
4.7.1 Seleção dos SNPs	52
4.7.2 Extração de DNA genômico	52
4.7.3 Determinação da concentração e pureza das amostras de DNA	53
4.7.4 Genotipagem	53
4.8 Perfil plasmático de ácidos graxos poli-insaturados	55
4.8.1 Extração dos lipídeos	55
4.8.2 Identificação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos	56
4.9 Ingestão de ácidos graxos poli-insaturados	56
4.9.1 Recordatório alimentar de 24 horas	56
4.9.2 Questionário de frequência alimentar	57
4.9.3 Análise da ingestão de nutrientes	60

4.10 Desfechos gestacionais	61
4.11 Variáveis independentes	61
4.11.1 <i>Ingestão de ácidos graxos poli-insaturados na gestação</i> ...	62
4.11.2 <i>Polimorfismos genéticos maternos</i>	61
4.12 Variáveis dependentes	62
4.12.1 <i>Ácidos graxos plasmáticos maternos</i>	62
4.12.2 <i>Peso da criança ao nascer e duração da gestação</i>	63
4.13 Variáveis de concomitantes.....	63
4.14 Processamento dos dados e plano de análise.....	63
4.15 Aspectos Éticos	63
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
6 ARTIGOS DERIVADOS DA TESE	85
6.1 Manuscrito 1	85
6.2 Manuscrito 2.....	110
6.3 Manuscrito 3.....	110
6.4 Manuscrito 4.....	141
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	197
ANEXO 1	200
APÊNDICE A.....	204
APÊNDICE B.....	210
APÊNDICE C	211
APÊNDICE D	215

1 INTRODUÇÃO

Fatores ambientais e genéticos, nos períodos pré-gestacional e durante a gestação, podem ser determinantes na saúde da criança e da mãe, e influenciar o resultado gestacional. O desfecho gestacional inadequado apresenta importante relevância biológica, e sua magnitude implica em grande impacto no âmbito social à medida que aumenta os gastos em saúde pública (WHO, 2011; VICTORA et al., 2008). O baixo peso ao nascer (BPN), que pode ser consequência do nascimento pré-termo ou da restrição no crescimento intrauterino, ou de ambos (WHO, 2011), é um dos principais determinantes da saúde infantil, relacionado com maior morbidade e mortalidade neonatal e infantil (WENNERSTRÖM et al., 2015; LUCA et al., 2015), diminuição do crescimento e do desenvolvimento cognitivo (ISLAM, 2015), além de se associar com o desenvolvimento de doenças crônicas na vida adulta (VALENTE et al., 2015; JUONALA et al., 2015).

As alterações na nutrição materna podem influenciar o resultado obstétrico, no que diz respeito à duração da gestação e ao crescimento fetal. Dentre os fatores nutricionais relevantes para o crescimento fetal está o status materno de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (LCPUFAs) das séries ômega 3 (n-3) e ômega 6 (n-6). Os LCPUFAs n-3 são os que mais se destacam quanto aos benefícios à saúde materna e da criança, e apresenta importante função no desenvolvimento cerebral e da retina do feto (INNIS, 2014; INNIS, 2007), na menor incidência de alergias e doenças asmáticas em crianças durante a infância (GUNARATNE et al., 2015; NOAKES et al., 2012; OLSEN et al., 2008) e na prevenção de doenças crônicas (ZHAO et al., 2014).

Alguns autores também associam o perfil materno de LCPUFAs n-3 e n-6 com a promoção do crescimento fetal e a duração da gestação (GOULD et al., 2016; KAR et al., 2016; CHRISTIAN et al., 2016; CHEN et al., 2016; CARLSON et al., 2013), embora as evidências sejam contraditórias (HARRIS et al., 2015; SACCONI et al., 2015; CARLSEN et al., 2013). De modo geral, maiores concentrações de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) da série n-3 na gestação, em especial o ácido docosa-hexaenoico (DHA), estão relacionadas com melhor resultado obstétrico, enquanto os da série n-6 parecem influenciar negativamente os desfechos

gestacionais (BEST et al., 2016; KAR et al., 2016; GUNARATNE et al., 2015; HARRIS et al., 2015; ZHAO et al., 2014; CARLSON et al., 2013; NOAKES et al., 2012; INNIS, 2007; INNIS, 2014).

O perfil de LCPUFAs em tecidos e no plasma é determinado pelo consumo alimentar ou pela conversão endógena no fígado, na presença de seus precursores, os ácidos graxos α -linolênico (ALA, 18:3 n-3) e linoleico (LA, 18:2 n-6). Essa via de conversão dos ácidos graxos poli-insaturados que possuem 18 carbonos, para a formação de LCPUFAs, que possuem de 20 a 22 carbonos, envolve a ação das enzimas alongases e dessaturases. As duas principais enzimas envolvidas no processo de dessaturação são a delta-5 e a delta-6 dessaturases (LATTKA et al., 2010b; TU et al., 2010). No período intrauterino e até os seis meses após o nascimento, a criança depende fundamentalmente da transferência materna de LCPUFAs pelo cordão umbilical e pelo leite materno (DIRIX et al., 2009b; XIE E INNIS, 2008). Isso porque a placenta não possui as enzimas delta-5 e delta-6 dessaturases para converter os ácidos graxos essenciais ALA e LA em LCPUFAs, e a atividade enzimática no feto e na criança menor de seis meses é muito limitada (HANE BUTT et al., 2008).

A conversão endógena de LCPUFAs, embora seja dependente do consumo alimentar de ácidos graxos, também pode ser influenciada por variantes genéticas (KOLETZKO et al., 2011; LU et al., 2010). As variações nas sequências do DNA são comuns, e podem se apresentar de várias formas. Quando essa variação ocorre em frequência maior que 1% na população é chamada de polimorfismo. Dependendo da região de ocorrência, pode afetar a transcrição gênica, quando presente nas regiões promotoras ou reguladoras do gene, ou alterar a estrutura e a função da proteína, quando ocorre nas regiões de éxons. Ao contrário do que se pressupõe, os polimorfismos que ocorrem em regiões não traduzidas, como os íntrons e próximo às junções íntron-éxons, podem apresentar grande relevância, caso afetem a estabilidade do RNAm ou o processo de splicing de DNA (BALASUBRAMANIAN et al., 2004).

Variantes genéticas que influenciam o metabolismo de LCPUFAs estão sendo estudadas, como as dos genes das dessaturases de ácidos graxos 1 (*FADS1*) e 2 (*FADS2*) (KOLETZKO et al., 2011; LU et al., 2010). Autores sugerem que indivíduos homocigotos para o alelo de menor frequência (mm) apresentam menor atividade

das enzimas dessaturases, e, por isso, menor conversão endógena de LCPUFAs (LATTKA et al., 2013; HONG et al., 2013; KOLETZKO et al., 2011). Alguns autores não encontraram associação (HONG et al., 2013) ou mostraram relação inversa (LATTKA et al., 2013) entre alguns SNPs dos genes *FADS* e as concentrações de LCPUFAs, o que aumenta a necessidade de mais estudos de associação sobre o assunto.

Os estudos que relacionam nutrição e genética são recentes e parecem propor uma nova perspectiva na compreensão de condições e agravos multifatoriais (DOO e KIM, 2015; VAHID et al., 2015). Segundo Chilton et al. (2014), o padrão de consumo de PUFAS e a frequência das variantes dos genes *FADS* em determinadas populações pode explicar a maior suscetibilidade e gravidade de certas doenças, como as doenças cardiovasculares, em grupos específicos. Entretanto, os estudos foram controversos ao tentarem verificar se os genótipos *FADS* modulam a relação entre ingestão e perfil sanguíneo de PUFAS (GILLINGHAM et al., 2013; KOLETZKO et al., 2011; MOLTÓ-PUIGMARTÍ et al., 2010).

Em geral, indivíduos carreadores do alelo de menor frequência (Mm ou mm), comumente associado à menor atividade das enzimas dessaturases, costumam se beneficiar da maior ingestão ou suplementação de ALA (HELLSTRAND et al., 2014; GILLINGHAM et al., 2013; HELLSTRAND et al., 2012) e, principalmente, de DHA (GONZALEZ-CASANOVA et al., 2016; SCHOLTZ et al., 2015; MOLTÓ-PUIGMARTÍ et al., 2014; AL-HILAL et al., 2013). Entretanto, os genótipos de melhor eficiência de conversão de LCPUFAs também parecem modular a relação entre consumo de PUFAS e o desenvolvimento de doenças. É provável que, em resposta à maior razão LA/ALA na alimentação, a ativação da via de conversão endógena dos ácidos graxos n-6 seja potencializada nesse genótipo, e resulte na menor conversão endógena de DHA em razão da competição enzimática dos substratos LA e ALA (CHILTON et al., 2014).

Estudos já investigaram a interação entre as variantes dos genes *FADS* e a ingestão de PUFAS na modulação do perfil de LCPUFAs no organismo (SCHOLTZ et al., 2015; AL-HILAL et al., 2013; HARSLØF et al., 2013; CORMIER et al., 2012; GILLINGHAM et al., 2012; HELLSTRAND et al., 2012; LATTKA et al., 2011; MOLTÓ-PUIGMARTÍ et al., 2010) das concentrações de lipídeos séricos (HELLSTRAND et

al., 2012; STANDL et al., 2012; LU et al., 2010), do desenvolvimento de doenças cardiovasculares (HELLSTRAND et al., 2014) e do quociente de inteligência de crianças (STEER et al., 2013). Entretanto, pouco se sabe sobre a modulação dos polimorfismos maternos dos genes *FADS* na relação entre ingestão materna de ácidos graxos poli-insaturados e resultado obstétrico (GONZALEZ-CASANOVA et al., 2016; MOLTÓ-PUIGMARTÍ et al., 2014).

Koletzko et al. (2011) discutiram sobre a necessidade de mais estudos que avaliem a associação entre os genótipos *FADS*, concentrações circulantes de PUFAS, e desenvolvimento infantil, a fim de verificar a relevância biológica das concentrações de ácidos graxos gene-dependentes. Apesar de escassos, a maioria dos estudos com gestantes sugere que as variantes genéticas dos genes *FADS1* e *FADS2* influenciam as concentrações de LCPUFAs no plasma materno, alterando a disponibilidade desses nutrientes para a criança, o que poderia interferir no seu crescimento e desenvolvimento (KOLETZKO et al., 2011; LATTKA et al., 2010b; VAN EIJSDEN et al., 2009). Até o momento, foram encontrados apenas dois estudos que avaliaram a interação entre genes *FADS* e ingestão de PUFAS durante a gestação nos resultados obstétricos (GONZALEZ-CASANOVA et al., 2016; MOLTÓ-PUIGMARTÍ et al., 2014), e apenas cinco SNPs foram investigados.

Os polimorfismos s174561 (*FADS1*), rs174575 e rs3834458 (*FADS2*) tem sido relacionados com alterações nas concentrações de LCPUFAs em crianças, gestantes e lactantes (KOLETZKO et al., 2011; MOLTÓ-PUIGMARTÍ et al. 2010; RZEHAK et al., 2010; XIE E INNIS, 2008), mas ainda não foram testados em gestantes quanto a interação gene-nutriente no peso da criança ao nascer e na duração da gestação. Em geral, os alelos de menor frequência dos SNPs rs174575 (*FADS2*) e rs174561 (*FADS1*) são associados à menor atividade das dessaturases, caracterizados por maiores concentrações de LA e ALA, e menores de AA, EPA e DHA (AL-HILAL et al., 2013; GILLINGHAM et al., 2013; STEER et al., 2012). Quanto ao polimorfismo rs3834458, sugere-se efeito protetor da presença do alelo de menor frequência, já que a concentração de DHA seria maior nos carreadores desse alelo (STEER et al., 2013; HARSLØF et al., 2013), embora esse resultado não seja consenso (DING et al., 2016; SCHUCHARDT et al., 2016; YEATES et al., 2015).

A escassez de conhecimento sobre o tema na população materno-infantil e o limitado número de SNPs investigados nesse grupo, nos mostra um interessante direcionamento para estudos sobre saúde do recém-nascido. Os genótipos maternos dos genes *FADS* aparecem como potenciais modificadores de efeito na relação entre consumo de PUFAS e resultado obstétrico, o que pode explicar a variabilidade dos resultados de estudos de associação. Assim, o presente estudo pretende contribuir com discussões sobre o tema, de modo a permitir melhor conhecimento nesse campo, considerando os fatores relacionados com o perfil genético de populações específicas, como a população brasileira, em especial, a população gestante do Recôncavo da Bahia.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a interação entre consumo de ácidos graxos poli-insaturados durante a gestação e os polimorfismos maternos dos genes *FADS1* (rs174561) e *FADS2* (rs174575 e rs3834458) no perfil plasmático materno de ácidos graxos poli-insaturados da série ômega 3, no peso da criança ao nascer e na duração da gestação.

2.2 Objetivos Específicos

- _ Validar um Questionário de Frequência Alimentar semiquantitativo nutriente-específico para estimativa da ingestão de ácidos graxos poli-insaturados por gestantes.
- _ Verificar se as concentrações plasmáticas de ácidos graxos poli-insaturados da série ômega 3 das gestantes são modificadas pela interação entre ingestão materna de ácido α -linolênico ou da razão ácido linoléico/ácido α -linolênico (LA/ALA) e os genótipos maternos dos genes *FADS*.
- _ Investigar a interação entre consumo de ácidos graxos poli-insaturados durante a gestação e os genótipos maternos dos genes *FADS* no peso da criança ao nascer e na duração da gestação.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Baixo peso ao nascer

O baixo peso ao nascer (BPN) é um dos principais determinantes da saúde infantil, relacionado com maior morbidade e mortalidade neonatal e infantil (WENNERSTRÖM et al., 2015; LUCA et al., 2015), diminuição do crescimento e do desenvolvimento cognitivo (ISLAM, 2015), além de se associar com o desenvolvimento de doenças crônicas na vida adulta (VALENTE et al., 2015; JUONALA et al., 2015). Concomitante à relevância biológica, sua magnitude implica em importante impacto no âmbito social à medida que aumenta os gastos em saúde pública, já que pode afetar até mesmo a saúde do indivíduo em longo prazo, na vida adulta (WHO, 2011; VICTORA et al., 2008).

Conceitualmente, o BPN caracteriza-se pelo peso ao nascer inferior a 2.500 g (**Tabela 1**), aferido, preferencialmente, durante a primeira hora de vida do recém-nascido. Esse ponto de corte é baseado em resultados de observações epidemiológicas, nas quais crianças com peso inferior a 2.500 gramas ao nascer apresentavam risco de mortalidade 20 vezes maior que crianças mais pesadas (UNICEF e WHO, 2004, KRAMER, 1987).

Considerado importante preditor da sobrevida infantil, frequências elevadas de BPN estão associadas a menores níveis de desenvolvimento socioeconômico e piores níveis de assistência pré-natal. Estimava-se que anualmente, no mundo, em torno de 15,5 % de todos os nascimentos caracterizam-se por conceitos com BPN, o que equivale a mais de 20 milhões de crianças, a maioria em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento (WHO, 2011). São considerados internacionalmente aceitáveis valores inferiores a 10%, sendo encontradas proporções em torno de 6% em países desenvolvidos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012a).

No Brasil, houve crescimento da proporção de nascidos vivos com BPN em todas as regiões no período de 1996 a 2007 (**Tabela 2**), sendo, em 2007, verificada a proporção de 8,3% no país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012a). As regiões brasileiras

com melhores indicadores socioeconômicos, como o Sul e o Sudeste, são aquelas cujas proporções de BPN são maiores, o que ainda suscita a necessidade de estudos adicionais para melhor compreensão. Segundo a Organização Mundial da Saúde, vários partos ocorrem em casa ou em pequenas clínicas (WHO, 2014), de forma que baixos valores desse indicador em áreas menos desenvolvidas podem estar relacionados ao sub-registro ou à baixa qualidade das informações (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012a; WHO, 2014).

Tabela 1. Classificação do peso ao nascer e duração da gestação, segundo recomendações da Organização Mundial da Saúde.

Peso ao nascer

Macrossomia: ≥ 4.000 g

Peso adequado: 3.000 g a 3.999 g

Baixo peso: < 2.500 g

Peso muito baixo ao nascer: < 1.500 g

Peso extremamente baixo ao nascer: 1000 g

Duração da gestação

A termo: 37 semanas gestacionais (SG) a 42 SG incompletas (259 a 293 dias após a DUM)

Pós-termo: ≥ 42 SG (294 dias ou mais após a DUM)

Pré-termo: < 37 SG (< 259 dias após a DUM)

Prematuridade Limítrofe: 28 – 32 SG

Prematuridade moderada: 32 a 37 SG

Prematuridade extrema: < 28 SG

Fonte: UNICEF e WHO (2004); BLENCOWE et al. (2012).

O BPN pode ser consequência do nascimento pré-termo ou da restrição no crescimento intrauterino (RCIU), ou de ambos. O nascimento pré-termo é caracterizado pelo nascimento antes de se completar 37 semanas gestacionais (WHO, 2011), ou 259 dias desde o primeiro dia da Data Última Menstruação (DUM) (**Tabela 1**), e resulta na formação e desenvolvimentos incompletos de estruturas e órgãos da criança, com importante influência na formação das estruturas cerebrais e do sistema visual (MICHALCZUK et al., 2015). Associado com complicações ao nascer, o BPN é considerado importante causa de mortalidade infantil, sendo a

idade gestacional ao nascer inversamente proporcional ao risco de morbidade e mortalidade neonatal (BLENCOWE et al., 2012).

Tabela 2. Proporção de nascidos vivos (%) de baixo peso, por tempo de gestação, segundo regiões do Brasil, 1996, 2000, 2004 e 2007.

Região	Pré-termo				A termo ou pós-termo				Total			
	1996	2000	2004	2007	1996	2000	2004	2007	1996	2000	2004	2007
Brasil	45,9	52,3	62,4	61,1	5,2	4,4	4,4	4,5	7,9	7,7	8,2	8,3
Norte	31,7	42,1	54,9	53,4	4,8	3,9	4,4	4,8	6,5	6,3	7,0	7,0
Nordeste	31,7	45,1	60,9	60,3	5,2	4,1	4,3	4,4	7,1	6,8	7,5	7,5
Sudeste	60,9	56,4	64,7	61,9	5,8	4,8	4,6	4,6	8,8	8,6	9,1	9,1
Sul	59,5	57,9	64,5	62,2	5,0	4,3	4,2	4,2	7,8	8,1	8,6	8,7
Centro-Oeste	58,9	53,0	57,7	63,6	5,0	4,0	3,7	3,7	7,2	7,1	7,6	7,6

Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE (2012a).

Estima-se que 15 milhões de crianças nasçam prematuras, e 1,1 milhão de crianças morram todos os anos em decorrência de complicações do nascimento pré-termo. Considerando dados de 2010, o Brasil está na décima posição entre os países com maior número absoluto de nascimentos pré-termo, com 279.256 crianças, o que equivale a 1,9% do total mundial de nascimentos prematuros e a 9,2% do total de nascidos vivos no país (BLENCOWE et al., 2012). Dados do DataSUS revelam que na Bahia, no período de 2011, 8,4 % das crianças nascidas vivas apresentaram BPN. Dessas, 36,9 % eram crianças pré-termo, o que sugere a existência de outros fatores ambientais com grande influência na restrição do crescimento intrauterino dessas crianças (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012b).

A RCIU pode ocorrer em qualquer momento da gestação, resultando em uma criança pequena para a idade gestacional (< percentil 10 de peso para idade gestacional) (WHO, 2011; WHO, 2006). Sua ocorrência é mais comum em países subdesenvolvidos, especialmente nas populações mais vulneráveis (WHO, 2014). Crianças pequenas para a idade gestacional apresentam maior risco de mortalidade neonatal, sendo maior o risco quando associado à prematuridade (KATZ et al., 2013). A principal causa de RCIU é a insuficiência placentária, mas outros fatores

podem ser responsáveis por essa condição, como anormalidades congênitas, infecções, uso de drogas ou uso indevido de outras substâncias (FIGUERAS e CARDOSI, 2011), e os fatores ambientais (UNICEF e WHO, 2004).

De modo geral, independente de se tratar de uma criança prematura ou com RCIU, ou ambos, o crescimento fetal insuficiente é, provavelmente, resultado de múltiplos fatores, e não apenas de uma causa específica (WHO, 2006). Esses fatores podem ser ambientais e ou relacionados à mãe ou à criança, e incluem: multiparidade, primiparidade, estilo de vida (uso de álcool e drogas, tabagismo), complicações durante a gestação (infecções, hipertensão arterial, malformação da placenta, restrição do fluxo sanguíneo na placenta e cordão umbilical), condições socioeconômicas, nível de atividade física materno, nutrição materna, fatores genéticos maternos ou fetais (UNICEF e WHO, 2004).

O estado nutricional e o consumo alimentar da gestante estão entre os principais fatores ambientais de risco obstétrico (YOUNG et al., 2015; DIRIX et al., 2009b). A deficiência ou o consumo excessivo de algum nutriente durante a gestação pode apresentar impacto direto na saúde da criança durante o período intrauterino, ou mesmo após o nascimento (ALWAN et al., 2015; SALAM et al., 2014). Os fatores nutricionais comumente relacionados com o peso ao nascer são consumo energético, composição corporal, ganho de peso gestacional, deficiência de ferro / anemia, consumo de antioxidantes, padrão e suplementação de aminoácidos, ingestão de retinoides e de lipídios (WHO, 2006). Destaca-se o consumo alimentar de lipídeos, em especial do ácido docosa-hexaenoico (DHA), o qual parece modular o crescimento fetal. Segundo alguns autores, os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (LCPUFAs) são importantes determinantes nutricionais do resultado obstétrico favorável (GRIEGER e CLIFTON, 2015; ZHAO et al., 2014).

3.2 Ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa na saúde humana

O perfil e o conteúdo de ácidos graxos presentes no sangue e em tecidos são importantes determinantes da saúde do indivíduo, uma vez que a composição de

ácidos graxos no organismo pode modular o risco de desenvolvimento de várias doenças (SU et al., 2015; YOSHIARA et al., 2015; JAUREGUIBERRY et al., 2014). As doenças cardiovasculares estão entre aquelas cuja etiologia e fatores de risco são dependentes da composição lipídica no soro, plasma ou tecido (YOSHIARA et al., 2015; WILLETT, 2012; CASCIO, 2012). Tem sido bem documentado o efeito deletério da ingestão excessiva de ácidos graxos saturados e trans para a saúde do indivíduo (MORI et al., 2015; DE SOUZA et al., 2015). Entretanto, o consumo de ácidos graxos insaturados tem sido motivo de diversas discussões no meio acadêmico, já que apresenta diferentes efeitos fisiológicos no organismo dependendo da sua estrutura química (DE LORGERIL e SALEN, 2012; ZEGHICHI-HAMRI et al., 2010).

Existem duas grandes famílias de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) de importância biológica, as quais diferem em relação à posição da última dupla ligação, considerando a terminação metil da cadeia carbônica como o final da estrutura química desse ácido graxo. Os ácidos graxos ômega 3 (n-3) possuem a última dupla ligação no carbono 3, enquanto os ácidos graxos da família ômega 6 (n-6) possuem a última dupla ligação no carbono 6 (PATTERSON et al., 2012).

Os ácidos graxos α -linolênico (ALA, 18:3 n-3) e linoleico (LA, 18:2 n-6) são considerados essenciais, pois o organismo não consegue inserir duplas ligações no terceiro e sexto carbonos, a partir da terminação metil, em razão da ausência das enzimas delta-15 e delta-12 dessaturases, respectivamente (JANSSEN e KILIAAN, 2014; PATTERSON et al., 2012). Assim, esses ácidos graxos devem ser supridos pela alimentação a fim de garantir o *pool* adequado no organismo (JANSSEN e KILIAAN, 2014). As principais fontes alimentares de ALA e LA são os óleos extraídos de sementes e oleaginosas. Óleos de semente de linho, de canola e de soja são importantes fontes de ALA, enquanto os óleos de girassol, de cártamo, de milho, de soja, de amendoim e de palma são boas fontes de LA (GUNARATNE et al., 2015; HUFFMAN et al., 2011; WALL et al., 2010; MEYER et al., 2000).

Os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (LCPUFAs) são as formas ativas dos ácidos graxos n-3 e n-6 no organismo, e podem ser obtidos por meio da alimentação, ou por meio de síntese endógena hepática a partir do ALA ou do LA, respectivamente (Yeates et al., 2015). Por LCPUFAs entende-se os ácidos graxos

com mais de 20 carbonos, com número de duplas ligações cis maior ou igual a três, das séries n-3 ou n-6 (MUSKIET et al., 2006). Os principais LCPUFAs são o ácido araquidônico (AA; 20:4; n-6), o ácido eicosapentaenoico (EPA; 20:5; n-3) e ácido docosa-hexaenoico (DHA; 22:6; n-3) (XIE E INNIS, 2008). Os LCPUFAs da série n-3 EPA e DHA estão presentes em algas e alimentos de origem animal, principalmente peixes de águas frias e profundas; o AA, principal LCPUFA n-6, pode ser encontrado em carnes, aves e ovos (GUNARATNE et al., 2015; HUFFMAN et al., 2011; WALL et al., 2010; MEYER et al., 2000).

A via de conversão dos ácidos graxos poli-insaturados que possuem 18 carbonos, para a formação de LCPUFAs, que possuem de 20 a 22 carbonos, envolve a ação das enzimas elongases e dessaturases (Lattka et al., 2010b; TU et al., 2010) (**Figura 1**). O processo de alongação consiste no aumento da cadeia carbônica do ácido graxo; e o de dessaturação na inserção de duplas ligações na cadeia carbônica. As duas principais enzimas envolvidas no processo de dessaturação são a delta-5 e a delta-6 dessaturases (Lattka et al., 2010b; TU et al., 2010).

Para conversão dos ácidos linoleico e α -linolênico dietéticos em AA e EPA, respectivamente, são necessárias três etapas enzimáticas, sendo duas etapas de dessaturação reguladas pelos genes *FADS2* e *FADS1*, nessa ordem (**Figura 1**). A conversão de EPA a DHA exige mais três etapas enzimáticas, sendo uma etapa de dessaturação regulada pelo gene *FADS2*, e uma etapa de beta-oxidação (CHILTON et al., 2014; GUILLOU et al., 2010; HESTER et al., 2014; SPRECHER, 1981). Por compartilharem a mesma via metabólica, ALA e LA competem na primeira etapa do processo de alongação para a conversão de LCPUFAs, enquanto AA e EPA competem pelas enzimas ciclo-oxigenases e lipoxigenases na via de conversão dos eicosanoides (CHILTON et al., 2014, HESTER et al., 2014; PATTERSON et al., 2012).

Depois de ingeridos ou metabolizados pelo organismo a partir de seu substrato, os LCPUFAs são incorporados nos tecidos, compondo principalmente as membranas celulares, determinando várias funções biológicas no organismo, dependendo do tipo de ácido graxo incorporado. Alterações na composição dos receptores da membrana citoplasmática, no sistema de transdução de sinais, na atividade dos

canais iônicos, ou nos efeitos na expressão gênica podem explicar as alterações nas funções biológicas segundo tipo de ácido graxo (INNIS, 2003).

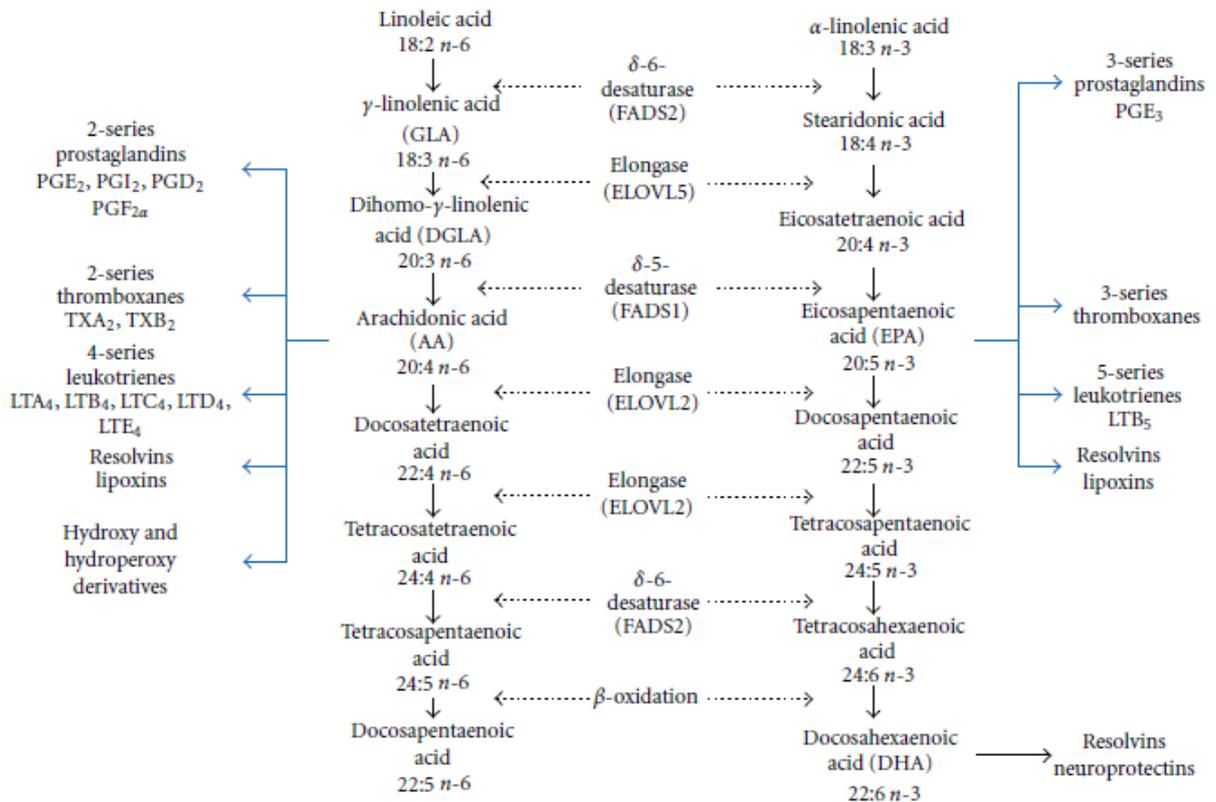


Figura 1. Metabolismo de PUFAS n-3 e n-6. São mostrados os genes que codificam as enzimas dessaturases e os derivados eicosanoides do metabolismo.

Formas dietéticas: Ácido linoleico e ácido α-linolênico; Formas ativas: ácido araquidônico (AA), ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosahexaenoico (DHA).

Fonte: PATTERSON et al., (2012).

Os LCPUFAs estão envolvidos na regulação da resposta imunológica e dos processos inflamatórios, uma vez que são substratos para a produção de mediadores eicosanoides, como as prostaglandinas e os leucotrienes (PATTERSON et al., 2012). Os LCPUFAs n-6 possuem propriedades pró-inflamatórias, pois estimulam a produção de prostaglandinas da série 2 e de leucotrienes da série 4, que são mais inflamatórias. Por isso, os ácidos graxos n-6, em especial o ácido araquidônico, tem sido associados ao maior risco de desenvolvimento ou agravamento de doenças que envolvem processos inflamatórios, como câncer, doenças cardiovasculares, artrite reumatoide, doença inflamatória intestinal, além de

doenças psiquiátricas e neurodegenerativas (PATTERSON et al., 2012; WALL et al., 2010).

Por outro lado, os LCPUFAs n-3 são considerados anti-inflamatórios, pois favorecem a conversão dos eicosanoides da série ímpar, que são menos inflamatórios (HESTER et al., 2014). Apresentam ainda efeito cardioprotetor por atuarem na redução das concentrações de triacilgliceróis e de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), e em razão de seu potencial em reduzir ou evitar a disfunção endotelial. Três principais mecanismos são sugeridos nesse caso: 1) a inibição da rota de inflamação pela redução da ativação do fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B) (LEE et al., 2014); 2) a redução do estresse oxidativo pela diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio (CASÓS et al., 2010); e 3) o aumento da expressão e da atividade da enzima óxido nítrico-sintase endotelial (eNOS) (ZANETTI et al., 2015; CASÓS et al., 2010), atuando diretamente na regulação dos genes da eNOS ou reduzindo a atividade da dimetilarginina assimétrica (ADMA), um potente inibidor endógeno circulante do ácido nítrico que apresenta níveis aumentados em indivíduos com hipertensão e diabetes (ZANETTI et al., 2015; RAIMONDI et al., 2005).

Considerando a evidente relação entre o perfil de ácidos graxos e agravos à saúde, seria importante a utilização de pontos de corte que identificassem maior risco para o desenvolvimento de doenças. WOLTERS et al. (2014) sugeriram valores de referência para concentração de ácidos graxos no sangue total de crianças de 3 a 8 anos para uso em estudos epidemiológicos. Entretanto, ainda não há consenso quanto à utilização desses pontos de corte, e quanto aos valores de referência para as demais faixas etárias. A maioria dos estudos epidemiológicos utiliza-se de dados relativos para agrupar os indivíduos segundo conteúdo plasmático ou no sangue total (LATTKA et al., 2013; STEER et al., 2013).

Em decorrência de suas distintas funções biológicas, o maior consumo de LCPUFA n-3, em relação aos n-6, é considerado um fator protetor contra o desenvolvimento das doenças crônicas não transmissíveis e cardiovasculares (GUNARATNE et al., 2015; DE LORGERIL e SALEN, 2012; NOAKES et al., 2012; ZEGHICHI-HAMRI et al., 2010). Segundo De Lorgeril e Salen (2012), o perfil ótimo de consumo de ácidos graxos se assemelha às características da dieta mediterrânea, a qual inclui a maior

ingestão de ácidos graxos n-9, ingestão moderada de ácidos graxos n-3, associada à baixa ingestão de ácidos graxos saturados e n-6.

Apesar da maior afinidade da enzima Δ -6 dessaturase pelo ALA (Harslof et al., 2013; Burdge et al., 2006), a maior concentração de LA favorece a conversão de AA e a ativação de eicosanoides pró-inflamatórios. Simultaneamente, favorece a inibição da via de conversão dos LCPUFAs n-3 e a síntese de eicosanoides anti-inflamatórios, provavelmente por compartilharem as mesmas enzimas (CHILTON et al., 2014, HESTER et al., 2014; PATTERSON et al., 2012). Em condições normais, a conversão endógena de EPA e DHA a partir do ALA é influenciada positivamente pela ingestão de ALA, EPA e DHA, e negativamente pela ingestão de LA e da razão LA/ALA (GILLINGHAM et al., 2013).

O perfil de dieta pró-inflamatória tem sido observado nas últimas décadas, decorrente das alterações no padrão de consumo da dieta ocidental que culminaram no aumento da ingestão de ácidos graxos n-6 e redução de n-3 (PATTERSON et al., 2012). Em razão do potencial aumento do risco cardiovascular resultante da ingestão excessiva de ácidos graxos saturados, recomendações internacionais desde a década de 60 incentivavam a substituição de alimentos de origem animal (como manteiga, creme de leite, queijos) por alimentos de origem vegetal ricos em poli-insaturados n-6, como o óleo de soja e a margarina (CHILTON et al., 2014). No entanto, posteriormente observou-se que os benefícios da ingestão de n-6 estavam associados ao consumo concomitante de PUFAs n-3 nos estudos clínicos (CHILTON et al., 2014, MATHIAS et al., 2014).

3.3 Perfil materno de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (LCPUFAs) e crescimento fetal

A deficiência ou o consumo excessivo de algum nutriente pode apresentar impacto direto na saúde da criança durante o período intrauterino, ou mesmo após o nascimento (ROGERS et al., 2013; OLSEN et al., 2008). Em gestantes, o adequado perfil e ingestão de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (LCPUFAs) está

relacionado a benefícios para a mãe e o filho (JUDGE et al., 2012; VAN EIJSDEN et al., 2008). Os LCPUFAs são provenientes da alimentação e/ou do estoque corporal maternos, e transferidos pela placenta para o feto em processo mediado por proteínas específicas de transferência, que incluem as proteínas de transporte de ácidos graxos (FATP), a translocase de ácidos graxos (FAT / CD36), a proteína de ligação de ácidos graxos da membrana plasmática (FABPpm), e as proteínas de ligação de ácidos graxos (FABP) (BRETT et al., 2014; LAGER e POWELL, 2012).

No período intrauterino e até os seis meses após o nascimento, a criança depende fundamentalmente da transferência materna de LCPUFAs pelo cordão umbilical e pelo leite materno (DIRIX et al., 2009b; XIE E INNIS, 2008). Isso porque a placenta não possui as enzimas delta-5 e delta-6 dessaturases para converter os ácidos graxos essenciais de 18 carbonos em LCPUFAs, e a atividade enzimática no feto e na criança menor de seis meses é muito limitada. Como modo de compensação, durante a gestação, a placenta tende a priorizar o transporte de LCPUFAs para o sangue fetal, indicando a preferência do enriquecimento do sangue fetal por, na ordem DHA > AA > ALA > LA (HANE BUTT et al., 2008).

As recomendações de consumo de lipídeos totais e de ácidos graxos na gestação são semelhantes às recomendações da população em geral, com diferenças apenas nas recomendações de LCPUFAs n-3 (INSTITUTE OF MEDICINE, 2005). A Comissão Europeia de Projetos de Pesquisa em Metabolismo Lipídico Perinatal recomenda que o consumo de DHA na gestação seja de, no mínimo, 200 mg/dia e indica que essa quantidade pode ser alcançada por meio do consumo de uma ou duas porções por semana de peixes marinhos gordurosos, como arenque, cavala, sardinha e salmão (KOLETZKO et al., 2007). Já a FAO (2010) recomenda que na gestação e na lactação o consumo de DHA seja de no mínimo 200mg/dia; e o de DHA+EPA de 300 mg/dia.

EPA e DHA são os LCPUFAs que mais se destacam quanto aos benefícios à saúde materna e da criança. Durante o período gestacional, ocorre deposição de grandes quantidades de DHA na retina e no tecido cerebral do feto, o que sugere a evidente importância desse nutriente no desenvolvimento de funções nobres no organismo da criança. Na retina, o DHA é o principal constituinte, enquanto que no tecido cerebral encontram-se principalmente o DHA e o AA (INNIS, 2007; INNIS, 2014). Há muito

tempo, tem sido postulado que maiores concentrações de PUFAs n-3 associado a menores concentrações de PUFAs n-6 potencializam o desenvolvimento cerebral e visual de crianças (SIMOPOULOUS et al., 1999).

Outros benefícios dos LCPUFAs n-3 na gestação estão relacionados com a menor incidência de alergias e doenças asmáticas em crianças (GUNARATNE et al., 2015; NOAKES et al., 2012; OLSEN et al., 2008), sendo esses efeitos presentes mesmo em crianças mais velhas (OLSEN et al., 2008). Recentemente, foram observados menores concentrações plasmáticas de DHA no cordão umbilical de recém-nascidos de mães diabéticas, e associação entre redução das concentrações plasmáticas de DHA com menor sensibilidade insulínica em recém-nascidos, mesmo após ajuste dos dados segundo covariáveis. Foi sugerido que o DHA pode ter importante papel na “programação” neonatal do diabetes melito na vida adulta (ZHAO et al., 2014).

Alguns autores também associam o perfil de LCPUFAs n-3 e n-6 com o crescimento fetal (GOULD et al., 2016; KAR et al., 2016; GUNARATNE et al., 2015; HARRIS e BAACK, 2015; MOLTÓ-PUIGMARTÍ et al., 2014; ZHAO et al., 2014; CARLSON et al., 2013) e a duração da gestação (CHRISTIAN et al., 2016; CHEN et al., 2016; CARLSON et al., 2013; RAMAKRISHNAN et al., 2010; VAN EIJSDEN et al., 2008; FACCHINETTI et al., 2005, SMUTS et al., 2003, OLSEN et al., 1991). Segundo Dirix et al. (2009b), os efeitos negativos no peso e comprimento ao nascer é resultado da menor concentração de LCPUFAs n-3 no cordão umbilical. Isso significa que a menor disponibilidade de LCPUFAs n-3 no sangue materno, ou mesmo a menor capacidade de transferência materno-fetal de LCPUFAs pelo cordão umbilical, pode ser um fator determinante do crescimento e desenvolvimento fetais.

Em um estudo randomizado duplo-cego com 350 gestantes com menos de 20 semanas gestacionais, a duração da gestação foi 2,87 dias maior nas gestantes suplementadas com 600mg de DHA. As crianças das mães suplementadas eram maiores (+172g) e possuíam circunferência cefálica 0,5cm maior (CARLSON et al., 2013). Em uma revisão sistemática com metanálise, Kar et al. (2016) avaliaram o efeito dos PUFAs n-3 na ocorrência de nascimento pré-termo. Avaliando seis estudos (4193 mulheres), observou-se maior duração da gestação (1,95 semanas) e recém-nascidos com maior peso ao nascer (122,1g) no grupo suplementado com LCPUFAs n-3, quando comparado com o grupo controle. O risco de parto prematuro

antes das 34 SG reduziu em 58% e a prematuridade geral (< 37 SG) reduziu em 17% nas gestantes suplementadas.

Por outro lado, o status materno de PUFAs n-6 está associado negativamente com os desfechos gestacionais (MEHER et al., 2016, MOLTÓ-PUIGMARTÍ et al., 2014; DIRIX et al., 2009a; VAN EIJDEN et al., 2008). Propõe-se que o AA esteja relacionado com a ocorrência de parto prematuro, já que é utilizado na síntese de prostaglandinas da série 2, responsáveis pelo início do trabalho de parto por favorecem o amadurecimento cervical e a contração uterina. Os LCPUFAs n-3 agiriam de forma contrária, prevenindo o parto prematuro, em razão da inibição da produção de eicosanoides derivados do AA por competição enzimática no metabolismo de PUFAS (MOLTÓ-PUIGMARTÍ et al., 2014; OLSEN et al., 1986).

Foi sugerido, então, que o peso ao nascer seria mera consequência do aumento da duração da gestação (MAKRIDES et al., 2013). No entanto, outro mecanismo proposto sugere que os eicosanoides originados dos LCPUFAs n-3 também poderiam favorecer o crescimento e o desenvolvimento fetais pelo aumento do fornecimento sanguíneo para o feto, em razão da vasodilatação dos vasos sanguíneos placentários e da redução da viscosidade sanguínea materna, por inibição da agregação plaquetária (MOLTÓ-PUIGMARTÍ et al., 2014; VAN WIJNGAARDEN et al., 2014; OLSEN et al., 1900). A combinação dos dois mecanismos parece explicar os efeitos do maior consumo materno de LCPUFAs n-3 na melhoria do peso ao nascer e da duração da gestação.

Os estudos, no entanto, não são unânimes em mostrar a associação entre ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa e crescimento somático, e autores salientam que as evidências são limitadas e os resultados dos estudos inconclusivos (GRIEGER e CLIFTON, 2014; STRATAKIS et al., 2014). Um estudo randomizado controlado comparou os efeitos da suplementação de DHA e da educação nutricional (para aumento do consumo de DHA por meio de peixes e alimentos fortificados) nos desfechos gestacionais (HARRIS et al., 2015). Tanto a educação nutricional quanto a suplementação com 600mg de DHA aumentaram em 4 a 4,5 dias a duração da gestação, comparados com o grupo controle (óleo de oliva). Entretanto, peso ao nascer, comprimento e circunferência cefálica não diferiram entre os grupos.

Ramakrishnan et al. (2010) avaliaram os efeitos da suplementação materna de DHA sobre a duração da gestação e o tamanho da criança ao nascer. Nesse estudo mexicano duplo-cego, randomizado, controlado por placebo, 1.094 gestantes (18 a 35 anos de idade; e consumo médio de DHA de 55 mg/dia) foram suplementadas com 400mg/dia de DHA, proveniente de algas, ou placebo. A suplementação ocorreu desde as semanas 18 a 22 até o parto. Não houve diferenças entre os grupos nos valores médios de idade gestacional e das variáveis antropométricas da criança ao nascer (peso, comprimento e circunferência cefálica). Entretanto, comparadas com o grupo controle, as crianças de primigestas suplementadas apresentaram-se mais pesadas e com maior circunferência cefálica.

Saccone et al. (2015) analisaram 34 estudos randomizados controlados, tipo suplemento/controle ou placebo/tratamento, com gestantes e os efeitos da suplementação de EPA e DHA, ou de óleo de peixe (EPA + DHA), no nascimento pré-termo, pré-eclâmpsia, restrição no crescimento intrauterino, diabetes gestacional, mortalidade perinatal, pequeno para a idade gestacional, peso ao nascer, desenvolvimento infantil da retina e do cérebro, e depressão pós-parto. Ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 não foram associados com a prevenção do nascimento pré-termo e com a frequência de baixo peso ao nascer; mas foram significativamente associados com maior peso ao nascer. Sugeriu-se, assim, que a suplementação de n-3 na gestação pode aumentar o peso ao nascer, mesmo sem influenciar a frequência de crianças com baixo peso ao nascer.

Van Eijsden et al. (2008) sugeriram a existência de diferenças étnicas no peso ao nascer, e que não poderiam ser explicadas pelos convencionais fatores de risco materno fisiológicos e ambientais, como idade materna, peso, paridade, IMC e tabagismo. Os autores avaliaram o perfil plasmático de ácidos graxos n-3 e n-6 em gestantes de várias etnias, da cidade de Amsterdã. Como o estudo avaliou gestantes de diferentes etnias, incluindo as imigrantes, que residiam na mesma cidade, esperou-se diminuir as diferenças dos fatores ambientais que poderiam afetar os resultados do estudo. Após o ajuste dos resultados segundo as variáveis maternas fisiológicas e de estilo de vida, incluindo o consumo de peixes e óleo de peixe, as diferenças nas concentrações plasmáticas de ácidos graxos entre os grupos foram modestas. Não foi possível afirmar que as diferenças étnicas influenciavam a relação entre o consumo de óleo de peixes e o status de LCPUFAs,

mas o estudo mostrou relevância científica ao apresentar e discutir os fatores étnicos, possivelmente genéticos, relacionados. Os autores enfatizaram que o questionário de frequência de alimentar era curto e foi validado para a população dinamarquesa, o que pode ter sido um viés na obtenção dos dados sobre consumo de peixe e óleo de peixe de uma população de várias etnias.

Considerando o exposto na literatura, é aceitável que exista influência dos PUFAS n-3 e n-6 maternos no crescimento e desenvolvimento intrauterino (KOLETZKO et al., 2011; OLSEN et al., 2008; VAN EIJDEN et al., 2008). No entanto, a divergência nos resultados deve ser considerada e investigada. Alguns autores sugeriram variações genéticas nos genes das dessaturases (*FADS*) (GONZALEZ-CASANOVA et al., 2016; MOLTÓ-PUIGMARTÍ et al., 2014; LATTKA et al., 2013, XIE E INNIS, 2008) que resultariam na alteração do status materno de ácidos graxos poli-insaturados, modificando a disponibilidade de LCPUFAs para o feto (VAN EIJDEN et al., 2008).

3.4 Polimorfismos dos genes das dessaturases (*FADS*)

As variações nas sequências do DNA são comuns, e podem se apresentar de várias formas. Quando essa variação ocorre em frequência maior que 1% na população é chamada de polimorfismo, e a mutação ocorre quando a frequência da variação genética é menor que 1%. Dentre os polimorfismos, são encontrados: 1) Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP), que são aqueles que apresentam a substituição de um único nucleotídeo na sequência do DNA; 2) Polimorfismos de inserção e deleção, caracterizados pela adição ou supressão de um ou mais nucleotídeos; e 3) Minissatélites e microsatélites, que são um número variável de um conjunto de sequências repetidas na molécula de DNA (BALASUBRAMANIAN et al., 2004).

Os SNPs podem afetar a transcrição gênica, quando presente nas regiões promotoras ou reguladoras do gene. Quando ocorre nas regiões de éxons pode alterar o aminoácido traduzido e, portanto, a estrutura e a função da proteína. Ao

contrário do que se pressupõe, os SNPs que ocorrem em regiões não traduzidas, como os íntrons e próximo às junções íntron-éxons, possuem grande relevância ao afetarem a estabilidade do RNAm ou a ocorrência do splicing de DNA, respectivamente (BALASUBRAMANIAN et al., 2004). Entretanto, nem todo SNP é prejudicial ou importante do ponto de vista clínico, e a sua relação com as doenças deve ser verificada em estudos populacionais.

A conversão endógena de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, embora seja dependente da ingestão alimentar, também pode ser influenciada pelo perfil genético do indivíduo. Variantes genéticas estão sendo estudadas nesse sentido, como as dos genes das dessaturases de ácidos graxos 1 (*FADS1*) e 2 (*FADS2*) que codificam as enzimas delta-5 dessaturase e delta-6 dessaturase, respectivamente (KOLETZKO et al., 2011; LU et al., 2010). Estudos desenvolvidos tanto em adultos (HONG et al., 2013) quanto em crianças e adolescentes (BOKOR et al., 2010), mostraram que os SNPs dos genes *FADS* são importantes determinantes das concentrações sanguíneas de ácidos graxos poli-insaturados das séries ômega 3 e 6.

O agrupamento de genes humano das dessaturases (*FADS* – fatty acid dessaturases) foi mapeado no ano 2000, está localizado no cromossomo 11q12-13.1 (KOLETZKO et al., 2011; BOKOR et al., 2010; MARQUARDT et al., 2000) (**Figura 2**), e apresenta 91,9kb, envolvendo as regiões de 17,2kb, 39,1kb e 18,0kb dos genes *FADS1*, *FADS2* e *FADS3*, respectivamente. Cada um desses três genes apresenta organização similar de éxons e íntrons (12 éxons e 11 íntrons). Os genes *FADS1* e *FADS2* possuem orientação inversa, sendo o éxon 1 de ambos os genes separados por uma região de 11kb (AL-HILAL et al., 2013, GLASER et al., 2011). Essa proximidade das regiões promotoras sugere que a transcrição possa ser controlada por sequências regulatórias em comum (AL-HILAL et al., 2013). O gene *FADS3* está localizado a 6.0kb no lado telomérico do gene *FADS2* (LATTKA et al., 2010b). O gene *FADS3* é pouco estudado, pois não apresenta importância conhecida no metabolismo de LCPUFAs (REARDON et al., 2013).

No agrupamento dos genes *FADS*, foram identificados mais de 500 polimorfismos, presentes no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) (LATTKA et al., 2010b). Os alelos de menor frequência, ou polimórficos,

dos genes *FADS* são relativamente comuns na população em geral, e alcançam níveis entre 11% e 40%; dada sua prevalência e relevância, podem ser considerados um problema de saúde pública (KOLETZKO et al., 2011). Indivíduos carreadores do alelo de menor frequência (Heterozigoto – Mm; ou homozigoto para o alelo de menor frequência – mm) geralmente apresentam maiores quantidades sanguíneas ou em tecidos do substrato das dessaturases, os precursores ALA e LA, e menores quantidades dos seus produtos, os LCPUFAs (AA, EPA e DHA) (WANG et al., 2015; TINTLE et al., 2015; GLASER et al., 2011; KOLETZKO et al., 2011). Autores sugerem que essa condição é resultado da menor atividade das dessaturases, e, por isso, da menor conversão endógena de LCPUFAs (LATTKA et al., 2013; HONG et al., 2013; KOLETZKO et al., 2011).

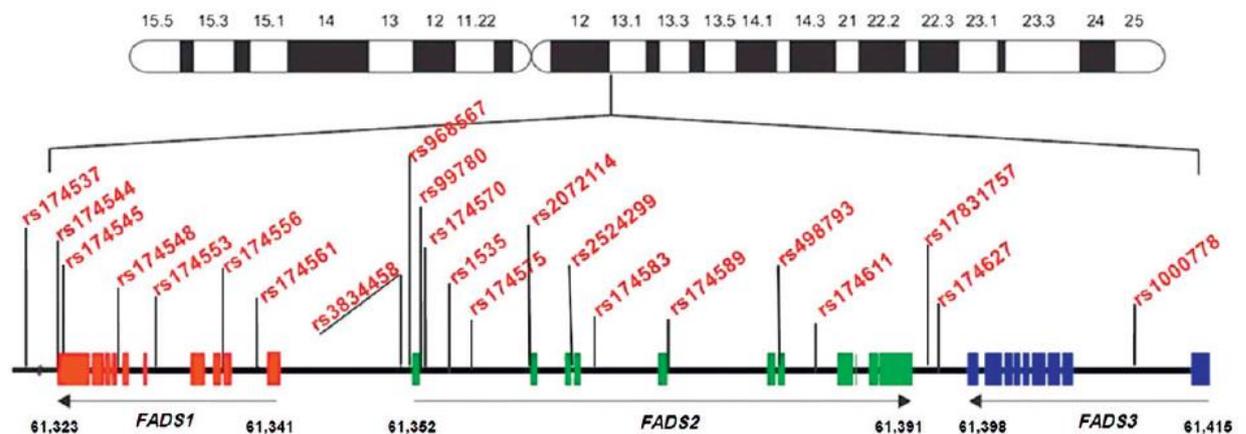


Figura 2. Representação esquemática dos genes *FADS1*, *FADS2* e *FADS3*, localizados no cromossomo 11, com organização de éxons / íntrons e localização de alguns SNPs

Fonte: GLASER et al., (2011).

A atividade das enzimas dessaturases é de difícil mensuração em humanos (CHILTON et al., 2014), já que estão presentes principalmente no fígado (HESTER et al., 2014, HOWARD et al., 2014). Assim, vários autores têm empregado índices da atividade enzimática, que podem ser utilizados como referência em estudos epidemiológicos (LATTKA et al., 2013; FREEMANTLE et al., 2012). Esses índices não avaliam diretamente a atividade enzimática, já que medem apenas a razão entre os substratos e produtos das dessaturases circulantes (CHILTON et al., 2014). Os

mais utilizados são o Índice Delta-5 Dessaturase (D5D), estimado pelo uso da razão ácido araquidônico (AA, 20:4; n-6) / dihomo-gama linolênico (DGLA, 20:3; n-6), e o Índice Delta-6 Dessaturase (D6D), estimada pela razão DGLA (20:3; n-6) / ácido linoleico (LA, 18:2; n-6) (WOLTERS et al., 2014; FREEMANTLE et al., 2012). Também são utilizadas as razões EPA (20:5; n-3)/ALA (18:3 n-3) e AA (20:4; n-6)/LA (18:2; n-6) na estimativa da razão substrato:produto das dessaturases (GILLINGHAM et al., 2013). Por se tratar de uma medida indireta da atividade enzimática, os resultados devem ser utilizados com cautela, pois podem refletir não apenas influências genéticas como outros fatores ambientais e dietéticos (WOLTERS et al., 2014).

Vários estudos têm sido dedicados a avaliar a importância clínica das alterações nas concentrações de LCPUFAs mediado pelos polimorfismos dos genes *FADS* (CORMIER et al., 2012; STANDL et al., 2012; MARTINELLI et al., 2008). Em adultos e crianças, a presença de variantes dos genes *FADS* tem sido relacionada com risco cardiovascular, já que a redução das concentrações de LCPUFAs, principalmente da série n-3, pode induzir a dislipidemia e a resposta pró-inflamatória, favorecendo o dano vascular relacionado com a aterogênese (CORMIER et al., 2012; STANDL et al., 2012; MARTINELLI et al., 2008). No entanto, alguns autores não encontraram associação ou mostraram relação inversa entre alguns SNPs e as concentrações de LCPUFAs (DING et al., 2016; SCHUCHARDT et al., 2016; YEATES et al., 2015; HONG et al., 2013; LATTKA et al., 2013; AZRAD et al., 2012), o que aumenta a necessidade de mais estudos de associação sobre o assunto.

Os estudos com a população gestante buscam avaliar se essas variantes genéticas estão relacionadas com o perfil de ácidos graxos no sangue materno e no cordão umbilical, e qual a influência na saúde da criança (STEER et al., 2012). Sugere-se que a presença de variantes dos genes *FADS* em gestantes podem interferir na disponibilidade de LCPUFAs para o feto, e afetar negativamente o seu crescimento e desenvolvimento (KOLETZKO et al., 2011; LATTKA et al., 2010b; VAN EIJSDEN et al., 2008; XIE E INNIS, 2008).

No estudo de Xie e Innis (2008), verificou-se que, no plasma sanguíneo e no leite materno, eram menores as concentrações de LCPUFAs n-3 e n-6 e maiores de LA e ALA em mulheres homozigotas para o alelo de menor frequência dos SNPs

rs174553 (GG – gene *FADS1*), rs99780 (TT – gene *FADS2*) e rs174583 (TT – gene *FADS2*). O mesmo resultado foi encontrado no leite materno de mulheres homozigotas para o alelo de menor frequência do SNP rs174575 (GG) do gene *FADS2*. Steer et al. (2012) verificaram resultados semelhantes para as concentrações de ácidos graxos em eritrócitos maternos. O perfil de ácidos graxos do cordão umbilical se associou tanto com o genótipo materno quanto com o genótipo da criança. No entanto, não encontraram associação entre o genótipo materno e o perfil de ácidos graxos em crianças de 7 anos de idade. Os autores sugeriram que, nessa idade, as concentrações de LCPUFAs sejam dependentes apenas do genótipo da criança, não sendo observadas influências do ambiente materno intrauterino em períodos futuros da vida da criança.

Lattka et al. (2013) sugeriram que tanto os genótipos *FADS* maternos e os das crianças influenciavam as quantidades plasmáticas de LCPUFAs no cordão umbilical. Nesse estudo, que avaliou dezoito SNPs em mais de 2000 mães e crianças na Inglaterra, os alelos de menor frequência se associaram com maiores quantidades dos ácidos graxos essenciais LA e ALA, e menores quantidades de LCPUFAs n-3 e n-6, exceto para o alelo de menor frequência do SNP rs498793 (*FADS2*), que apresentou resultado contrário ao de todos os outros SNPs. Os autores mostraram ainda que grande parte dos genótipos maternos avaliados apresentavam maior influência nas concentrações de ácidos graxos n-3 de 18 ou 20 carbonos, enquanto que os genótipos fetais se relacionavam com os LCPUFAs n-6. Sugeriu-se a possível capacidade fetal de sintetizar LCPUFAs, mesmo reconhecendo a menor atividade enzimática de crianças na fase intrauterina. Esses resultados ainda não se encontram consolidados pela literatura, mas são relevantes e sugerem a necessidade de mais estudos.

Apesar de escassos, a maioria dos estudos desenvolvidos com gestantes sugere que os polimorfismos dos genes *FADS1* e *FADS2* estão associados com maiores concentrações de LA e ALA, e menores concentrações de LCPUFAs (AA, EPA e DHA). Os estudos são importantes, tendo em vista que as variações genéticas podem influenciar a disponibilidade materna de ácidos graxos essenciais para o feto (XIE E INNIS, 2008). Foram encontrados poucos estudos que associavam a presença dos SNPs dos genes *FADS* em gestantes com o resultado obstétrico e a saúde da criança (MOLTÓ-PUIGMARTÍ et al., 2014; MORALES et al., 2011).

Koletzko et al. (2011) discutiram sobre a necessidade de mais estudos que avaliem a associação entre os polimorfismos dos genes *FADS*, concentrações corporais de DHA, e desenvolvimento infantil, a fim de se verificar a relevância biológica das concentrações de ácidos graxos gene-dependentes. O consumo alimentar também apresenta relevante influência no perfil materno de LCPUFAs, e destaca-se como importante variável a ser considerada. Estudos de interação gene-nutriente parecem adequados para auxiliar na compreensão da influência dos polimorfismos dos genes *FADS* e do consumo materno de PUFAS no peso da criança ao nascer e na duração da gestação.

3.6 Interação gene-nutriente na gestação

Três importantes linhas de estudo sobre genética foram criadas na nutrição, e estão inseridas na Genômica Nutricional: a nutrigenômica, a epigenômica nutricional e a nutrigenética. A nutrigenômica estuda a interação dos nutrientes e de compostos bioativos dos alimentos na expressão gênica, e as consequentes alterações na síntese de proteínas e na produção de outros metabólitos associados ao gene. A epigenética nutricional pressupõe que determinados nutrientes podem ativar ou silenciar a expressão de genes por meio de mecanismos epigenéticos, como a metilação das histonas ou do DNA. Essa modulação gênica reversível ocorre sem alterar a sequência do DNA, alterando apenas o fenótipo do indivíduo, podendo induzir ou prevenir a ocorrência ou progressão de uma determinada doença dependendo do gene afetado (DOO e KIM, 2015; VAHID et al., 2015; DESSI et al., 2014; FARHUD et al., 2010).

A nutrigenética avalia o impacto das diferenças genótípicas na resposta à ingestão alimentar, e sua influência sobre o estado de saúde e o risco de doenças (CAMP e TRUJILLO, 2014). Nesse caso, o genótipo individual pode conferir alterações específicas no metabolismo de nutrientes, como alterações na absorção, conversão metabólica, produção e atividade enzimáticas, armazenamento e excreção, as quais seriam responsáveis por respostas individuais à dieta. Dessa forma, o consumo de um nutriente por indivíduos ou populações com determinado genótipo pode atenuar

ou potencializar um agravo ou condição de saúde, sendo a resposta diferente para o outro genótipo. Estudos desse tipo são importantes, pois auxiliam na compreensão da influência genética na resposta à alimentação, permitindo que as recomendações dietéticas sejam personalizadas e os planos alimentares planejados precocemente a fim de prevenir ou atenuar a ocorrência de determinadas doenças ou agravos à saúde (DOO e KIM, 2015; DESSI et al., 2014; FARHUD et al., 2010).

O Projeto Genoma Humano é considerado o principal marco desses estudos, uma vez que permitiu melhor compreensão da influência genética nas várias áreas da saúde (CAMP e TRUJILLO, 2014). Estudos que associam nutrição e genética são recentes e parecem propor nova perspectiva na compreensão de condições e agravos multifatoriais (DOO e KIM, 2015; VAHID et al., 2015). Segundo Chilton et al. (2014), o padrão de consumo de PUFAS e a frequência das variantes dos genes *FADS* em determinadas populações pode explicar a maior suscetibilidade e gravidade de certas doenças, como as doenças cardiovasculares, em grupos específicos.

Indivíduos com o alelo de menor frequência (Mm ou mm), comumente associados à menor atividade das enzimas dessaturases, costumam se beneficiar da maior ingestão ou suplementação de ácido α -Linolênico (ALA) (**Figura 3**) (HELLSTRAND et al., 2014; GILLINGHAM et al., 2013; HELLSTRAND et al., 2012) e, principalmente, de DHA (GONZALEZ-CASANOVA et al., 2016; SCHOLTZ et al., 2015; MOLTÓ-PUIGMARTÍ et al., 2014; AL-HILAL et al., 2013). Gillingham et al. (2013), em um estudo randomizado, duplo cego, cross-over, comparou três dietas experimentais, em 39 adultos e idosos, quanto ao perfil de ácidos graxos segundo genótipos *FADS*. O estudo investigou se, nos genótipos associados à menor atividade das dessaturases, a redução das concentrações plasmáticas de LCPUFAS ômega 3 (EPA e DHA) seria compensada pelo aumento da ingestão de ALA. Ao final do estudo, observou-se que, para os quatro SNPs avaliados (*FADS1*: rs174545, rs174537, rs174561 e *FADS2*: rs174583), o consumo de dieta enriquecida com ALA, suplementada com óleo de linhaça, aumentou apenas as concentrações de EPA nos homozigotos para os alelos de menor frequência.

Hellstrand et al. (2012), em uma coorte prospectiva na Suíça com 4.635 indivíduos, mostraram que o aumento do consumo da relação ALA/LA elevou as concentrações

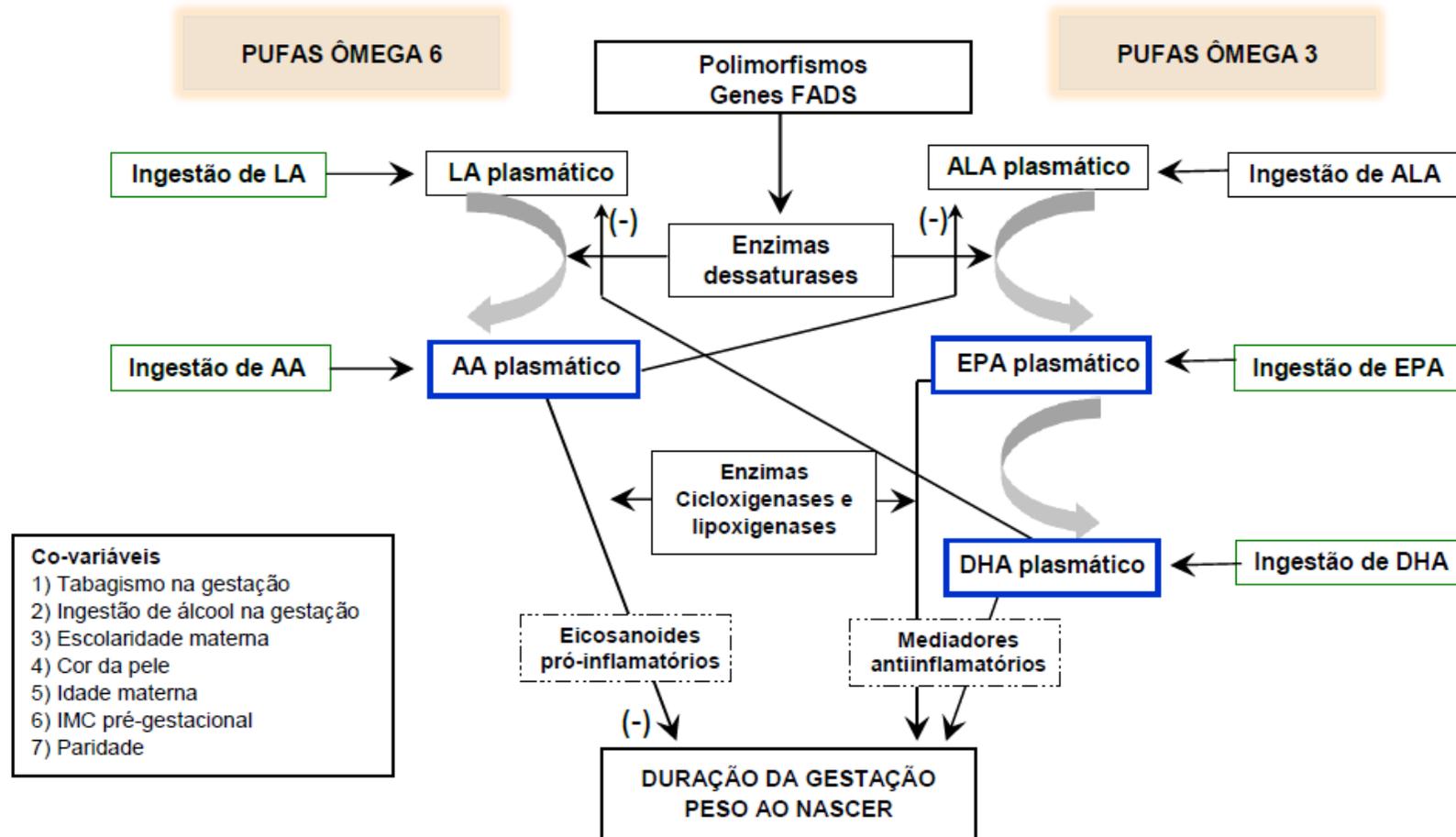


Figura 3. Diagrama causal da prematuridade e do baixo peso ao nascer relacionado ao metabolismo de ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 e 6, sendo a) variável independente: consumo de PUFAS; b) modificador de efeito: polimorfismos dos genes das dessaturases (*FADS*).

Siglas: PUFAS = Ácidos graxos poli-insaturados. LA = Ácido linoleico (18:2; n-6). AA = Ácido araquidônico (20:4 n-6). ALA = Ácido α -linolênico (18:3; n-3). EPA = Ácido Eicosapentaenoico (20:5; n-3). DHA = Ácido docosa-hexaenoico (22:6; n-3). **Covariáveis:** 1, 2, 5 e 6 afetam os PUFAS plasmáticos; 4 e 5 afetam a atividade das enzimas dessaturases; 3 a 5 afetam o consumo de PUFAS; 1 a 7 afetam o peso ao nascer e a duração da gestação.

da lipoproteína de alta densidade (HDL) em adultos que carregavam o alelo de menor frequência do SNP rs174547 (TC e CC – gene *FADS1*), sem efeitos nos homocigotos para o alelo de maior frequência (TT). Ainda não está totalmente claro se as concentrações de ALA são fatores de proteção independentes, ou se seus efeitos são relativos à sua conversão em EPA e DHA (HELLSTRAND et al., 2014).

Scholtz et al. (2015), em um ensaio clínico com 205 gestantes, mostraram que a suplementação com 600mg de DHA, proveniente de algas, nos últimos dois trimestres de gestação foi responsável por maiores concentrações de DHA no plasma e em células vermelhas em comparação ao tempo inicial do estudo (*baseline*), independente do genótipo (rs1745533 – *FADS1* e rs174575 – *FADS2*). Nas gestantes homocigotas para o alelo de menor frequência, a suplementação de DHA reduziu as concentrações de AA, em comparação com o *baseline*. Isso indica que as gestantes homocigotas para o alelo de menor frequência podem se beneficiar da suplementação de DHA nos últimos trimestres da gestação, por manterem concentrações mais elevadas de DHA e melhor razão DHA:AA. Segundo os autores, a suplementação de DHA reduz AA por um mecanismo de feedback negativo em relação à via metabólica adjacente, uma vez que o aumento de DHA inibe a rota metabólica dos ácidos graxos da série n-6, diminuindo a conversão de LA em AA.

No estudo de Hasrsløf et al. (2013), com crianças de 9 meses a 3 anos de idade, os genótipos *FADS* e o consumo de peixes eram responsáveis por 3% e 1,5%, respectivamente, da variação de DHA eritrocitário, sendo o aleitamento materno o maior responsável por essa variação (~20%). Apesar de pequena, a taxa de variação explicada pelos genótipos *FADS* é bastante relevante, já que nesse estudo foram analisados apenas quatro SNPs, enquanto outros não avaliados se somariam a esses resultados. Ainda, destaca-se que a atividade das enzimas delta-5 e delta-6 dessaturases é limitada no feto e na criança menor de 6 meses (Hanebutt et al., 2008), o que sugere a possibilidade de que níveis semelhantes sejam observados em adultos.

Não é possível generalizar o efeito dos polimorfismos dos genes *FADS* na atividade enzimática das dessaturases. Primeiro, porque os estudos não avaliam diretamente a atividade enzimática, já que medem apenas a razão entre os substratos e produtos

das dessaturases circulantes ou celulares. É possível que as variantes dos genes *FADS* alterem a ação de enzimas envolvidas nas etapas de transcrição/expressão gênica (CHILTON et al., 2014). Segundo, o alelo de menor frequência de certos SNPs dos genes *FADS* podem se associar com o aumento da concentração de DHA (HARSLØF et al., 2013), embora o perfil protetor associado a esses SNPs não seja consenso (DING et al., 2016; SCHUCHARDT et al., 2016; YEATES et al., 2015; MOLTÓ-PUIGMARTÍ et al., 2013; AZRAD et al., 2012).

Os genótipos de melhor eficiência de conversão de LCPUFAs também parecem modular a relação entre consumo de PUFAs e o desenvolvimento de doenças. É provável que, em resposta à maior razão LA/ALA na alimentação, a ativação da via de conversão endógena dos ácidos graxos n-6 seja potencializada nesse genótipo, e resulte na menor conversão endógena de DHA em razão da competição enzimática dos substratos LA e ALA (CHILTON et al., 2014). Para Chilton et al. (2014), o consumo do padrão de dieta ocidental, rica em ALA, por indivíduos que apresentem variantes dos genes *FADS* associados à maior eficiência das dessaturases resulta no aumento da concentração de AA e da síntese de eicosanoides pró-inflamatórios, e, conseqüentemente, no aumento do risco de desenvolvimento de doenças associadas aos processos inflamatórios. Sugere-se que, nesse genótipo, pode ser especialmente desfavorável a ingestão da maior razão LA/ALA, resultante do baixo consumo de ALA e/ou do elevado consumo de LA.

Estudos já demonstraram que as variantes dos genes *FADS* e a ingestão de PUFAs interagem e modulam o perfil de LCPUFAs no organismo (SCHOLTZ et al., 2015; AL-HILAL et al., 2013; GILLINGHAM et al., 2013; HARSLØF et al., 2013; CORMIER et al., 2012; HELLSTRAND et al., 2012; LATTKA et al., 2011; MOLTÓ-PUIGMARTÍ et al., 2010) as concentrações de lipídeos séricos (HELLSTRAND et al., 2012; STANDL et al., 2012; LU et al., 2010), o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (HELLSTRAND et al., 2014) e o quociente de inteligência de crianças (STEER et al., 2013). Entretanto, pouco se sabe sobre a modulação dos polimorfismos dos genes *FADS* na relação entre ingestão materna de PUFAs e resultado obstétrico (GONZALEZ-CASANOVA et al., 2016; MOLTÓ-PUIGMARTÍ et al., 2014).

Até o momento, foram encontrados apenas dois estudos que avaliaram a interação entre genes *FADS* e ingestão de PUFAS durante a gestação nos resultados obstétricos (GONZALEZ-CASANOVA et al., 2016; MOLTÓ-PUIGMARTÍ et al., 2014). Gonzalez-Casanova et al. (2016) utilizaram amostras sanguíneas de um estudo randomizado duplo cego no México realizado com 654 gestantes de 18 a 22 semanas gestacionais, divididas em grupos placebo ou suplementadas com 400mg/dia de DHA. Foi mostrado que genótipos dos SNPs rs174556 (*FADS1*), rs498793 (*FADS2*) e 174455 (*FADS3*) não modificaram a associação entre suplementação de DHA e peso ao nascer. No entanto, recém-nascidos de mães que carregavam um ou dois alelos de menor frequência (TT e TC) do SNP rs174602 (*FADS2*) eram mais pesados no grupo suplementado. Não houve diferenças no peso em recém-nascidos de mães homocigotas para o alelo de maior frequência (CC).

O resultado do estudo de Gonzalez-Casanova et al. (2016) indica que gestantes carreadoras de um ou dois alelos de menor frequência do SNP rs174602 (*FADS2*) são consideradas de risco para o baixo peso ao nascer. Nesse caso, a suplementação com 400mg de DHA pode diminuir esse risco, aumentando o peso das crianças ao nascer por compensar uma alteração metabólica geneticamente determinada, que culmina em menor concentração de DHA no organismo. Provavelmente, as crianças de mães homocigotas para o alelo de maior frequência não apresentaram diferenças no peso ao nascer em razão da melhor atividade enzimática das dessaturases, caracterizada pela maior taxa de conversão de ALA em DHA, e não necessitariam de DHA externo (suplementado).

Moltó-Puigmartí et al. (2014) mostraram resultado diferente para o SNP rs174556 (*FADS1*), que não apresentou interação gene-nutriente no estudo de Gonzalez-Casanova et al. (2016). Gestantes homocigotas para o alelo de menor frequência do SNP rs174556 (TT) apresentavam crianças mais leves (-140g) que as homocigotas de maior frequência. Nas homocigotas de menor frequência a ingestão de DHA se associava positivamente com peso ao nascer, enquanto que a ingestão de AA se associava negativamente. Não foi observada interação gene-nutriente na duração da gestação para essa variante genética. O genótipo fetal, avaliado no cordão umbilical, não influenciou o peso ao nascer e a duração da gestação, e não modificou a associação entre ingestão de PUFAs e os desfechos gestacionais.

No atual estado da arte, os estudos de interação gene-nutriente envolvendo as variantes do agrupamento de genes *FADS* apontam para a necessidade de identificação dos SNPs com real relevância para a saúde humana e com importância para utilização prática. A complexidade das interações gene-nutriente, a grande variedade de polimorfismos no agrupamento de genes *FADS* e a existência de dados contraditórios sobre a influência de cada um desses variantes no metabolismo de PUFA estão entre os principais desafios na atualidade.

A investigação dos efeitos da ingestão habitual de PUFA parece interessante nessa perspectiva. Os estudos de suplementação facilitam a observação de causalidade, mas são de limitada extrapolação, dadas as diferenças entre os estudos na quantidade e na composição dos suplementos (óleo de peixe, DHA + EPA, DHA isolada), no período e na duração da intervenção (SACCONE et al., 2015; CARLSON et al., 2013; CAMPOY et al., 2012; RAMAKRISHNAN et al., 2010). Além disso, nota-se que a maioria dos estudos encontrados avaliou o efeito da suplementação de DHA nos resultados obstétricos utilizando doses elevadas (300 a 600 mg/dia) (KAR et al., 2016; HARRIS et al., 2015; CARLSON et al., 2013), superiores às recomendações de ingestão de 200mg/dia de DHA para gestantes (KOLETZKO et al., 2007).

Os polimorfismos s174575, rs174561 e rs3834458 têm sido relacionados, na literatura, com alterações nas concentrações de LCPUFAs em crianças, gestantes e lactantes (KOLETZKO et al., 2011; MOLTÓ-PUIGMARTÍ et al 2010; RZEHA et al., 2010; XIE E INNIS, 2008), mas ainda não foram testados em gestantes quanto a interação gene-nutriente no peso da criança ao nascer e na duração da gestação. O SNP localizado no gene *FADS1*, rs174561, é uma transição do tipo T/C, e influencia diretamente os níveis de transcrição da delta-5 dessaturase. O rs174575, localizado no gene *FADS2*, é uma transversão do tipo C/G, com função ainda desconhecida no metabolismo de LCPUFAs (GILLINGHAM et al., 2013; MOLTÓ-PUIGMARTÍ et al., 2013; MOLTÓ-PUIGMARTÍ et al., 2010). Em geral, os alelos de menor frequência G e C dos polimorfismos rs174575 e rs174561, respectivamente, são relacionados com maiores concentrações dos substratos das dessaturases, LA e ALA, e menores dos produtos de cadeia longa, AA, EPA e DHA (AL-HILAL et al., 2013; GILLINGHAM et al., 2013; STEER et al., 2012).

O rs3834458 está localizado na região intergênica entre *FADS1-FADS2*, na região promotora do gene *FADS2*. Trata-se de uma substituição do tipo inserção/deleção; nesse caso, o alelo T é suprimido por uma deleção (YEATES et al., 2015; MOLTÓ-PUIGMARTÍ et al., 2013; GILLINGHAM et al., 2013; MOLTÓ-PUIGMARTÍ et al., 2010). O interesse nesse SNP está relacionado principalmente com sua localização, por se tratar de uma região reguladora da transcrição gênica.

Alguns autores sugerem possível efeito protetor do polimorfismo rs3834458 (*FADS*), já que a concentração de DHA seria maior em indivíduos homocigotos de menor frequência (DelDel) (STEER et al., 2013; HARSLØF et al., 2013). De acordo com Steer et al. (2013), parece existir efeitos opostos dos SNPs localizados na região promotora, como o rs3834458, e dos situados nos íntrons do gene *FADS2*. Evidências sugerem possível aumento da transcrição nos alelos de menor frequência desse SNP, provavelmente por facilitar a ligação do fator de transcrição ELK1 (NWANKWO et al., 2003), embora o perfil protetor associado a esse SNP não seja consenso (DING et al., 2016; SCHUCHARDT et al., 2016; YEATES et al., 2015; MOLTÓ-PUIGMARTÍ et al., 2013; AZRAD et al., 2012; LATTKA et al., 2010a).

A escassez de conhecimento sobre o tema na população materno-infantil e o limitado número de SNPs investigados nesse grupo, nos mostra um interessante direcionamento para estudos sobre saúde do recém-nascido. Os genótipos maternos dos genes *FADS* aparecem como potenciais modificadores de efeito na relação entre consumo de PUFAS e o resultado obstétrico, o que pode explicar a variabilidade dos resultados em estudos de associação. Torna-se evidente a relevância de se compreender a influência e interação da ingestão materna de LCPUFAs e dos SNPs dos genes *FADS* no resultado obstétrico. O presente estudo pretende contribuir com discussões sobre o tema, de modo a permitir melhor conhecimento nesse campo, considerando os fatores relacionados com o perfil genético de populações específicas, como a população brasileira, em especial, a população gestante do Recôncavo da Bahia.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

Foi realizado um delineamento de coorte prospectivo com de mulheres gestantes inscritas no serviço público de saúde pré-natal do Município de Santo Antônio de Jesus, no Estado da Bahia, no período de agosto de 2013 a dezembro de 2015.

4.2 Local do estudo

O estudo foi desenvolvido em Santo Antônio de Jesus, cidade localizada no recôncavo baiano, no estado da Bahia, Brasil, a 187 km da capital Salvador. De acordo com o Censo Demográfico de 2010, a cidade possuía 90.985 habitantes, cerca de 79.297 na zona urbana. A população estimada para 2014 foi de cerca de 100.550 habitantes. Do ponto de vista econômico, as principais atividades são agricultura, pecuária e comércio. Em 2010, o Produto Interno Bruto (PIB) per capita correspondia a R\$ 11.872,96, 60% da média do Estado. A prestação de serviços de saúde pública ocorria em 25 unidades de centro de saúde/atendimento básico, 36 unidades de atendimento especializado (três públicos e trinta e seis privados), 5 hospitais e 21 equipes de saúde da família. A média de nascidos vivos no período de 2002 a 2006 foi de 1.459, com um coeficiente de mortalidade infantil de 16,9 óbitos em cada mil nascidos vivos em 2010.

4.3 População de estudo

As mulheres investigadas integravam a coorte de gestantes do Núcleo de Investigação em Saúde Materno Infantil (NISAMI). A coorte do NISAMI acompanhou

mulheres durante a gestação e no período pós-parto, entre os anos de 2009 e 2016, com a finalidade de investigar os fatores determinantes da saúde materno-infantil na zona urbana de Santo Antônio de Jesus, Bahia, Brasil. No presente estudo, participaram apenas as gestantes da coorte do NISAMI que concluíram a primeira etapa da coleta de dados entre agosto de 2013 e dezembro de 2014, e que aceitaram realizar as avaliações adicionais de estimativa do consumo alimentar e a coleta sanguínea.

Foram incluídas as gestantes clinicamente saudáveis, residentes e domiciliadas na zona urbana de Santo Antônio de Jesus – Bahia, Brasil, com 18 anos ou mais de idade, com idade gestacional menor ou igual a 34 semanas no momento da primeira entrevista, inscritas no serviço público de saúde pré-natal da cidade. As excluídas eram mulheres com gestação múltipla, HIV positivas, com doenças contagiosas, imunológicas e metabólicas, gestantes veganas (não consumiam nenhum alimento de origem animal), além daquelas que sofreram aborto durante o acompanhamento da coorte.

4.4 Coleta de dados

Anteriormente à coleta de dados, foi realizado estudo piloto para calibragem dos instrumentos e equipamentos, e treinamento dos entrevistadores do NISAMI (**Figura 4**). O hospital-maternidade da cidade recebeu, por meio de doação do NISAMI, as balanças pediátricas utilizadas nas aferições de peso ao nascer. As equipes de saúde do hospital-maternidade também passaram por treinamento, coordenado pelo NISAMI, para padronização das aferições realizadas na criança ao nascer.

A coleta de dados do estudo foi conduzida entre agosto de 2013 e dezembro de 2015, e ocorreu em duas etapas: durante a gestação e após o parto. Na **primeira etapa**, entre agosto de 2013 e dezembro de 2014, entrevistas padronizadas foram conduzidas com as gestantes por entrevistadores treinados na rede de atenção básica de saúde por meio da aplicação de questionários (**Apêndice A**). Foram obtidas informações sócio-demográficas, de saúde e obstétricas das gestantes e

agendadas as datas da coleta sanguínea. A coleta sanguínea foi realizada por profissional capacitado em um laboratório de análises clínicas da cidade, onde também foram avaliados o peso, a estatura e o consumo alimentar da gestante.

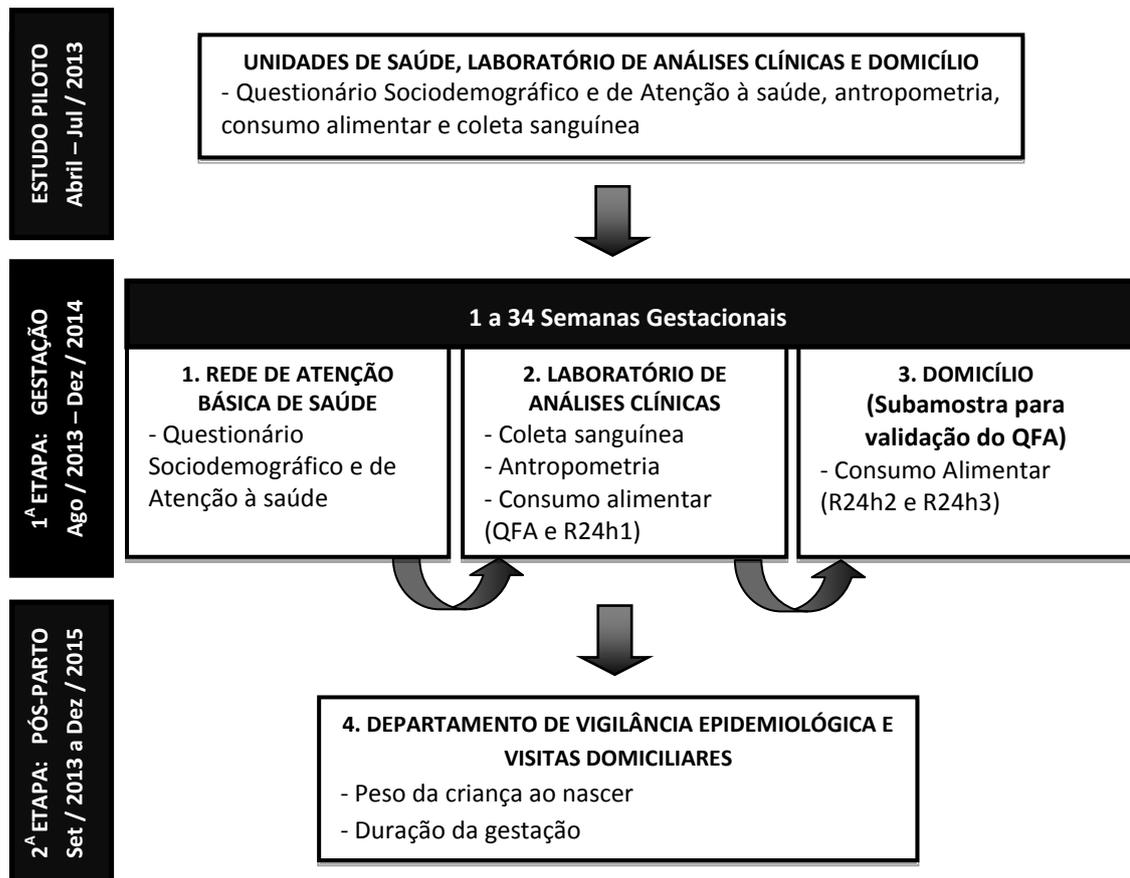


Figura 4. Fluxograma do desenho do estudo conduzido com gestantes adultas atendidas no serviço público de saúde pré-natal de Santo Antônio de Jesus, Bahia, Brasil, 2016.

Para validação do questionário de frequência alimentar (QFA), visitas domiciliares previamente agendadas foram realizadas em uma subamostra selecionada ao acaso, até que se completasse o mínimo de 50 gestantes com o QFA e três R24h (R24h1, R24h2 e R24h3) aplicados. QFA1 e R24h1 foram respondidos no mesmo dia da coleta sanguínea; R24h2 e R24h3 foram aplicados no domicílio da gestante, em intervalos de 15 a 40 dias entre os R24h (**Figuras 4 e 5**).

Após completar o tamanho amostral necessário para sua validação ($n = 50$), o QFA₁ continuou sendo aplicado nas gestantes da coorte, no laboratório de análises clínicas, até o final da coleta de dados. Esse instrumento foi simultaneamente utilizado para a construção e validação do QFA, e determinação do consumo de ácidos graxos da amostra. Para que isso fosse possível, a estimativa final do consumo de ácidos graxos pelas gestantes da coorte considerou apenas os alimentos que constituíram a versão final do QFA validado, não sendo tabulados os alimentos com consumo insignificativo nessa população.

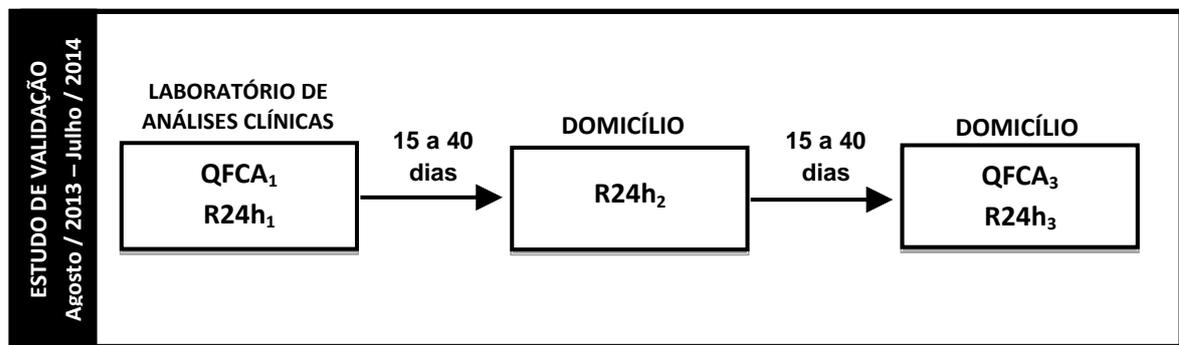


Figura 5. Fluxograma de aplicação dos questionários de consumo alimentar em gestantes atendidas no serviço público de saúde pré-natal de Santo Antônio de Jesus, Bahia, Brasil, 2016.

Na **segunda etapa**, entre setembro de 2013 e dezembro de 2015, os dados das crianças ao nascer foram coletados no Departamento de Vigilância Epidemiológica (VIEP) da Secretaria Municipal de Saúde. Visitas domiciliares foram realizadas ao final do estudo para aquelas gestantes cujos dados dos desfechos gestacionais não foram encontrados no VIEP.

4.5 Avaliação antropométrica e cálculo da idade gestacional

O peso pré-gestacional foi autorreferido pelas gestantes durante a aplicação do questionário sociodemográfico e de saúde. O peso e a estatura foram aferidos, em triplicata, durante o período de espera ou após a coleta sanguínea, ainda em jejum, segundo protocolos recomendados por Jelliffe (1968). O Índice de Massa Corporal

foi obtido por meio da fórmula: peso/estatura², utilizando-se as médias dos valores de peso e estatura.

Para a estimativa do peso, foi utilizada balança eletrônica portátil da marca Marte[®], modelo LC200PS, com capacidade de 200 kg e sensibilidade de 0,05 kg, e para a estatura o estadiômetro portátil da marca Sanny[®], fixado à parede, com capacidade de 210 cm e precisão de 0,1 cm.

A idade gestacional foi calculada pela diferença do tempo transcorrido entre a data da coleta sanguínea e a data da última menstruação (DUM), considerando o primeiro dia da última menstruação como início da gestação. A idade gestacional foi confirmada pelo exame de ultrassonografia, quando presente.

4.6 Coleta sanguínea

Para a coleta sanguínea, as gestantes foram orientadas sobre os procedimentos prévios necessários:

- Permanecer em jejum durante 12 horas antes dos exames;
- Manter a alimentação normal nas 48 horas que antecediam o exame, evitando apenas o consumo de alimentação rica em gordura;
- Não realizar atividades físicas nas 24 horas precedentes ao exame;
- Não ingerir álcool nas 72 horas que antecediam o exame.

Foram colhidos 8 mL de sangue venoso em tubos Vacutainer[®] com EDTA, e realizada centrifugação a 2500 rpm por 15 minutos. O plasma, utilizado na determinação do perfil sanguíneo de ácidos graxos, foi separado e congelado imediatamente em nitrogênio líquido até o momento das análises. O *buffy coat*, utilizado na extração do DNA genômico, foi coletado por meio de pipetagem e refrigerado (0 a 5°C) até o momento das análises, respeitando o prazo máximo de 72 horas de armazenamento.

4.7 Análise molecular

4.7.1 Seleção dos SNPs

Os SNPs investigados foram os relacionados, pela literatura, com alterações nas concentrações de ácidos graxos de cadeia longa em crianças e gestantes (KOLETZKO et al., 2011; MOLTÓ-PUIGMARTÍ et al 2010; RZEHAK et al., 2010; XIE E INNIS, 2008). Foram selecionados para análise os SNPs rs174575 e rs174561, localizados na região intrônica dos genes *FADS2* e *FADS1*, respectivamente; e o polimorfismo rs3834458, localizado na região intergênica entre os genes *FADS1* e *FADS2*, na região promotora do gene *FADS2* (**Tabela 3**).

Tabela 3. Características das variantes dos genes *FADS1* e *FADS2* em uma coorte de gestantes do NISAMI, 2015.

SNP	Gene	Posição cromossômica ¹ (pb)	Alelos (M / m) ²
rs174575	<i>FADS2</i> intron1	61834531	C / G
rs174561	<i>FADS1</i> intron1	61339284	T / C
rs3834458	Intergênico (<i>FADS2</i>)	61351497	T / Del ³

¹ Posição foi obtida no National Center for Biotechnology (NCBI, 2015).

² M = alelo de maior frequência; m = alelo de menor frequência.

³ Del = Deleção

4.7.2 Extração de DNA genômico

O DNA genômico foi extraído a partir do *buffy coat*, no Laboratório de Genética Humana da UFRB. Utilizou-se o kit de extração da Qiagen®, FlexiGene® DNA Kit (250), de acordo com a metodologia recomendada pelo fabricante. Após extração do DNA, as amostras foram acondicionadas a -20°C até o momento da genotipagem.

4.7.3 Determinação da concentração e pureza das amostras de DNA

Após extração do DNA genômico, as etapas subsequentes de análise molecular foram realizadas no Núcleo de Genética Humana e Molecular da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Vitória, ES.

A determinação da concentração e da pureza do DNA genômico foram realizadas no equipamento Thermo Scientific NanoDrop™ 2000 Micro-volume Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific), utilizando 1 µL de amostra. A solução de referência, ou branco, utilizada para calibração do equipamento foi o Tampão Tris-HCL, 10mM, ph 8,5. A pureza da amostra foi observada pelos valores de absorbância a 280 nm e a 230 nm (GALLAGHER, 2011):

- Razão A260 / A280: Valores de 1,8 a 1,9 indicam alta pureza das amostras com DNA.
- Razão A260 / A230: Valores entre 1,8 e 2,2 indicam pureza.

4.7.4 Genotipagem

Para genotipagem, foram preparadas alíquotas de DNA genômico com concentração de 30 ng/µL, a partir da diluição com água ultrapura das amostras concentradas. A genotipagem dos SNPs foi realizada por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real, utilizando ensaios TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Para cada reação de PCR preparada, com volume final de 20 µL, foram utilizados 10 µL de TaqMan® Genotyping MasterMix 2X (solução contendo a enzima TaqDNA Polimerase, desoxinucleotídeos e tampão com MgCl₂), 0,5 µL de TaqMan® SNP Genotyping Assay 40X (solução de primers e sondas pré-desenhados e validados), 8,5 µL de água ultrapura e 1 µL de amostra (30 ng de DNA), conforme instruções do fabricante (**Tabela 4**).

Tabela 4. Composição das reações de 20 µL para genotipagem de SNPs utilizando ensaios TaqMan® pré-desenhados e customizado em equipamento de PCR em tempo real

Reações	Tipo de amostra	Mix de Reação*
Amostra para genotipagem	1 µL de amostra de DNA genômico (30ng/µL)	19 µL
Controle negativo	1 µL água ultrapura	19 µL
Controles positivos**	1 µL de amostra (MM, Mm ou mm***) (30ng/µL)	19 µL

* 19 µL de Mix de reação continham: 10 µL de 2X TaqMan® MasterMix + 0,5 µL de 40X TaqMan® Predesigned SNP + 8,5 µL de água ultrapura.

** Controles positivos: genotipados por meio da discriminação alélica no equipamento de PCR em tempo real Rotor Gene-Q 5-Plex HRM (Qiagen®), utilizando sondas TaqMan.

*** MM, homocigoto de maior frequência; Mm, heterocigoto; mm, homocigoto de menor frequência.

O ensaio TaqMan® para genotipagem do SNP rs3834458 foi customizado (Custom TagMan® SNP Genotyping Assay), e continha os seguintes primers e sondas:

- Primers (5'–3'): forward AGAGCAGAGGTTCCGCAATT e reverse GCCTTGGATTAGAGGGCTTTGAA
- Sondas (5'–3'): com alelo-T VIC/TCAGACAATCTTAGAAAAG-NFQ e com alelo-DeI FAM/TCAGACAATCTTGAAAAG-NFQ

Todas as amostras foram genotipadas utilizando a discriminação alélica no equipamento de PCR em tempo real Rotor Gene-Q 5-Plex HRM (Qiagen®), com as condições de termociclagem indicadas pelo fabricante dos ensaios TaqMan® (**Tabela 5**). O controle de qualidade do padrão de genotipagem incluiu controles negativos e positivos em cada rotor (**Tabela 4**).

Tabela 5. Condições de termociclagem para genotipagem de SNPs utilizando Ensaios TaqMan® pré-desenhados e customizados.

Etapa	Temperatura	Duração	Ciclos
Ativação enzimática (AmpliTaqGold®)	95°C	10 minutos	Manter (Hold)
Desnaturação	95°C	15 segundos	40
Anelamento / Extensão	60°C	1 minuto	40

4.8 Perfil plasmático de ácidos graxos poli-insaturados

4.8.2 Extração dos lipídeos

A análise do perfil de ácidos graxos foi realizada no Laboratório de Bioquímica Nutricional da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG.

As amostras de plasma foram descongeladas à temperatura ambiente e os lipídeos extraídos a partir de 1000 μ L de plasma pelo método Folch (solução de Folch - clorofórmio/metanol 2:1) (Folch et al., 1957). À amostra de 1 mL de plasma, foi acrescentado 1,9 mL de solução de Folch (clorofórmio:metanol, 2:1) e homogeneizado em vórtex por 2 minutos. Foi adicionado 0,4 mL de metanol puro a essa solução, e foi centrifugado por 10 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um tubo limpo e seco, e acrescentado 0,8 mL de clorofórmio e 0,64 mL de solução de NaCl (0,73%), homogeneizado em vórtex por 30 segundos e centrifugado por 10 minutos a 3000 rpm. A fase superior foi desprezada e a parede interna do tubo lavada com 1 mL de solução de Folch. A fase superior foi novamente desprezada, e o tubo foi deixado em estufa, semiaberta, a 37°C overnight, até secar.

A etapa de derivatização foi realizada pelo método de Hartman & Lago (1973). Com os tubos secos retirados da estufa, foi acrescentado 1,2 mL de reagente de saponificação (NaOH em metanol) e aquecido em banho-maria a 80°C por 20 minutos, com os tubos fechados com rosca. Em seguida, foram adicionados 6,0 mL de reagente de esterificação, e aquecidos em banho-maria a 80°C por 20 minutos, com os tubos fechados. Após essa etapa, os tubos permaneceram em temperatura ambiente por aproximadamente 5 minutos, até atingir temperatura próxima de 40°C. Adicionou-se 0,5 mL de hexano e 3,0 mL de solução de NaCl (20%), e homogeneizados em vórtex. A fase superior foi transferida para um frasco âmbar identificado. Aas paredes do tubo foram lavadas com 0,5 mL de hexano, e a fase superior transferida para o frasco âmbar. O solvente foi seco com nitrogênio, e a amostra armazenada em freezer -20°C até o momento da análise cromatográfica.

4.8.2 Identificação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos

Após extraídas e secas, as amostras foram ressuspensas em 300 µL de hexano. A separação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos foi realizada em um cromatógrafo a gás modelo CG Solution da marca SHIMADZU®, equipado com detector por ionização de chama (FID). Para registro e análise dos cromatogramas, o aparelho é acoplado a um microcomputador, utilizando-se o programa GC Solution. Os compostos foram separados e identificados em uma coluna capilar Carbowax (30 m x 0,25 mm).

Para a separação cromatográfica, 1 µL de amostra foi injetado com auxílio de seringa de 10 µL (Hamilton®) em sistema Split = 5. O gás nitrogênio foi utilizado como carreador com velocidade linear programada para 43.2 cm/s e os gases hidrogênio e ar sintético formaram a chama no detector.

As temperaturas do Injetor e do Detector foram controladas isotermicamente em 200°C e 220°C. A temperatura inicial da coluna foi de 100°C (mantida por 5 minutos), aumentando em 4°C por minuto até atingir 220° C (mantida por 20 minutos). O fluxo do gás de arraste na coluna foi de 1,0 mL/minuto.

A identificação dos ácidos graxos foi feita pela comparação dos tempos de retenção dos ésteres das amostras com o padrão de referência F.A.M.E. mix (Sigma-Aldrich®, EUA). O conteúdo relativo dos ácidos graxos foi calculado pelo programa GC solution, e se baseava na contribuição de cada ácido graxo em relação à área total dos cromatogramas identificados, expresso como percentual de ácidos graxos (%).

4.9 Ingestão de ácidos graxos poli-insaturados

4.9.1 Recordatório alimentar de 24 horas

Nesse estudo, o Recordatório alimentar de 24h (R24h) foi o instrumento de referência selecionado para validação do QFA. Para o preenchimento do R24h, as

gestantes deveriam recordar e relatar ao entrevistador todos os alimentos e bebidas consumidos no dia anterior, desde o momento em que acordavam até o período em que iam dormir (**APÊNDICE B**). Para a avaliação da quantidade de alimento consumido, utilizou-se álbum contendo fotografias de diversos utensílios com medidas caseiras (ex: colher de sopa cheia; colher de sopa rasa, etc) ou porções de alimentos (P, M ou G) (MONTEIRO et al., 2007). Quando no domicílio da gestante, o entrevistador solicitava permissão para visualizar o utensílio utilizado nas preparações ou durante consumo.

A determinação da quantidade de alimento consumido em cada R24h (R24h₁, R24h₂, R24h₃) foi realizada pela conversão das medidas caseiras para gramas ou mililitros (IBGE, 2011; PINHEIRO et al., 2005).

4.9.2 Questionário de frequência alimentar

Foi construído um Questionário de Frequência de Alimentar (QFA) semiquantitativo nutriente-específico para a estimativa do consumo de lipídeos, com enfoque especial para os LCPUFAs (**APÊNDICE C**). Inicialmente, foi selecionada uma lista com as principais fontes alimentares de LCPUFAs n-3, conforme metodologia utilizada por Sullivan et al. (2008) e Lora et al. (2010). Também foram considerados alimentos com conteúdo de PUFA $\geq 0,1\text{g}/100\text{g}$ de alimento (INGRAM et al., 2012) e aqueles fontes de lipídeos, e que sabidamente eram consumidos por essa população.

A lista era composta principalmente por produtos de origem animal, como carnes (porco ou boi), aves, ovos, vísceras, embutidos, peixes e frutos do mar, além de alimentos regionais, suplementos nutricionais que continham n-3 e óleo de peixe. Alimentos de origem vegetal incluídos foram os óleos vegetais, oleaginosas e sementes, principalmente. Em relação aos cereais, frutas e demais vegetais, foram considerados apenas aqueles com reconhecida contribuição de PUFAS, como os integrais, algumas frutas, leguminosas, oleaginosas e alguns folhosos (crus, cozidos ou refogados). Foram incluídos opções de preparo ou tipo de alimento, o que

possibilitava à gestante indicar entre itens fritos, assados, cozidos ou crus; com pele ou sem pele; com osso ou sem osso; integral, semidesnatado ou desnatado.

Assim, foram selecionados 114 alimentos, disponíveis em 213 itens para seleção e reunidos em 11 grupos de alimentos (Leite e derivados; Carnes e Ovos; Óleos e Gorduras; Petiscos e Enlatados; Cereais, Tubérculos e Raízes; Leguminosas e Oleaginosas; Vegetais; Temperos e Condimentos; Açúcares e Doces; Bebidas; Comidas Regionais). A frequência de consumo era composta por 13 possíveis respostas, que variava de raramente/nunca a ≥ 3 vezes por dia. Para definição da quantidade ingerida, cada alimento era apresentado por meio de porções, em medidas caseiras, usualmente utilizadas por essa população, baseado em R24h aplicados em outros momentos pelos pesquisadores (ex: copo duplo cheio, colher de sopa cheia, etc). Para determinação dos pesos das porções, foi realizada conversão das medidas caseiras para gramas ou mililitros (IBGE, 2011; PINHEIRO et al., 2005). Coube à gestante relatar a frequência de consumo do alimento, a partir do início da gestação, e o número de porções consumidas por vez.

A lista final de alimentos do QFA foi desenvolvida a partir da análise da ingestão dos três R24h. Os alimentos foram agrupados em listas de acordo com a contribuição percentual, em ordem decrescente, dos nutrientes de interesse. Os alimentos que contribuíam com pelo menos 90% da ingestão de cada nutriente foram incluídos no questionário (BLOCK et al., 1985). A contribuição relativa de um alimento em particular foi obtida por pela fórmula de Block et al. (1985):

$$\frac{\text{Conteúdo total do nutriente (ex. colesterol) proveniente no alimento } x}{\text{Conteúdo total do nutriente (ex. colesterol) fornecido por todos os alimentos}} \times 100$$

Vinte e sete alimentos que contribuíam com quase 100% dos LCPUFAs n-3 e com aproximadamente 84% de AA compuseram o QFA – versão reduzida. Como esses 27 alimentos não apresentavam contribuição suficiente em relação aos demais nutrientes, foi criado um QFA – versão expandida, composto pelos 27 alimentos do QFA – versão reduzida, adicionado de 60 alimentos ranqueados segundo teor de ácidos graxos poli-insaturados. “Banana da terra cozida” e “leite desnatado” foram também adicionados, uma vez que faziam parte do consumo habitual da população

regional, e contribuíam para o consumo total de lipídeos, resultando na lista de 89 opções para o QFA – versão expandida (**Tabela 6**). Quando se considera a contribuição energética dos alimentos, observa-se que mesmo alimentos com baixo teor do nutriente são incluídos em razão da elevada frequência de sua ingestão (MEYER, 2013).

Tabela 6. Contribuição percentual do consumo total de ácidos graxos e energia dos alimentos que compuseram o QFA do Estudo de Validação do Questionário de Frequência de Alimentos para gestantes adultas (n = 49)

Nutrientes / Energia ¹	QFA – Versão Reduzida	QFA – Versão
	(%) 27 alimentos	Expandida (%) 89 alimentos
Gramas	13,49	48,40
Saturados	33,87	92,11**
MUFA	40,17	92,45**
PUFA	28,62	89,34**
n-3 PUFA		
ALA	26,34	89,49**
EPA	99,46**	99,46**
DPA	99,69**	99,69**
DHA	96,82**	96,82**
Total n-3 PUFA	38,61	91,12**
Total LCPUFA n-3	97,60**	97,60**
n-6 PUFA		
LA	26,45	89,00**
AA	83,82*	92,90**
Total n-6 PUFA	27,2	89,05**
Colesterol	62,99	90,15**
Lipídeos Totais	35,35	91,61**
Calorias	21,77	67,41

MUFA: Ácidos graxos monoinsaturados; PUFA: Ácidos Graxos Poli-insaturados; n-3 PUFA: Ácidos Graxos Poli-insaturados da série n-3; ALA: Ácido α -Linolênico (18:3; n-3). EPA: Ácido Eicosapentaenoico (20:5; n-3). DPA: Ácido Docosapentaenoico (22:5; n-3). DHA: Ácido Docosahexaenoico (22:6; n-3). Total n-3 PUFA: Somatória dos ácidos graxos ALA, EPA, DPA e DHA; Total LCPUFA n-3: Somatória dos ácidos graxos de cadeia longa EPA, DPA e DHA; n-6 PUFA: Ácidos Graxos Poli-insaturados da série n-6; LA: Ácido Linoléico (18:2; n-6). AA: Ácido Araquidônico (20:4; n-6).

% = Percentual de contribuição dos alimentos listados no QFA expandido e no QFA reduzido em relação ao total do nutriente.

* Percentual de contribuição dos alimentos superior a 80% do total do nutriente nos três R24h.

** Percentual de contribuição dos alimentos superior a 89% do total do nutriente nos três R24h.

Para a análise dos dados, cada alimento contido na versão final do QFA foi convertido em consumo diário, considerando a frequência de consumo e o número de porções relatados pelas gestantes. Esta etapa consistiu, inicialmente, na transformação de cada frequência de consumo relatada em frequência diária (COELHO, 2011). Por exemplo, foi considerada a constante 1 quando o alimento foi consumido 1 vez ao dia; constante 2 quando o consumo foi de 2 vezes ao dia, e assim por diante. A frequência semanal foi dividida por 7 e a mensal por 30, encontrando, assim, a constante de consumo diário de cada alimento. Para o consumo raramente/nunca foi considerada a constante 0. A seguir, cada constante, que significava a frequência diária de consumo de cada alimento, era multiplicada pela quantidade do alimento consumido por vez. O produto final correspondia à quantidade diária, em gramas ou mililitros, do alimento consumido pela gestante.

4.9.3 Análise da ingestão de nutrientes

Os questionários foram tabulados e analisados no software Excel 2010. Para estimativa do consumo de energia e nutrientes nos três R24h e no QFA foi utilizada a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO) (NEPA – UNICAMP, 2011). Para as preparações, os nutrientes foram estimados de acordo com seus ingredientes (MIRMIRAN et al., 2010). Quando um alimento ou nutriente não era encontrado na TACO, foi utilizada a Tabela de Composição de Alimentos (National Nutrient Database for Standard Reference) do Departamento de Agricultura do Estados Unidos – USDA (USDA, 2014).

Os questionários de consumo forneceram informações sobre lipídeos totais, e dos ácidos graxos: saturados, monoinsaturados, poli-insaturados, 18:2n-6 (LA; ácido linoleico), 20:4n-6 (AA; ácido araquidônico), 18:3n-3 (ALA; ácido α -linolênico), 20 : 5n-3 (EPA), 22 : 6n-3 (DHA), 22 : 5n-3 (DPA).

Para o R24h, a ingestão de nutrientes foi estimada considerando-se a média dos valores dos três R24h (R24h₁, R24h₂, R24h₃). O consumo energético foi estimado para identificar e excluir as gestantes com consumo extremo e improvável no três R24h – menor que 700kcal ou maior que 5000kcal (PAALANEN et al., 2006). Esse

critério não foi utilizado para o QFA, uma vez que se tratava de um instrumento nutriente-específico, cujos alimentos altamente energéticos e pobres em lipídeos foram excluídos, como cereais polidos e diversas frutas.

4.10 Desfechos gestacionais

No período de setembro de 2013 a dezembro de 2015, foram obtidos os dados das crianças ao nascer no Departamento de Vigilância Epidemiológica (VIEP) da Secretaria Municipal de Saúde da cidade de Santo Antônio de Jesus, Bahia, Brasil. Foram coletados o peso ao nascer (g) e a data de nascimento das crianças para cálculo da duração da gestação.

A duração da gestação (dias) foi estimada pelo tempo transcorrido entre o início da gestação e o parto. Para o cálculo, foi considerada a diferença entre a data de nascimento da criança e a data da última menstruação (DUM) da gestante.

4.11 Variáveis independentes

4.11.1 Ingestão de ácidos graxos poli-insaturados na gestação

Para as variáveis de consumo alimentar foram utilizadas duas fontes de dados: o recordatório de 24h (R24h) e o Questionário de Frequência de Alimentar (QFA). Os valores médios da ingestão alimentar estimados por três R24h foram utilizados unicamente para validação do QFA. Após sua validação, o QFA foi utilizado para determinar a ingestão de ácidos graxos poli-insaturados pelas gestantes.

Os ácidos graxos estimados pelo QFA estão apresentados em g/dia ou mg/dia. Foram analisados os ácidos graxos: linoleico (LA; 18:2n-6), araquidônico (AA; 20:4n-6), α -linolênico (ALA; 18:3n-3), eicosapentaenoico (EPA; 20:5n-3) e docosahexaenoico (DHA; 22:6n-3).

A ingestão de ALA e da razão LA/ALA, em tercís, foi utilizada para categorização das gestantes quanto aos níveis de consumo.

4.11.2 Polimorfismos genéticos maternos

Os polimorfismos dos genes das dessaturases (*FADS*) foram considerados **variáveis independentes**, quando relacionados individualmente com as variáveis dependentes, ou **modificadores de efeito**, quando utilizados na análise de interação gene-nutriente. Cada SNP foi analisado separadamente e categorizado segundo genótipo em: homocigoto para o alelo de maior frequência (MM), heterocigoto (Mm) e homocigoto para o alelo de menor frequência (mm).

4.12 Variáveis dependentes

4.12.1 Ácidos graxos plasmáticos maternos

Cada ácido graxo foi expresso individualmente como porcentagem (%) da fração lipídica em relação ao conteúdo total de ácidos graxos da amostra.

Foram analisados os ácidos graxos plasmáticos: linoleico (LA; 18:2n-6), araquidônico (AA; 20:4n-6), α -linolênico (ALA; 18:3n-3), eicosapentaenoico (EPA; 20:5n-3) e docosa-hexaenoico (DHA; 22:6n-3). Para estimativa da conversão dos LCPUFAs das vias ômega 3 e ômega 6, foram utilizados os índices: AA/LA e EPA/ALA, respectivamente (GILLINGHAM et al., 2013).

4.12.2 Peso da criança ao nascer e duração da gestação

O peso da criança ao nascer e a duração da gestação foram os desfechos principais do estudo. Foram apresentados como variáveis contínuas, estimados em gramas e em dias, respectivamente.

4.13 Variáveis concomitantes

Dentre as variáveis concomitantes, foram selecionados o sexo da criança [feminino (1), masculino (2)], e as características maternas: escolaridade [ensino fundamental (1), ensino médio (2)], ingestão de bebida alcoólica na gestação [sim (1), não (2)], tabagismo durante a gestação [sim (1), não (2)], cor [negras (1), pardas (2), brancas (3), outros (4)]. Idade, IMC pré-gestacional, número de gestações, ingestão de ALA, ingestão de EPA e ingestão de DHA foram utilizadas como variáveis concomitantes contínuas.

4.14 Processamento dos dados e plano de análise

Os testes estatísticos utilizados foram específicos para cada objetivo proposto, e resultaram nos manuscritos apresentados na sessão 6 desta Tese.

4.15 Aspectos Éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, número do parecer: 241.225 de 09/04/2013 (**ANEXO 1**). Os propósitos do estudo e sua metodologia foram

explicados às gestantes, inclusive o compromisso de confidencialidade dos dados. Somente após a concordância explícita e a assinatura do termo de consentimento (**APÊNDICE D**) pelas gestantes foi dada continuidade à entrevista. O estudo seguiu as normas nacionais (Resolução nº466/2012 do Conselho Nacional de Saúde / Ministério da Saúde) e internacionais (Declaração de Helsinki) que regem os aspectos éticos da pesquisa com seres humanos.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-HILAL, M.; ALSALEH, A.; MANIOU, Z.; LEWIS, F. J.; HALL, W. L.; SANDERS T. A.; O'DELL S. D.; MARINA STUDY TEAM. Genetic variation at the FADS1-FADS2 gene locus influences delta-5 desaturase activity and LC-PUFA proportions after fish oil supplement. **Journal of Lipid Research**, v.54, n.2, p. 542-551, 2013.
- ALWAN, N. A.; CADE, J. E.; MCARDLE, H. J.; GREENWOOD, D. C.; HAYES, H. E.; SIMPSON, N. A. Maternal iron status in early pregnancy and birth outcomes: insights from the Baby's Vascular health and Iron in Pregnancy study. **The British Journal of Nutrition**, v.113, n.12, p.1985-1992, 2015.
- AZRAD, M.; ZHANG, K.; VOLLMER, R. T.; MADDEN, J.; POLASCIOK, T. J.; SNYDER, D. C.; RUFFIN, M. T.; MOUL, J. W.; BRENNER, D.; HARDY, R. W.; DEMARK-WAHNEFRIED, W. Prostatic alpha-linolenic acid (ALA) is positively associated with aggressive prostate cancer: a relationship which may depend on genetic variation in ALA metabolism. **PLoS One**, v.7, n.12, p.e53104, 2012.
- BALASUBRAMANIAN, S. P.; COX, A.; BROWN, N. J.; REED, M. W. Candidate gene polymorphisms in solid cancers. **European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology**, v.30, n.6, p.593-601, 2004.
- BEST, K. P.; GOLD, M.; KENNEDY, D.; MARTIN, J.; MAKRIDES, M. Omega-3 long-chain PUFA intake during pregnancy and allergic disease outcomes in the offspring: a systematic review and meta-analysis of observational studies and randomized controlled trials. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.103, n.1, p.128-43, 2016.
- BLAND, J. M.; ALTMAN, D. G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. **Lancet**, v.1, n.8476, p.307-10, 1986.
- BLAND, J. M.; ALTMAN, D. G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. **International Journal of Nursing Studies**, v.47, p.931 – 936, 2010.
- BLENCOWE, H.; COUSENS, S.; OESTERGAARD, M. Z.; CHOU, D.; MOLLER, A. B.; NARWAL, R.; ADLER, A.; VERA GARCIA, C.; ROHDE, S.; SAY, L.; LAWN, J. E. National; regional; and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010

with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications. **Lancet**, v.379, n.9832, p.2162-2172, 2012.

BLOCK, G.; DRESSER, C. M.; HARTMAN, A. M.; CARROLL, M. D. Nutrient sources in the American diet: quantitative data from the NHANES II survey. II. Macronutrients and fats. **American Journal of Epidemiology**, v.122, p. 27-40, 1985.

BOKOR, S.; DUMONT, J.; SPINNEKER, A.; GONZALEZ-GROSS, M.; NOVA, E.; WIDHAL, M. K.; MOSCHONIS, G.; STEHLE, P.; AMOUYEL, P.; DE HENAUW, S.; MOLNÀR, D.; MORENO, L. A.; MEIRHAEGHE, A.; DALLONGEVILLE, J.; HELENA STUDY GROUP. Single nucleotide polymorphisms in the FADS gene cluster are associated with delta-5 and delta-6 desaturase activities estimated by serum fatty acid ratios. **Journal of Lipid Research**, v.51, n.8, p.2325-2333, 2010.

BRETT, K. E.; FERRARO, Z. M.; YOCKELL-LELIEVRE, J.; GRUSLIN, A.; ADAMO, K.B. Maternal-Fetal Nutrient Transport in Pregnancy Pathologies: The Role of the Placenta. **International Journal of Molecular Sciences**, v.15, n.9, p.16153-16185, 2014.

CAMP, K. M.; TRUJILLO, E. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: nutritional genomics. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v.114, n.2, p.299-312, 2014.

CAMPOY, C.; ESCOLANO-MARGARIT, M. V.; ANJOS, T.; SZAJEWSKA, H.; UAUY, R. Omega 3 fatty acids on child growth, visual acuity and neurodevelopment. **British Journal of Nutrition**, v.107, n.Suppl 2, p.S85-106, 2012.

CARLSEN, K.; PEDERSEN, L.; BØNNELYKKE, K.; STARK, K. D.; LAURITZEN, L.; BISGAARD, H. Association between whole-blood polyunsaturated fatty acids in pregnant women and early fetal weight. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.67, n.9, p.978-983, 2013.

CARLSON, S. E.; COLOMBO, J.; GAJEWSKI, B. J.; GUSTAFSON, K. M.; MUNDY, D.; YEAST, J.; GEORGIEFF, M. K.; MARKLEY, L. A.; KERLING, E. H.; SHADDY, D. J. DHA supplementation and pregnancy outcomes. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.97, n.4, p.808-815, 2013.

CASCIO, G.; SCHIERA, G.; DI LIEGRO, I. Dietary fatty acids in metabolic syndrome; diabetes and cardiovascular diseases. **Current Diabetes Reviews**, v.8, n.1, p.2-17, 2012.

CASÓS, K.; ZARAGOZÁ, M. C.; ZARKOVIC, N.; ZARKOVIC, K.; ANDRISIC, L.; PORTERO-OTÍN, M.; CACABELOS, D.; MITJAVILA, M. T. A fish-oil-rich diet reduces vascular oxidative stress in apoE(-/-) mice. **Free Radical Research**, v.44, n.7, p.821-829, 2010.

CHEN, B.; JI, X.; ZHANG, L.; HOU, Z.; LI, C.; TONG, Y. Fish oil supplementation improves pregnancy outcomes and size of the newborn: a meta-analysis of 21 randomized controlled trials. **Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v.29, n.12, p.2017-27, 2016.

CHILTON, F. H.; MURPHY, R. C.; WILSON, B. A.; SERGEANT, S.; AINSWORTH, H.; SEEDS, M. C.; MATHIAS, R. A. Diet-gene interactions and PUFA metabolism: a potential contributor to health disparities and human diseases. **Nutrients**, v.6, n.5, p.1993-2022, 2014.

CHRISTIAN, L. M.; BLAIR, L. M.; PORTER, K.; LOWER, M.; COLE, R. M.; BELURY, M. A. Polyunsaturated Fatty Acid (PUFA) Status in Pregnant Women: Associations with Sleep Quality, Inflammation, and Length of Gestation. **PLoS One**, v.11, n.2, p.e0148752, 2016.

COELHO, N. L. P. Associação entre padrões de consumo alimentar gestacional e peso ao nascer. [Dissertação]. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, 2011.

CORMIER, H.; RUDKOWSKA, I.; PARADIS, A. M.; THIFAUULT, E.; GARNEAU, V.; LEMIEUX, S.; COUTURE, P.; VOHL, M. C. Association between polymorphisms in the fatty acid desaturase gene cluster and the plasma triacylglycerol response to an n-3 PUFA supplementation. **Nutrients**, v.4, n.8, p.1026-1041, 2012.

DE SOUZA, R. J.; MENTE, A.; MAROLEANU, A.; COZMA, A. I.; HA, V.; KISHIBE, T.; ULERYK, E.; BUDYLOWSKI, P.; SCHÜNEMANN, H.; BEYENE, J.; ANAND, S. S. Intake of saturated and trans unsaturated fatty acids and risk of all cause mortality; cardiovascular disease; and type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of observational studies. **BMJ**, v.351, p.h3978, 2015.

DE LORGERIL, M.; SALEN, P. New insights into the health effects of dietary saturated and omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids. **BMC Medical Education**, v.21, n.10, p.50, 2012.

DESSI, A.; CESARE MARINCOLA, F.; MASILI, A; GAZZOLO, D.; FANOS, V. Clinical metabolomics and nutrition: the new frontier in neonatology and pediatrics. **BioMed Research International**, v.2014, p.981219, 2014.

DING, Z.; LIU, G. L.; LI, X.; CHEN, X. Y.; WU, Y. X.; CUI, C. C.; ZHANG, X.; YANG, G.; XIE, L. Association of polyunsaturated fatty acids in breast milk with fatty acid desaturase gene polymorphisms among Chinese lactating mothers. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids**, v.109, p.66-71, 2016.

DIRIX, C. E.; KESTER, A. D.; HORNSTRA, G. Associations between neonatal birth dimensions and maternal essential and trans fatty acid contents during pregnancy and at delivery. **The British Journal of Nutrition**, v.101, n.3, p.399-407, 2009a.

DIRIX, C. E.; KESTER, A. D.; HORNSTRA, G. Associations between term birth dimensions and prenatal exposure to essential and trans fatty acids. **Early Human Development**, v.85, n.8, p.525-530, 2009b.

DOO, M.; KIM, Y. Obesity: interactions of genome and nutrients intake. **Preventive Nutrition and Food Science**, v.20, n.1, p.1-7, 2015.

FAO. **Fats and fatty acids in human nutrition**. Report on expert consultation. FAO Food Nutrition Paper 91. Rome; 2010.

FACCHINETTI, F.; FAZZIO, M.; VENTURINI, P. Polyunsaturated fatty acids and risk of preterm delivery. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v.9, n.1, p.41-8, 2005.

FARHUD, D.; ZARIF YEGANEH, M.; ZARIF YEGANEH, M. Nutrigenomics and nutrigenetics. **Iran Journal of Public Health**, v.39, n.4, p.1-14, 2010.

FIGUERAS, F.; GARDOSI, J. Intrauterine growth restriction: new concepts in antenatal surveillance; diagnosis; and management. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.204, n.4, p.288-300, 2011.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v.226, n.1, p.497-509, 1957.

FREEMANTLE, E.; LALOVIC, A.; MECHAWAR, N.; TURECKI, G. Age and haplotype variations within FADS1 interact and associate with alterations in fatty acid composition in human male cortical brain tissue. **PLoS One**, v.7, n.8, p.e42696, 2012.

GALLAGHER, S. R. Quantitation of DNA and RNA with APPENDIX 3D Absorption and Fluorescence Spectroscopy. **Current Protocols in Molecular Biology**, Appendix 3, p.3D, 2011.

GLASER, C.; LATTKA, E.; RZEHA, P.; STEER, C.; KOLETZKO, B. Genetic variation in polyunsaturated fatty acid metabolism and its potential relevance for human development and health. **Maternal & Child Nutrition**, v.7, Suppl 2, p.27-40, 2011.

GIACOMELLO, A.; SCHMIDT, M. I.; NUNES, M. A. A.; DUNCAN, B. B.; SOARES, R. M.; MANZOLLI, P.; CAMEY, S. Validação relativa de Questionário de Frequência Alimentar em gestantes usuárias de serviços do Sistema Único de Saúde em dois municípios no Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 8, p.445-454, 2008.

GILLINGHAM, L. G.; HARDING, S. V.; RIDEOUT, T. C.; YURKOVA, N.; CUNNANE, S. C.; ECK, P. K.; JONES, P. J. Dietary oils and FADS1-FADS2 genetic variants modulate [¹³C]α-linolenic acid metabolism and plasma fatty acid composition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.97, n.1, p.195-207, 2013.

GONZALEZ-CASANOVA, I.; RZEHA, P.; STEIN, A. D.; GARCIA FERREGRINO, R.; DOMMARCO, J. A.; BARRAZA-VILLARREAL, A.; DEMMELMAIR, H.; ROMIEU, I.; VILLALPANDO, S.; MARTORELL, R.; KOLETZKO, B.; RAMAKRISHNAN, U. Maternal single nucleotide polymorphisms in the fatty acid desaturase 1 and 2 coding regions modify the impact of prenatal supplementation with DHA on birth weight. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.103, n.4, p.1171-8, 2016.

GOULD, J. F.; ANDERSON, A. J.; YELLAND, L. N.; GIBSON, R. A.; MAKRIDES, M. Maternal characteristics influence response to DHA during pregnancy. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids**, v.108:5-12, 2016.

GRIEGER, J. A.; CLIFTON, V. L. A review of the impact of dietary intakes in human pregnancy on infant birthweight. **Nutrients**, v.7, n.1, p.153-178, 2014.

GUNARATNE, A. W.; MAKRIDES, M.; COLLINS, C.T. Maternal prenatal and/or postnatal n-3 long chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) supplementation for preventing allergies in early childhood. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, v.7, p.CD010085, 2015.

HANE BUTT, F. L.; DEMMELMAIR, H.; SCHIESSL, B.; LARQUÉ, E.; KOLETZKO, B. Long-chain polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA) transfer across the placenta. **Clinical Nutrition**, v.27, n.5, p.685-693, 2008.

HARSLØF, L. B.; LARSEN, L. H.; RITZ, C.; HELLGREN, L. I.; MICHAELSEN, K. F.; VOGEL, U.; LAURITZEN, L. FADS genotype and diet are important determinants of DHA status: a cross-sectional study in Danish infants. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.97, n.6, 1403-1410, 2013.

HARRIS, M. A.; REECE, M. S.; MCGREGOR, J. A.; WILSON, J. W.; BURKE, S. M.; WHEELER, M.; ANDERSON, J. E.; AULD, G. W.; FRENCH, J. I.; ALLEN, K. G. The Effect of Omega-3 Docosahexaenoic Acid Supplementation on Gestational Length: Randomized Trial of Supplementation Compared to Nutrition Education for Increasing n-3 Intake from Foods. **BioMed Research International**, v.2015, p.123078, 2015.

HARRIS, W. S.; BAACK, M. L. Beyond building better brains: bridging the docosahexaenoic acid (DHA) gap of prematurity. **Journal of Perinatology**, v.35, n.1, p.1-7, 2015.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, v.22, n.6, p.475-476, 1973.

HELLSTRAND, S.; ERICSON, U.; GULLBERG, B.; HEDBLAD, B.; ORHO-MELANDER, M.; SONESTEDT, E. Genetic variation in FADS1 has little effect on the association between dietary PUFA intake and cardiovascular disease. **The Journal of Nutrition**, v.144, n.9, p1356-63, 2014.

HELLSTRAND, S.; SONESTEDT, E.; ERICSON, U.; GULLBERG, B.; WIRFÄLT, E.; HEDBLAD, B.; ORHO-MELANDER, M. Intake levels of dietary long-chain PUFAs

modify the association between genetic variation in FADS and LDL-C. **Journal of Lipid Research**, v.53, n.6, p.1183-1189, 2013.

HESTER, A. G.; MURPHY, R. C.; UHLSON, C. J.; IVESTER, P.; LEE, T. C.; SERGEANT, S.; MILLER, L. R.; HOWARD, T. D.; MATHIAS, R. A.; CHILTON, F. H. Relationship between a common variant in the fatty acid desaturase (FADS) cluster and eicosanoid generation in humans. **The Journal of Biological Chemistry**, v.289, n.32, p.22482-22489, 2014.

HOWARD, T. D.; MATHIAS, R. A.; SEEDS, M. C.; HERRINGTON, D. M.; HIXSON J. E.; SHIMMIN, L. C.; HAWKINS, G. A.; SELLERS, M.; AINSWORTH, H. C.; SERGEANT, S.; MILLER, L. R.; CHILTON, F. H. DNA methylation in an enhancer region of the FADS cluster is associated with FADS activity in human liver. **PLoS One**, v.9, n.5, p.e97510, 2014.

HONG, S. H.; KWAK, J. H.; PAIK, J. K.; CHAE, J. S.; LEE, J. H. Association of polymorphisms in FADS gene with age-related changes in serum phospholipid polyunsaturated fatty acids and oxidative stress markers in middle-aged nonobese men. **Clinical Interventions in Aging**, v.8, p.585-596, 2013.

HUFFMAN, S. L.; HARIKA, R. K.; EILANDER, A.; OSENDARP, S. J. Essential fats: how do they affect growth and development of infants and young children in developing countries? A literature review. **Maternal and Child Nutrition**, v.7, n.Suppl 3, p.44-65, 2011.

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Orçamentos Familiares - POF 2008 – 2010: **Tabela de medidas referidas para os alimentos consumidos no Brasil**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; 2011.

INGRAM, M. A.; STONEHOUSE, W.; RUSSELL, K. G.; MEYER, B. J.; KRUGER, R. The New Zealand PUFA semiquantitative food frequency questionnaire is a valid and reliable tool to assess PUFA intakes in healthy New Zealand adults. **Journal of Nutrition**, v.142, n.11, p.1968-1974, 2012.

INNIS, S. M. Dietary (n-3) fatty acids and brain development. **Journal of Nutrition**, v.137, n.4, p.855-859, 2007.

INNIS, S. M. Impact of maternal diet on human milk composition and neurological development of infants. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.99, n.3, p.734S-741S, 2014.

INNIS, S. M. Perinatal biochemistry and physiology of long-chain polyunsaturated fatty acids. **The Journal of Pediatrics**, v.143, 4 Suppl, p.S1-8, 2003.

INSTITUTE OF MEDICINE, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. **Dietary Reference Intakes of energy, carbohydrates, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids** [Internet]. Washington: The National Academic Press; 2005 [acesso 2015 jun 05]. Disponível em: <<http://fnic.nal.usda.gov/dietary-guidance/dri-reports/energy-carbohydrate-fiber-fat-fatty-acids-cholesterol-protein-and-amino>>.

ISLAM, M. M. The Effects of Low Birth Weight on School Performance and Behavioral Outcomes of Elementary School Children in Oman. **Oman Medical Journal**, v.30, n.4, p.241-251, 2015.

JANSSEN, C. I.; KILIAAN, A. J. Long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) from genesis to senescence: the influence of LCPUFA on neural development; aging; and neurodegeneration. **Progress in Lipid Research**, v.53, p.1-17, 2014.

JAUREGUIBERRY, M. S.; TRICERRI, M. A.; SANCHEZ, S. A.; FINARELLI, G. S.; MONTANARO, M. A.; PRIETO, E. D.; RIMOLDI, O. J. Role of plasma membrane lipid composition on cellular homeostasis: learning from cell line models expressing fatty acid desaturases. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica** (Shanghai), v.46, n.4, p.273-282, 2014.

JELLIFFE, D. B. **Evaluación del estado de nutrición de la comunidad**. Ginebra: Organización Mundial de La Salud; 1968.

JUDGE, M. P.; CONG, X.; HAREL, O.; COURVILLE, A. B.; LAMMI-KEEFE, C. J. Maternal consumption of a DHA-containing functional food benefits infant sleep patterning: An early neurodevelopmental measure. **Early Human Development**, v.88, n.7, p.531-537, 2012.

JUONALA, M.; CHEUNG, M. M.; SABIN, M. A.; BURGNER, D.; SKILTON, M. R.; KÄHÖNEN, M.; HUTRI-KÄHÖNEN, N.; LEHTIMÄKI, T.; JULA, A.; LAITINEN, T.;

JOKINEN, E.; TAITTONEN, L.; TOSSAVAINEN, P.; VIIKARI, J. S.; MAGNUSSEN, C. G.; RAITAKARI, O. T. Effect of birth weight on life-course blood pressure levels among children born premature: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. **Journal of Hypertension**, v.33, n.8, p.1542-1448, 2015.

KAR, S.; WONG, M.; ROGOZINSKA, E.; THANGARATINAM, S. Effects of omega-3 fatty acids in prevention of early preterm delivery: a systematic review and meta-analysis of randomized studies. **European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology**, v.198, p.40-6, 2016.

KATZ, J.; LEE, A. C.; KOZUKI, N.; LAWN, J. E.; COUSENS, S.; BLENCOWE, H.; EZZATI, M.; BHUTTA, Z. A.; MARCHANT, T.; WILLEY, B. A.; ADAIR, L.; BARROS, F.; BAQUI, A. H.; CHRISTIAN, P.; FAWZI, W.; GONZALEZ, R.; HUMPHREY, J.; HUYBREGTS, L.; KOLSTEREN, P.; MONGKOLCHATI, A.; MULLANY, L. C.; NDYOMUGYENYI, R.; NIEN, J. K.; OSRIN, D.; ROBERFROID, D.; SANIA, A.; SCHMIEGELOW, C.; SILVEIRA, M. F.; TIELSCH, J.; VAIDYA, A.; VELAPHI, S. C.; VICTORA, C. G.; WATSON-JONES, D.; BLACK, R. E.; CHERG Small-for-Gestational-Age-Preterm Birth Working Group. Mortality risk in preterm and small-for-gestational-age infants in low-income and middle-income countries: a pooled country analysis. **Lancet**, v.382, n.9890, p.417-425, 2013.

KOLETZKO, B.; CETIN, I.; BRENNAN, J. T.; Perinatal Lipid Intake Working Group; Child Health Foundation; Diabetic Pregnancy Study Group; European Association of Perinatal Medicine; European Association of Perinatal Medicine; European Society for Clinical Nutrition and Metabolism; European Society for Paediatric Gastroenterology; Hepatology and Nutrition; Committee on Nutrition; International Federation of Placenta Associations; International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids. Dietary fat intakes for pregnant and lactating women. **The British Journal of Nutrition**, v.98, n.5, p.873-877, 2007.

KOLETZKO, B.; LATTKA, E.; ZEILINGER, S.; ILLIG, T.; STEER, C. Genetic variants of the fatty acid desaturase gene cluster predict amounts of red blood cell docosahexaenoic and other polyunsaturated fatty acids in pregnant women: findings from the Avon Longitudinal Study of Parents and Children. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.93, n.1, p.211-219, 2011.

KRAMER, M. S. Determinants of Low Birth Weight: Methodological assessment and meta-analysis. **Bulletin of the World Health Organization**, v.65, n.5, p.663-737, 1987.

LAGER, S.; POWELL, T. L. Regulation of nutrient transport across the placenta. **Journal of Pregnancy**, v.2012, p.179827, 2012.

LATTKA E, EGGERS S, MOELLER G, HEIM K, WEBER M, MEHTA D, PROKISCH H, ILLIG T, ADAMSKI J. A common FADS2 promoter polymorphism increases promoter activity and facilitates binding of transcription factor ELK1. **Journal of Lipid Research**, v.51, n.1, p.182-91, 2010a.

LATTKA, E.; ILLIG, T.; HEINRICH, J.; KOLETZKO, B. Do FADS genotypes enhance our knowledge about fatty acid related phenotypes? **Clinical Nutrition**, v.29, n.3, p.277-287, 2010b.

LATTKA, E.; KOLETZKO, B.; ZEILINGER, S.; HIBBELN, J. R.; KLOPP, N.; RING, S. M.; STEER, C. D. Umbilical cord PUFA are determined by maternal and child fatty acid desaturase (FADS) genetic variants in the Avon Longitudinal Study of Parents and Children (ALSPAC). **The British Journal of Nutrition**, v.109, n.7, p.1196-1210, 2013.

LEE, C. H.; LEE, S. D.; OU, H. C.; LAI, S. C.; CHENG, Y. J. Eicosapentaenoic acid protects against palmitic acid-induced endothelial dysfunction via activation of the AMPK/eNOS pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, v.15, n.6, p.10334-10349, 2014.

LORA, K. R.; LEWIS, N. M.; ESKRIDGE, K. M.; STANEK-KROGSTRAND, K.; RITTER-GOODER, P. Validity and reliability of an omega-3 fatty acid food frequency questionnaire for first-generation Midwestern Latinas. **Nutrition Research and Practice**, v.30, n.8, p.550-557, 2010.

LU, Y.; FESKENS, E. J.; DOLLÉ, M. E.; IMHOLZ, S.; VERSCHUREN, W. M.; MÜLLER, M.; BOER, J. M. Dietary n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acid intake interacts with FADS1 genetic variation to affect total and HDL-cholesterol concentrations in the Doetinchem Cohort Study. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.92, n.1, p.258-65, 2010.

LUCA, A. C.; HOLOC, A. S.; IORDACHE, C. Congenital heart malformations in newborn babies with low birth weight. **Revista medico-chirurgicală a Societății de Medici și Naturaliști din Iași**, v.119, n.2, p.353-360, 2015.

MAKRIDES, M.; ANDERSON, A.; GIBSON, R. A. **Early influences of nutrition on fetal growth.** Nestle Nutr Inst Workshop Ser, v.71, p.1-9, 2013.

MARQUARDT, A.; STÖHR, H.; WHITE, K.; WEBER, B. H. cDNA cloning; genomic structure; and chromosomal localization of three members of the human fatty acid desaturase family. **Genomics**, v.66, n.2, p.175-183, 2000.

MARTINELLI, N.; GIRELLI, D.; MALERBA, G.; GUARINI, P.; ILLIG, T.; TRABETTI, E.; SANDRI, M.; FRISO, S.; PIZZOLO, F.; SCHAEFFER, L.; HEINRICH, J.; PIGNATTI, P. F.; CORROCHER, R.; OLIVIERI, O. FADS genotypes and desaturase activity estimated by the ratio of arachidonic acid to linoleic acid are associated with inflammation and coronary artery disease. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.88, n.4, p.941-949, 2008.

MEYER, B. J.; MANN, N. J.; LEWIS, J. L.; MILLIGAN, G. C.; SINCLAIR, A. J.; HOWE, P. R. Dietary intakes and food sources of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids. **Lipids**, v.38, n.4, p.391-398, 2003.

MICHALCZUK, M.; URBAN, B.; CHRZANOWSKA-GRENDA, B.; OZIEBŁO-KUPCZYK, M.; BAKUNOWICZ-ŁAZARCZYK, A. An Influence of Birth Weight; Gestational Age; and Apgar Score on Pattern Visual Evoked Potentials in Children with History of Prematurity. **Neural Plasticity**, v.2015, p.754864, 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. DATASUS – Departamento de Informática do SUS. **Proporção de nascidos vivos de baixo peso ao nascer - G.16 – 2012a.** Disponível em: http://fichas.ripsa.org.br/2012/G-16/?l=pt_BR [acessado em 19 out 2015].

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SVS – Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos (SINASC). 2012b. D.17 **Proporção de nascidos vivos com baixo peso ao nascer. Ficha de qualificação.** Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2012/g16.def> [acessado em 19 out 2015].

MIRMIRAN, P.; ESFAHANI, F. H.; MEHRABI, Y.; HEDAYATI, M.; AZIZI, F. Reliability and relative validity of an FFQ for nutrients in the Tehran lipid and glucose study. **Public Health Nutrition**, v.13, n.5, p.654-662, 2010.

MOLTÓ-PUIGMARTÍ, C.; PLAT, J.; MENSINK, R. P.; MÜLLER, A.; JANSEN, E.; ZEEGERS, M. P.; THIJS, C. FADS1 FADS2 gene variants modify the association between fish intake and the docosahexaenoic acid proportions in human milk. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.91, n.5, p.1368-1376, 2010.

MOLTÓ-PUIGMARTÍ, C.; VAN DONGEN, M. C.; DAGNELIE, P. C.; PLAT, J.; MENSINK, R. P.; TAN, F. E.; HEINRICH, J.; THIJS, C. Maternal but not fetal FADS gene variants modify the association between maternal long-chain PUFA intake in pregnancy and birth weight. **The Journal of Nutrition**, v.144, n.9, p.1430-1437, 2014.

MONTEIRO, J. P.; PFRIMER, K.; TREMESCHIN, M. H.; MOLINA, M. C.; CHIARELLO, P. **Consumo Alimentar – Visualizando porções** (Série Nutrição e Metabolismo). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2007.

MORALES, E.; BUSTAMANTE, M.; GONZALEZ, J. R.; GUXENS, M.; TORRENT, M.; MENDEZ, M.; GARCIA-ESTEBAN, R.; JULVEZ, J.; FORNS, J.; VRIJHEID, M.; MOLTO-PUIGMARTI, C.; LOPEZ-SABATER, C.; ESTIVILL, X.; SUNYER, J. Genetic variants of the FADS gene cluster and ELOVL gene family; colostrums LC-PUFA levels; breastfeeding; and child cognition. **PLoS One**, v.6, n.2, p.e17181, 2011.

MORI, K.; ISHIDA, T.; YASUDA, T.; HASOKAWA, M.; MONGUCHI, T.; SASAKI, M.; KONDO, K.; NAKAJIMA, H.; SHINOHARA, M.; SHINKE, T.; IRINO, Y.; TOH, R.; NISHIMURA, K.; HIRATA, K. Serum Trans-Fatty Acid Concentration Is Elevated in Young Patients With Coronary Artery Disease in Japan. **Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society**, v.79, n.9, p.2017-2025, 2015.

MUSKIET, F. A.; VAN GOOR, S. A.; KUIPERS, R. S.; VELZING-AARTS, F. V.; SMIT, E. N.; BOUWSTRA, H.; DIJCK-BROUWER, D. A.; BOERSMA, E. R.; HADDERS-ALGRA, M. Long-chain polyunsaturated fatty acids in maternal and infant nutrition. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids**, v.75, n.3, p.135-144, 2006.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. **Database of single nucleotide polymorphisms (SNPs) and multiple small-scale variations that include insertions/deletions, microsatellites, and non-polymorphic variants**. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/> [acessado em 10 jul 2015].

NEPA – UNICAMP. **Tabela brasileira de composição de alimentos / NEPA – UNICAMP** - 4. ed. rev. e ampl. Campinas: NEPAUNICAMP; 2011.

NWANKWO, J. O.; SPECTOR, A. A.; DOMANN, F. E. A nucleotide insertion in the transcriptional regulatory region of FADS2 gives rise to human fatty acid delta-6-desaturase deficiency. **Journal of Lipid Research**, 2003 Dec;44(12):2311-9.

NOAKES, P. S.; VLACHAVA, M.; KREMMYDA, L.S.; DIAPER, N. D.; MILES, E, A; ERLEWYN-LAJEUNESSE M; WILLIAMS AP; GODFREY KM; CALDER PC. Increased intake of oily fish in pregnancy: effects on neonatal immune responses and on clinical outcomes in infants at 6 mo. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.95, n.2, p.395-404, 2012.

OLSEN, S. F.; HANSEN, H. S.; SOMMER, S.; JENSEN, B.; SØRENSEN, T. I.; SECHER, N. J.; ZACHARIASSEN, P. Gestational age in relation to marine n-3 fatty acids in maternal erythrocytes: a study of women in the Faroe Islands and Denmark. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.164, n.5 Pt 1, p.1203-1209, 1991.

OLSEN, S. F.; ØSTERDAL, M. L.; SALVIG, J. D.; MORTENSEN, L. M.; RYTTER, D.; SECHER, N. J.; HENRIKSEN, T. B. Fish oil intake compared with olive oil intake in late pregnancy and asthma in the offspring: 16 y of registry-based follow-up from a randomized controlled trial. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.88, n.1, p.167-175, 2008.

OLSEN, S. F.; OLSEN, J.; FRISCHE, G. Does fish consumption during pregnancy increase fetal growth? A study of the size of the newborn; placental weight and gestational age in relation to fish consumption during pregnancy. **International Journal of Epidemiology**, v.19, n.4, p.971-977, 1990.

ORTON, H. D.; SZABO, N. J.; CLARE-SALZLER, M.; NORRIS, J. M. Comparison between omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acid intakes as assessed by a food frequency questionnaire and erythrocyte membrane fatty acid composition in young children. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.62, p.733-738, 2008.

ØVERBY, N. C.; SERRA-MAJEM, L.; ANDERSEN, L. F. Dietary assessment methods on n-3 fatty acid intake: a systematic review. **British Journal of Nutrition**, v.102, n.Suppl 1, p.S56-63, 2009.

PAALANEN, L.; MÄNNISTÖ, S.; VIRTANEN, M. J.; KNEKT, P.; RÄSÄNEN, L.; MONTONEN, J.; PIETINEN, P. Validity of a food frequency questionnaire varied by age and body mass index. **Journal of Clinical Epidemiology**, v.59, n.9, p.994-1001, 2006.

PATTERSON, E.; WALL, R.; FITZGERALD, G. F.; ROSS, R. P.; STANTON, C. Health implications of high dietary omega-6 polyunsaturated Fatty acids. **Journal of Nutrition and Metabolism**, v.2012, p.539426, 2012.

PINHEIRO, A. B. V.; LACERDA, E. M. A.; BENZECRY, E. H.; GOMES, M. C. S.; COSTA, V.M. **Tabela para avaliação de consumo alimentar em medidas caseiras**. Rio de Janeiro: Atheneu; 2005.

RAIMONDI, L.; LODOVICI, M.; VISIOLI, F.; SARTIANI, L.; CIONI, L.; ALFARANO, C.; BANCHELLI, G.; PIRISINO, R.; CECCHI, E.; CERBAI, E.; MUGELLI, A. n-3 polyunsaturated fatty acids supplementation decreases asymmetric dimethyl arginine and arachidonate accumulation in aging spontaneously hypertensive rats. **European Journal of Nutrition**, v.44, n.6, p.327-333, 2005.

RAMAKRISHNAN, U.; STEIN, A. D.; PARRA-CABRERA, S.; WANG, M.; IMHOFF-KUNSCH, B.; JUÁREZ-MÁRQUEZ, S.; RIVERA, J.; MARTORELL, R. Effects of docosahexaenoic acid supplementation during pregnancy on gestational age and size at birth: randomized; double-blind; placebo-controlled trial in Mexico. **Food and Nutrition Bulletin**, v.31, 2 Suppl, p.S108-116, 2010.

REARDON, H. T.; HSIEH, A. T.; PARK, W. J.; KOTHAPALLI, K. S.; ANTHONY, J. C.; NATHANIELSZ, P. W.; BRENNAN, J. T. Dietary long-chain polyunsaturated fatty acids upregulate expression of FADS3 transcripts. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids**. v.88, n.1, p.15-9, 2013.

ROGERS, L. K.; VALENTINE, C. J.; KEIM, S. A. DHA supplementation: current implications in pregnancy and childhood. **Pharmacological Research**, v.70, n.1, p.13-19, 2013.

RZEHAK, P.; THIJS, C.; STANDL, M.; MOMMERS, M.; GLASER, C.; JANSEN, E.; KLOPP, N.; KOPPELMAN, G. H.; SINGMANN, P.; POSTMA, D. S.; SAUSENTHALER, S.; DAGNELIE, P. C.; VAN DEN BRANDT, P. A.; KOLETZKO, B.; HEINRICH, J.; KOALA STUDY GROUP; LISA STUDY GROUP. Variants of the

FADS1 FADS2 gene cluster, blood levels of polyunsaturated fatty acids and eczema in children within the first 2 years of life. **PLoS One**, v.5, n.10, p.e13261, 2010.

SACCONE, G.; SACCONE, I.; BERGHELLA, V. Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and fish oil supplementation during pregnancy: which evidence? **Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v.29, n.15, p.2389-2397, 2015.

SALAM, R. A.; DAS, J. K.; BHUTTA, Z. A. Multiple micronutrient supplementation during pregnancy and lactation in low-to-middle-income developing country settings: impact on pregnancy outcomes. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v.65, n.1, p.4-12, 2014.

SCHOLTZ, S. A.; KERLING, E. H.; SHADDY, D. J.; LI, S.; THODOSOFF, J. M.; COLOMBO, J.; CARLSON, S. E. Docosahexaenoic acid (DHA) supplementation in pregnancy differentially modulates arachidonic acid and DHA status across FADS genotypes in pregnancy. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids**, v.94, p.29-33, 2015.

SCHUCHARDT, J. P.; KÖBE, T.; WITTE, V.; WILLERS, J.; GINGRICH, A.; TESKY, V.; PANTEL, J.; RUJESCU, D.; ILLIG, T.; FLÖEL, A.; HAHN, A. Genetic Variants of the FADS Gene Cluster Are Associated with Erythrocyte Membrane LC PUFA Levels in Patients with Mild Cognitive Impairment. **Journal of Nutrition, Health, & Aging**, v.20, n.6, p.611-620, 2016.

SIMOPOULOS, A. P.; LEAF, A.; SALEM, N. J. R. Workshop on the essentiality of and recommended dietary intakes for omega-6 and omega-3 Fatty acids. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v.8, n.4, p.300-301, 1999.

SMUTS, C. M.; HUANG, M.; MUNDY, D.; PLASSE, T.; MAJOR, S.; CARLSON, S. E. A randomized trial of docosahexaenoic acid supplementation during the third trimester of pregnancy. **Obstetrics and Gynecology**, v.101, n.3, p.469-79, 2003.

STANDL, M.; LATTKA, E.; STACH, B.; KOLETZKO, S.; BAUER, C. P.; VON BERG, A.; BERDEL, D.; KRÄMER, U.; SCHAFF, B.; RÖDER, S.; HERBARTH, O.; BUYKEN, A.; DROGIES, T.; THIERY, J.; KOLETZKO, B.; HEINRICH, J.; GINIplus Study Group; LISApplus Study Group. FADS1 FADS2 gene cluster; PUFA intake and blood lipids in children: results from the GINIplus and LISApplus studies. **PLoS One**, v.7, n.5, p.e37780, 2012.

STEER, C. D.; HIBBELN, J. R.; GOLDING, J.; DAVEY SMITH, G. Polyunsaturated fatty acid levels in blood during pregnancy; at birth and at 7 years: their associations with two common FADS2 polymorphisms. **Human Molecular Genetics**, v.21, n.7, p.1504-1512, 2012.

STEER, C. D.; LATTKA, E.; KOLETZKO, B.; GOLDING, J.; HIBBELN, J. R. Maternal fatty acids in pregnancy; FADS polymorphisms; and child intelligence quotient at 8 y of age. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.98, n.6, p.1575-1582, 2013.

STRATAKIS, N.; GIELEN, M.; CHATZI, L.; ZEEGERS, M. P. Effect of maternal n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation during pregnancy and/or lactation on adiposity in childhood: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.68, n.12, 1277-1287, 2014.

SU, H. Y.; LEE, H. C.; CHENG, W. Y.; HUANG, S. Y. A calorie-restriction diet supplemented with fish oil and high-protein powder is associated with reduced severity of metabolic syndrome in obese women. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.69, n.3, p.322-328, 2015.

SULLIVAN, B. L.; BROWN, J.; WILLIAMS, P. G.; MEYER, B. J. Dietary validation of a new Australian food-frequency questionnaire that estimates long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids. **The British Journal of Nutrition**, v.99, n.3, p.660-666, 2008.

SWIERK, M.; WILLIAMS, P. G.; WILCOX, J.; RUSSELL, K. G.; MEYER, B. J. Validation of an Australian electronic food frequency questionnaire to measure polyunsaturated fatty acid intake. **Nutrition**, v.27, n.6, p.641-646, 2011.

TINTLE, N. L.; POTTALA, J. V.; LACEY, S.; RAMACHANDRAN, V.; WESTRA, J.; ROGERS, A.; CLARK, J.; OLTHOFF, B.; LARSON, M.; HARRIS, W.; SHEARER, G. C. A genome-wide association study of saturated, mono- and polyunsaturated red blood cell fatty acids in the Framingham Heart Offspring Study. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids**, v.94, p.65-72, 2015.

TU, W. C.; COOK-JOHNSON, R. J.; JAMES, M. J.; MÜHLHÄUSLER, B. S.; GIBSON, R. A. Omega-3 long chain fatty acid synthesis is regulated more by substrate levels than gene expression. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids**, v.83, n.2, p.61-68, 2010.

UNICEF and WHO - United Nations Children's Fund and World Health Organization. **Low Birthweight: Country; regional and global estimates**. UNICEF; New York; 2004.

USDA. U.S. Department of Agriculture; Agricultural Research Service. 2014. **USDA National Nutrient Database for Standard Reference; Release 27**. Nutrient Data Laboratory Home Page; <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl> [acessado em 08 jul 2014].

VAHID, F.; ZAND, H.; NOSRAT-MIRSHEKARLOU, E.; NAJAFI, R.; HEKMATDOOST, A. The role dietary of bioactive compounds on the regulation of histone acetylases and deacetylases: a review. **Gene**, v.562, n.1, p.8-15, 2015.

VALENTE, M. H.; DA SILVA GOMES, F. M.; BENSEÑOR, I. J.; BRENTANI, A. V.; DE ULHÔA ESCOBAR, A. M.; GRISI, S. J. Relation between birth weight; growth; and subclinical atherosclerosis in adulthood. **BioMed Research International**, v.2015, p.926912, 2015.

VAN EIJSDEN, M.; HORNSTRA, G.; VAN DER WAL, M. F.; BONSEL, G. J. Ethnic differences in early pregnancy maternal n-3 and n-6 fatty acid concentrations: an explorative analysis. **The British Journal of Nutrition**, v.101, n.12, p.1761-1768, 2008.

VAN WIJNGAARDEN, E.; HARRINGTON, D.; KOBROSLY, R.; THURSTON, S. W.; O'HARA, T.; MCSORLEY E. M.; MYERS, G. J.; WATSON, G. E.; SHAMLAYE, C. F.; STRAIN, J. J.; DAVIDSON, P. W. Prenatal exposure to methylmercury and LCPUFA in relation to birth weight. **Annals of Epidemiology**, v.24, n.4, p.273-278, 2014.

VICTORA, C. G.; ADAIR, L.; FALL, C.; HALLAL, P. C.; MARTORELL, R.; RICHTER, L.; SACHDEV, H. S.; and for the Maternal and Child Undernutrition Study Group. Maternal and child undernutrition: consequences for adult health and human capital. **Lancet**, v.371, n.9609, p.340–357, 2008.

WALL, R.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; STANTON, C. Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. **Nutrition Reviews**, v.68, n.5, p.280-289, 2010.

WENNERSTRÖM, E. C.; SIMONSEN, J.; MELBYE, M. Long-Term Survival of Individuals Born Small and Large for Gestational Age. **PLoS One**, v.10, n.9, p.e0138594, 2015.

WILLETT, W. C. **Nutritional Epidemiology**. New York: Oxford University Press, 1998.

WHO - World Health Organization. **Global nutrition targets 2025: low birth weight policy brief** (WHO/NMH/NHD/14.5). Geneva: World Health Organization; 2014a.

WHO – World Health Organization. **Promoting optimal fetal development : report of a technical consultation**. Geneva: World Health Organization; 2006.

WHO. World Health Organization. **Guidelines on optimal feeding of low birth-weight infants in low- and middle-income countries**. Geneva. 2011. p. 1-51.

WILLETT, W. C. Dietary Fats and Coronary Heart Disease. **Journal of Internal Medicine**, v.272, n.1, p.13-24, 2012.

WILLETT, W. C. **Nutritional Epidemiology**, New York: Oxford University Press. 1998.

WOLTERS, M.; SCHLENZ, H.; FORAITA, R.; GALLI, C.; RISÉ, P.; MORENO, L. A.; MOLNÁR, D.; RUSSO, P.; VEIDEBAUM, T.; TORNARITIS, M.; VYNCKE, K.; EIBEN, G.; IACOVIELLO, L.; AHRENS, W.; IDEFICS consortium. Reference values of whole-blood fatty acids by age and sex from European children aged 3-8 years. **International Journal of Obesity (Lond)**, v.38, Suppl 2, p.S86-98, 2014.

XIE, L.; INNIS, S. M. Genetic variants of the FADS1 FADS2 gene cluster are associated with altered (n-6) and (n-3) essential fatty acids in plasma and erythrocyte phospholipids in women during pregnancy and in breast milk during lactation. **The Journal of Nutrition**, v.138, n.11, p.2222-2228, 2008.

YEATES, A. J.; LOVE, T. M.; ENGSTRÖM, K.; MULHERN, M. S.; MCSORLEY, E. M.; GRZESIK, K.; ALHAMDOW, A.; WAHLBERG, K.; THURSTON, S. W.; DAVIDSON, P. W.; VAN WIJNGAARDEN, E.; WATSON, G. E.; SHAMLAYE, C. F.; MYERS, G. J.; STRAIN, J. J.; BROBERG, K. Genetic variation in FADS genes is associated with maternal long-chain PUFA status but not with cognitive development

of infants in a high fish-eating observational study. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids**, v.102-103, p.13-20, 2015.

YOSHIHARA, T.; SHIMADA, K.; FUKAO, K.; SAI, E.; SATO-OKABAYASHI, Y.; MATSUMORI, R.; SHIOZAWA, T.; ALSHAHI, H.; MIYAZAKI, T.; TADA, N.; DAIDA, H. Omega 3 Polyunsaturated Fatty Acids Suppress the Development of Aortic Aneurysms Through the Inhibition of Macrophage-Mediated Inflammation. **Circulation journal: official journal of the Japanese Circulation Society**, v.79, n.7, p.1470-1478, 2015.

YOUNG, M. F.; NGUYEN, P. H.; ADDO, O. Y.; HAO, W.; NGUYEN, H.; PHAM, H.; MARTORELL, R.; RAMAKRISHNAN, U. The relative influence of maternal nutritional status before and during pregnancy on birth outcomes in Vietnam. **European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology**, v.194, p.223-227, 2015.

ZANETTI, M.; GRILLO, A.; LOSURDO, P.; PANIZON, E.; MEARELLI, F.; CATTIN, L.; BARAZZONI, R.; CARRETTA, R. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids: Structural and Functional Effects on the Vascular Wall. **BioMed Research International**, v.2015, p.791978, 2015.

ZANOLLA, A. F.; OLINTO, M. T. A.; HENN, R. L.; WAHRLICH, V.; ANJOS, L. A. Avaliação de reprodutibilidade e validade de um questionário de frequência alimentar em adultos residentes em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.25, n.4, p.840-848, 2009.

ZEGHICHI-HAMRI, S.; DE LORGERIL, M.; SALEN, P.; CHIBANE, M.; DE LEIRIS, J.; BOUCHER, F.; LAPORTE, F. Protective effect of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on myocardial resistance to ischemia-reperfusion injury in rats. **Nutrition Research and Practice**, v.30, n.12, p.849-857, 2010.

ZENG, P.; ZHAO, Y.; QIAN, C.; ZHANG, L.; ZHANG, R.; GOU, J.; LIU, J.; LIU, L.; CHEN, F. Statistical analysis for genome-wide association study. **Journal of Biomedical Research**, v.29, n.4, p.285-297, 2015.

ZHAO, J. P.; LEVY, E.; FRASER, W. D.; JULIEN, P.; DELVIN, E.; MONTOUDIS, A.; SPAHIS, S.; GAROFALO, C.; NUYT, A. M.; LUO, Z. C. Circulating docosahexaenoic acid levels are associated with fetal insulin sensitivity. **PLoS One**, v.9, n.1, p.e85054, 2014

ZIEGLER, A.; KÖNIG, I. R; THOMPSON, J. R. Biostatistical aspects of genome-wide association studies. **Biometrical Journal. Biometrische Zeitschrift**, v.50, n.1, p.8-28, 2008.

6 ARTIGOS DERIVADOS DA TESE

6.1 Manuscrito 1 - VALIDAÇÃO RELATIVA DE UM QUESTIONÁRIO DE FREQUÊNCIA ALIMENTAR PARA AVALIAR A INGESTÃO ALIMENTAR DE ÁCIDOS GRAXOS EM UMA COORTE DE GESTANTES DO NISAMI

RESUMO

Os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (LCPUFA) são nutrientes importantes na gestação, pois participam do crescimento e desenvolvimento intrauterinos. Este estudo objetivou realizar a validação relativa de um Questionário de Frequência Alimentar (QFA) semiquantitativo nutriente-específico, para estimativa do consumo de ácidos graxos em gestantes, em especial os LCPUFAs n-3 e n-6. Foram criadas duas listas de alimentos, definidas segundo contribuição percentual de cada nutriente estimado por três recordatórios de 24h (R24h): QFA – versão reduzida para estimativa de LCPUFA, e QFA – versão expandida para os demais nutrientes. Valores brutos de energia e nutrientes foram comparados utilizando teste t pareado, gráficos de Bland-Altman e a concordância de classificação em quartis. Para coeficiente de correlação de Pearson foram utilizados dados brutos e ajustados pela energia. Participaram 49 gestantes, com idade média de 28 anos ($\pm 5,8$). No QFA – versão expandida, os valores de correlação foram moderados, variando de 0,329 ($p < 0,05$) a 0,617 ($p < 0,01$) para DHA e LA, respectivamente. EPA e DPA não apresentaram correlação. A concordância exata variou de 49,0% (energia) a 22,4% (EPA), e a discordância variou de 14,3% (DPA) a 2,0% (Saturados). O QFA – versão reduzida apresentou melhores valores para LCPUFA. A correlação variou de 0,324 ($p < 0,05$) a 0,404 ($p < 0,01$) para Total LCPUFA n-3 e DHA, respectivamente. A concordância exata variou de 36,7% (Total LCPUFA n-3) a 16,3% (DHA); e a discordância de 12,2% (DPA) a 2,0% (AA). Análise de Bland-Altman mostrou boa concordância para as duas versões do QFA. Em conclusão, este Questionário de Frequência Alimentar – versões reduzida e expandida – é um instrumento válido para uso em estudos epidemiológicos que estimem o nível de consumo de ácidos graxos em gestantes.

Palavras-chave: Estudos de validação. Inquéritos e questionários. Ingestão de alimentos. Gestantes. Ácidos graxos.

INTRODUÇÃO

Os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAS) têm sido amplamente estudados devido os seus benefícios à saúde, particularmente os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (LCPUFA) como o Ácido Araquidônico (AA; 20:4n-6), o Ácido eicosapentaenoico (EPA; 22:6n-3) e o Ácido Docosa-hexaenoico (DHA; 20:5n-3)⁽¹⁻³⁾. Os LCPUFAs influenciam a fluidez da membrana plasmática⁽⁴⁾, agem na formação e desenvolvimento da retina e do sistema nervoso⁽⁵⁾ e são precursores de substâncias importantes na regulação de processos inflamatórios do organismo, como os tromboxanos, os leucotrienos e as prostaglandinas⁽³⁾.

O conteúdo de LCPUFA na corrente sanguínea e nos tecidos é proveniente principalmente da alimentação, por meio do consumo de lipídeos de origem animal, como aves, peixes, carnes, ovos e leite humano. EPA e DHA estão presentes em algas e alimentos de origem animal, principalmente peixes; AA pode ser encontrado em carnes, aves e ovos⁽⁶⁾. Também é possível a síntese endógena de LCPUFA a partir dos seus precursores, os ácidos graxos essenciais α -linolênico (ALA; 18:3n-3) e linoleico (LA; 18:2n-6), mediados pelas enzimas Δ 5-dessaturase e Δ 6-dessaturase^(7,8). Suas principais fontes alimentares são os óleos extraídos de sementes e oleaginosas, sendo fontes de ALA: óleos de semente de linho, de canola e de soja e fontes de LA: óleo de girassol, de cártamo, de milho, de soja, de amendoim e de palma⁽⁶⁾.

Na gestação, o adequado consumo de LCPUFA da série ômega 3 (LCPUFA n-3) garante o suprimento das necessidades fetais e evita as deficiências, as quais se configuram especialmente prejudiciais ao feto⁽⁹⁾. Na fase intrauterina, a formação e o crescimento/desenvolvimento de tecidos são mais intensos e ocorre a deposição de grande quantidade de LCPUFA n-3 na retina e no tecido cerebral do feto, principalmente no terceiro trimestre gestacional^(5,9). Outros benefícios dos LCPUFAs n-3 na gestação são a menor incidência de alergias e doenças asmáticas em crianças durante a infância^(10,11) e o adequado crescimento fetal, embora alguns autores afirmam que as evidências são limitadas e os resultados dos estudos são inconclusivos^(12,13).

Os estudos que associam o consumo alimentar de LCPUFAs aos benefícios à saúde são desejáveis e necessários, desde que bem controlados e associados ao uso de instrumentos que permitam a estimativa acurada do consumo de ácidos

graxos. Um dos instrumentos dietéticos mais utilizados em estudos sobre consumo alimentar é o Questionário de Frequência Alimentar (QFA), o qual precisa ser testado em relação à sua validade em estimar o nutriente de interesse^(14,15).

Considerando a evidente relevância da estimativa do consumo de LCPUFA em gestantes por meio de instrumentos dietéticos confiáveis e validados, os objetivos do presente estudo foram: 1) construir um QFA nutriente-específico direcionado a gestantes, para estimativa do consumo de lipídeos totais e ácidos graxos, com ênfase nos principais LCPUFAs das séries n-3 e n-6; 2) avaliar a validade relativa do QFA nutriente-específico em comparação com o consumo médio estimado por três Recordatórios Alimentares de 24h (R24h); 3) avaliar a capacidade do QFA em classificar as gestantes em quartis semelhantes, de acordo com o consumo dos nutrientes avaliados.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenvolvimento do estudo e Amostra

Este estudo fez parte de um projeto intitulado “*Fatores de riscos nutricionais e genéticos durante a gestação associados a baixo peso ao nascer/prematuridade*”, desenvolvido entre agosto de 2013 a novembro de 2014, por pesquisadores da coorte de gestantes NISAMI (Núcleo de Investigação em Saúde Materno Infantil) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), em Santo Antônio de Jesus, Bahia, Brasil. Para o estudo de validação, foram coletados dados das gestantes acompanhadas entre agosto de 2013 e julho de 2014. Todas as gestantes foram informadas sobre os objetivos do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O estudo seguiu as normas da Declaração de Helsinki, e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFRB.

Foram incluídas as gestantes clinicamente saudáveis, residentes e domiciliadas na zona urbana de Santo Antônio de Jesus – Bahia, Brasil, com 18 anos ou mais de idade, com idade gestacional menor ou igual a 32 semanas no momento da primeira entrevista, inscritas no serviço público de saúde pré-natal da cidade. As excluídas eram mulheres com gestação múltipla, HIV positivas, com doenças contagiosas, imunológicas e metabólicas, além daquelas veganas (não consumiam nenhum alimento de origem animal).

Na primeira avaliação, as gestantes responderam ao QFA e ao R24h₁ e tiveram aferidos o peso e a estatura, em triplicata, segundo técnicas preconizadas por Jelliffe⁽¹⁶⁾. A idade gestacional foi calculada baseada na data da última menstruação, ou obtida pelo exame ultrassonográfico, quando presente. O R24h₂ e o R24h₃ foram aplicados no domicílio da gestante, com intervalos de 15 a 40 dias entre os questionários.

Recordatório de 24h

Para o preenchimento do R24h, as gestantes deveriam recordar e relatar ao entrevistador todos os alimentos e bebidas consumidos no dia anterior, desde o momento em que acordavam até o período em que iam dormir. Para a avaliação da quantidade de alimento consumido, utilizou-se álbum contendo fotografias de diversos utensílios com medidas caseiras (ex: colher de sopa cheia; colher de sopa rasa, etc) ou porções de alimentos (P, M ou G)⁽¹⁷⁾. Quando no domicílio da gestante, o entrevistador solicitava permissão para visualizar o utensílio utilizado nas preparações ou durante consumo.

Para fins de estimativa do consumo de nutrientes, a determinação da quantidade de alimento consumido foi realizada pela conversão das medidas caseiras para gramas ou mililitros^(18,19). A análise dos dados foi feita considerando-se a média de ingestão de energia e nutrientes dos três R24h (R24h₁, R24h₂ e R24h₃).

Desenvolvimento e análise do Questionário de Frequência Alimentar

Foi construído um QFA semiquantitativo nutriente-específico para a estimativa do consumo de lipídeos, com enfoque especial para os LCPUFAs. Inicialmente, foi selecionada uma lista com as principais fontes alimentares de LCPUFA n-3, conforme metodologia utilizada por Sullivan et al.⁽²⁰⁾ e Lora et al.⁽²¹⁾. Também foram considerados alimentos com conteúdo de PUFA $\geq 0,1\text{g}/100\text{g}$ de alimento⁽²²⁾ e os fontes de lipídeos, e que sabidamente eram consumidos por essa população.

A lista era composta principalmente por produtos de origem animal, como carnes (porco ou boi), aves, ovos, vísceras, embutidos, peixes e frutos do mar, além de alimentos regionais, suplementos nutricionais que continham n-3 e óleo de peixe. Alimentos de origem vegetal incluídos foram os óleos vegetais, oleaginosas e sementes, principalmente. Em relação aos cereais, frutas e demais vegetais, foram considerados apenas aqueles com reconhecida contribuição de PUFAS, como os

integrais, algumas frutas, leguminosas, oleaginosas e alguns folhosos (crus, cozidos ou refogados). Foram incluídos opções de preparo ou tipo de alimento, o que possibilitava à gestante indicar entre itens fritos, assados, cozidos ou crus; com pele ou sem pele; com osso ou sem osso; integral, semidesnatado ou desnatado.

Assim, foram selecionados 114 alimentos, disponíveis em 213 itens para seleção e reunidos em 11 grupos de alimentos (Leite e derivados; Carnes e Ovos; Óleos e Gorduras; Petiscos e Enlatados; Cereais, Tubérculos e Raízes; Leguminosas e Oleaginosas; Vegetais; Temperos e Condimentos; Açúcares e Doces; Bebidas; Comidas Regionais). A frequência de consumo era composta por 13 possíveis respostas, que variava de raramente/nunca a ≥ 3 vezes por dia. Para definição da quantidade ingerida, cada alimento era apresentado por meio de porções, em medidas caseiras, usualmente utilizadas por essa população, baseado em R24h aplicados em outros momentos pelos pesquisadores (ex: copo duplo cheio, colher de sopa cheia, etc). Para determinação dos pesos das porções, foi realizada conversão das medidas caseiras para gramas ou mililitros^(18,19). Coube à gestante relatar a frequência de consumo do alimento, a partir do início da gestação, e o número de porções consumidas por vez.

A lista final de alimentos do QFA foi desenvolvida a partir da análise da ingestão dos três R24h. Utilizando a fórmula citada por Block et al.⁽²³⁾, os alimentos foram agrupados em listas de acordo com a contribuição percentual, em ordem decrescente, dos nutrientes de interesse. Os alimentos que contribuíam com pelo menos 90% da ingestão de cada nutriente foram incluídos no questionário⁽²³⁾.

$$\% \text{ nutriente } x \text{ no alimento } y = \frac{\text{conteúdo do nutriente } x \text{ no alimento } y}{\text{somatória do conteúdo do nutriente } x \text{ em todos os alimentos}} \times 100$$

Vinte e sete alimentos que contribuíam com quase 100% dos LCPUFAs n-3 e com aproximadamente 84% de AA compuseram o QFA – versão reduzida. Como esses 27 alimentos não apresentavam contribuição suficiente para os demais nutrientes, foi criado um QFA – versão expandida, composto pelos 27 alimentos do QFA – versão reduzida, adicionado a 60 alimentos ranqueados segundo teor de ácidos graxos poli-insaturados. “Banana da terra cozida” e “leite desnatado” foram também adicionados, uma vez que faziam parte do consumo habitual da população

regional, e contribuíam para o consumo total de lipídeos, resultando na lista de 89 itens para o QFA – versão expandida (**Tabela 1**). Quando se considera a contribuição energética dos alimentos, observa-se que mesmo alimentos com baixo teor do nutriente são incluídos devido à elevada frequência de sua ingestão⁽²⁴⁾.

Para a análise dos dados, cada alimento contido na versão final do QFA foi convertido em consumo diário, considerando a frequência de consumo e o número de porções relatados pelas gestantes. Esta etapa consistiu, inicialmente, na transformação de cada frequência de consumo relatada em frequência diária. Por exemplo, foi considerada a constante 1 quando o alimento foi consumido 1 vez ao dia; constante 2 quando o consumo foi de 2 vezes ao dia, e assim por diante. A frequência semanal foi dividida por 7 e a mensal por 30, encontrando, assim, a constante de consumo diário de cada alimento. Para o consumo raramente/nunca foi considerada a constante 0. A seguir, cada constante, que significava a frequência diária de consumo de cada alimento, era multiplicada pela quantidade do alimento consumido por vez. O produto final correspondia à quantidade diária, em gramas ou mililitros, do alimento consumido pela gestante.

Análise da ingestão de nutrientes

Os questionários foram tabulados e analisados no software Excel 2010. Para estimativa do consumo de energia e nutrientes nos três R24h e no QFA foi utilizada a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO)⁽²⁵⁾. Para as preparações, os nutrientes foram estimados de acordo com seus ingredientes⁽¹⁵⁾. Quando um alimento ou nutriente não era encontrado na TACO, foi utilizada a Tabela de Composição de Alimentos (National Nutrient Database for Standard Reference) do Departamento de Agricultura do Estados Unidos – USDA⁽²⁶⁾.

Os questionários de consumo forneceram informações sobre energia, lipídeos totais, e dos ácidos graxos: saturados, monoinsaturados, poli-insaturados, 18:2n-6 (LA; ácido linoleico), 20:4n-6 (AA; ácido araquidônico), 18:3n-3 (ALA; ácido α -linolênico), 20 : 5n-3 (EPA), 22 : 6n-3 (DHA), 22 : 5n-3 (DPA). Seguindo a metodologia utilizada por outros autores^(27,28), também foram estimadas ingestão total de LCPUFA n-3 (Total LCPUFA n-3: EPA + DHA + DPA), ingestão total de PUFA n-3 (Total n-3 PUFA: ALA + EPA + DHA + DPA), ingestão total de PUFA n-6 (Total n-6 PUFA: LA + AA).

O consumo energético foi estimado para identificar e excluir as gestantes com consumo extremo e improvável no três R24h – menor que 700kcal ou maior que 5000kcal⁽²⁹⁾. Esse critério não foi utilizado para o QFA, uma vez que tratava-se de um instrumento nutriente específico, cujos alimentos altamente energéticos e pobres em lipídeos foram excluídos, como cereais polidos e diversas frutas.

Análise estatística

Os questionários foram tabulados no software Excel 2010 e os dados analisados no software IBM SPSS Statistics 20.

Para o R24h, foram utilizados os valores médios de ingestão alimentar nos três dias de consumo. Valores brutos de energia e nutrientes foram utilizados para a análise dos dados, exceto para análise de correlação, quando foram utilizados os dados brutos e os ajustados pela energia utilizando o método dos resíduos⁽³⁰⁾, tendo a ingestão energética como variável independente e a ingestão dos nutrientes como variável dependente.

O teste Shapiro-Wilk foi utilizado para avaliar a normalidade das variáveis de ingestão alimentar. Para aquelas que não apresentaram distribuição normal, foi realizada a transformação logarítmica.

O teste t pareado foi utilizado para verificar as diferenças nas médias de consumo entre os dois instrumentos. O coeficiente de correlação de Pearson foi estimado para energia e os nutrientes do QFA e dos R24h. Para validação de inquéritos dietéticos, são considerados os valores de correlação: pobre/ruim (<0,30), aceitável (0,30 – 0,50), boa (0,51 – 0,70) e muito boa (>0,70)⁽³¹⁾. Valores de correlação são considerados moderados entre 0,4 – 0,7⁽³⁰⁾.

A concordância entre os valores de consumo dos dois métodos foi avaliada por meio do modelo de Bland-Altman (1986)⁽³²⁾, o qual se baseia em um gráfico de dispersão para análise da relação das discordâncias com as medidas avaliadas. No eixo x são plotadas as médias dos valores dos dois métodos $(x + y) / 2$, e no eixo y a diferença (ou viés) entre os mesmos $(x - y)$. A diferença média entre essas duas mensurações e os limites de concordância (LoA) são calculados (diferença média \pm 1,96 DP) e plotados no gráfico. Considera-se boa concordância entre os métodos quando mais de 95% das diferenças das medidas se encontram dentro dos limites de concordância⁽³³⁾. Em relação à média, quanto mais próximo de zero, menor a chance de existirem vieses (bias).

A análise de concordância de quartis de consumo entre os métodos foi utilizada para avaliar a capacidade em classificar o nível de consumo de cada gestante. De acordo com o nível de consumo de nutrientes dos dois métodos, foi apresentada a proporção de concordância exata (gestantes classificadas no mesmo quarto) e a proporção de discordância (classificadas nos quartos extremos opostos)^(34,35).

RESULTADOS

Cinquenta e uma gestantes responderam ao QFA e aos três R24h nas datas pré-agendadas, e assim estavam aptas a participarem do estudo de validação. Após estimativa do consumo diário de energia obtido pela média de ingestão dos três R24h, uma gestante foi excluída por apresentar consumo médio de energia inferior a 700 kcal e outra por apresentar consumo superior a 5000 kcal. No total, foram incluídas nas análises 49 gestantes, com média de idade de 28 anos ($\pm 5,8$); peso médio de 69,36 Kg ($\pm 12,37$); estatura média de 1,60 metros ($\pm 0,07$); IMC médio de 27,04 kg/m² ($\pm 4,74$), e idade gestacional média de 27,57 semanas ($\pm 5,82$). A maioria das gestantes (n = 42; 85,7%) eram negras ou pardas e possuíam ensino médio completo (n = 30; 61,2%), ou seja, aproximadamente 11 anos de estudo.

A média de ingestão dos nutrientes foi superior no QFA - versão expandida, em relação à média de ingestão dos três R24h ($p < 0,05$), exceto para EPA, DPA e energia que não apresentaram diferenças nos valores médios. O QFA - versão reduzida, utilizado apenas na validação dos LCPUFAs, não mostrou diferenças na ingestão média dos nutrientes entre os dois instrumentos (**Tabela 2**).

Os coeficientes de correlação brutos e ajustados estão apresentados na Tabela 2. Para os valores de ingestão brutos do QFA - versão expandida, foram encontradas correlações aceitáveis, ou moderadas, para quase todos os nutrientes, variando de 0,329 para DHA ($p < 0,05$) e 0,617 para LA ($p < 0,01$). Total LCPUFA n-3, AA e Colesterol apresentaram correlação fraca, embora não significativa, enquanto EPA e DPA não apresentaram correlação. Quando realizado o ajuste segundo consumo energético, houve tendência de redução da força de correlação, afetando principalmente os PUFAS n-3, os quais perderam a significância estatística da correlação para ALA, DHA e Total n-3 PUFA.

O QFA – versão reduzida apresentou melhores valores para os LCPUFA, apresentando correlação aceitável, ou moderada, para DHA ($p < 0,01$), Total LCPUFA n-3 e AA ($p < 0,05$), e correlação fraca para EPA e DPA, embora não significativa. O ajuste desses nutrientes segundo consumo de energia também foi responsável pela redução da força da correlação quando comparado com os dados brutos, perdendo a significância estatística para DHA e Total LCPUFA n-3 (**Tabela 2**).

Na análise de Bland-Altman, foi possível observar boa concordância entre o QFA – versão expandida e versão reduzida – e a média dos três R24h, com mais de 95% das diferenças das medidas dentro do LoA (limite de concordância) (**Figura 1**). Apenas LA, AA e Total n-6 PUFA, no QFA – versão expandida, apresentaram menor concordância, com 71% ($n = 35$) das diferenças das medidas dentro do LoA (**Tabela 3**).

Na tabela 3 está apresentada a concordância exata (classificação no mesmo quarto pelos dois métodos) e a discordância (classificação no quarto extremo oposto) entre o QFA e a média dos três R24h. Quando utilizado o QFA - versão expandida, a concordância exata variou de 49,0% para energia a 22,4% para EPA; a discordância variou de 14,3% para DPA a 2,0% para Saturados.

O QFA – versão reduzida pouco alterou os resultados para os LCPUFAs quanto a concordância em quartos, sendo a maioria das alterações positivas. Houve redução na discordância de EPA e DPA, sem afetar a proporção da concordância exata, sendo evidenciado o contrário para DHA. Para Total LCPUFA n-3 e AA, observou-se aumento da concordância exata e redução da discordância, sendo a alteração mais expressiva para Total LCPUFA n-3. A concordância exata variou de 36,7% para Total LCPUFA n-3 a 16,3% para DHA; a discordância variou de 12,2% para DPA a 2,0% para AA (**Tabela 3**).

DISCUSSÃO

No presente estudo, o Questionário de Frequência Alimentar semiquantitativo nutriente-específico desenvolvido para estimativa do consumo de lipídeos totais e ácidos graxos apresentou boa validade relativa, quando comparado com o consumo médio estimado pelos 3 R24h. Composto por duas listas de alimentos, sua versão reduzida, com 27 alimentos, permite agilidade na estimativa do consumo alimentar

de LCPUFA. Sua versão expandida é mais longa e de aplicação demorada, porém permite estimar o consumo de outros ácidos graxos (ácidos graxos saturados, monoinsaturados, poli-insaturados, LA, ALA, AA, DHA, Total n-6 PUFA, Total n-3 PUFA, Total LCPUFA n-3, colesterol e lipídeos totais).

O consumo médio de nutrientes avaliado pelo QFA – versão expandida estava superestimado quando comparado com o R24h, exceto para EPA e DPA. Por outro lado, não houve diferença significativa no consumo de LCPUFA entre o QFA – versão reduzida e a média dos três R24h. Outros estudos têm encontrado resultados de ingestão alimentar superestimados em QFA^(15,34,36,37), ou, menos frequente, resultados similares quanto ao consumo médio de nutrientes entre o QFA e outros instrumentos dietéticos^(20, 22,38).

A diferença no valor médio de consumo entre os instrumentos é atribuída, em parte, às características inerentes ao método de captação dos dados, já que o R24h fornece informações sobre o consumo alimentar recente, enquanto o QFA estima o hábito alimentar de longos períodos⁽³⁶⁾. O presente QFA foi desenvolvido para estimar o consumo alimentar a partir do início gestação, o que significa menor intervalo de tempo para estimativa da ingestão de nutrientes. Gunes et al.⁽³⁶⁾ sugeriram que a diminuição do período de abrangência do QFA pode reduzir a diferença entre os valores dos dois instrumentos. Outros fatores, como a disponibilidade de alguns alimentos sazonais presentes no QFA e o relato excessivo de itens alimentares considerados saudáveis ou de itens alimentares específicos altamente calóricos, como pães e cereais, também são citados como possível explicação para a tendência do QFA de superestimar o consumo alimentar⁽¹⁵⁾.

Por outro lado, os resultados do consumo de nutrientes são subestimados pelos registros alimentares devido 1) ao sub-relato na pesagem direta de alimentos ou 2) a menor ingestão de alimentos durante o período avaliado, já que muitos indivíduos tendem a simplificar o processo de pesagem ou relatar menor ingestão para impressionar os pesquisadores; sub-relato também possível de ocorrer nos R24h. Assim, considerando os erros de superestimativa do QFA e de sub-relato nos instrumentos dietéticos padrão, é possível que a ingestão real esteja entre os valores estimados por esses dois instrumentos. Pesquisadores sugerem, então, que seja possível que a diferença entre a ingestão real e a estimada pelo QFA seja menor que a diferença encontrada entre o QFA e o R24h⁽²²⁾.

A moderada correlação encontrada entre o QFA e os R24h também foi relatada em outros estudos^(15,20,36). Para os LCPUFA, os valores de correlação foram maiores no QFA – versão reduzida, o qual possuía apenas 27 alimentos fontes de LCPUFA. Segundo alguns pesquisadores, o QFA nutriente-específico tende a ser menor, de mais rápida aplicação, e apresenta melhores resultados para a estimativa de nutrientes, quando comparado com um QFA desenvolvido para avaliar a ingestão dietética total^(20,24). Sugere-se, no entanto, que, conforme observado no presente estudo, o ajuste energético pode influenciar a análise dos dados. Isso porque os alimentos presentes no QFA nutriente-específico possuem alta densidade do nutriente avaliado, sendo excluídos alimentos de alta densidade calórica pobres nesses nutrientes. Por outro lado, é possível que o R24h possua alimentos que foram excluídos do QFA, caracterizados por alta densidade calórica e baixa densidade do nutriente avaliado, o que pode tornar a correlação mais fraca quando os instrumentos dietéticos são comparados após o ajuste energético.

Utilizando os gráficos de Bland-Altman, foi possível observar considerável dispersão dos dados, porém, com excelente concordância entre os métodos avaliados, com LA, AA e Total n-6 PUFA apresentando menor concordância no QFA – versão expandida. Outros estudos mostraram boa concordância entre o QFA e os registros alimentares ou o R24h^(20,36,38). Segundo Ingram et al.⁽²²⁾, é comum que os LCPUFAs apresentem alta variabilidade de consumo, uma vez que alimentos com alta densidade desses nutrientes geralmente não são consumidos diariamente. Assim, o indivíduo que relata no QFA a frequência moderada do consumo desses alimentos, como peixes e frutos do mar, pode apresentar consumo subestimado ou superestimado dependendo da presença ou ausência desses alimentos no R24h avaliado⁽²²⁾.

O presente estudo mostrou que o QFA nutriente específico apresentou boa concordância exata (indivíduos classificados no mesmo quartil) e baixa discordância (indivíduos classificados no quartil extremo oposto). Apenas DHA no QFA – versão reduzida e EPA e Total LCPUFA n-3 no QFA – versão expandida apresentaram discordância levemente superior a 10%, mas ainda assim aceitáveis. Os estudos sobre concordância do nível de ingestão de nutrientes utilizam quintis^(15,22,37), quartis^(38,39) ou tercis⁽⁴⁰⁾, e apresentam resultados variados, mas, em geral, também apresentam boa concordância exata e baixa discordância. A concordância avaliada por quartis permite agrupar, na população, os indivíduos que consomem menor

quantidade do nutriente avaliado, em comparação com aqueles que possuem maior consumo. Esse tipo de agrupamento é importante principalmente em estudos epidemiológicos, os quais relacionam categorias de consumo de nutrientes à presença de doenças ou enfermidades^(15,41).

O presente estudo apresentou algumas limitações, que se configuraram como importantes pontos para discussão. O R24h, utilizado no presente estudo como padrão para as análises, é um instrumento de fácil aplicação na população, barato, com alta taxa de resposta, não interfere no consumo alimentar dos indivíduos^(15,42) e possui boa correlação com os biomarcadores⁽⁴³⁾. Entretanto, depende da memória e da habilidade em relatar as medidas e porções consumidas⁽¹⁵⁾. Dentre os questionários alimentares, os registros alimentares, principalmente os que utilizam a pesagem direta, são instrumentos com melhor capacidade de estimar corretamente o consumo alimentar⁽⁴²⁾, mas não são recomendados para populações com baixa ou moderada escolaridade⁽¹⁵⁾, como se caracteriza a presente amostra, sendo adequada a utilização dos R24h nesse caso.

Para estudos de validação de instrumentos dietéticos, os biomarcadores são considerados “gold standard”, pois apresentam maior validade como marcadores do consumo alimentar em curto e longo prazos, sendo bastante utilizados os componentes sanguíneos e o tecido adiposo subcutâneo para estudos sobre consumo alimentar de PUFA^(42,44,45). No entanto, Parker et al.⁽⁴⁴⁾ sugeriram que alguns biomarcadores para estimativa de PUFA são menos confiáveis para uso em gestantes, pois a concentração plasmática de PUFA na gestação não é resultado apenas da ingestão alimentar, mas também é influenciada pelo aumento do volume plasmático materno. Mais estudos são necessários a fim de se determinar o melhor biomarcador para avaliação da ingestão de PUFA na gestação, sendo assim possível a validação relativa do QFA na ausência de um biomarcador como padrão.

A validação relativa é assim denominada quando utiliza-se um instrumento dietético com boa validade, como os Registros Alimentares e os Recordatórios Alimentares de 24h (R24h), em comparação com outro instrumento dietético teste a ser validado. Nesse caso, quanto maior o número de dias avaliados pelo instrumento dietético padrão, menor o erro inerente à variabilidade de consumo intraindividual^(30,42).

Uma limitação do estudo foi que o segundo QFA que seria aplicado junto ao R24h₃ não foi realizado em número desejável de gestantes no período selecionado,

devido principalmente à baixa adesão da população do estudo. Mesmo sendo de conhecimento que o QFA estima o consumo retrospectivo, ainda assim os pesquisadores optaram por utilizar a média de ingestão estimada pelos três R24h, já que o maior número de dias avaliados melhora a precisão do instrumento⁽³⁰⁾. Além disso, o espaço de tempo entre a aplicação do QFA e do R24h₂ e do R24h₃ foi pequeno, sendo possível que os três R24h tenham retratado de maneira adequada o hábito alimentar das mulheres no período da gestação, sem tempo hábil para grandes modificações nesse hábito.

Outros importantes fatores limitantes dizem respeito à construção do QFA. Ao optar por construir um QFA nutriente-específico, foi assumido o caráter singular do instrumento, o qual avalia adequadamente o nutriente de interesse, mas com possível inabilidade em estimar o consumo de energia e de outros nutrientes da alimentação das gestantes. Considerou-se também que a seleção prévia dos alimentos e a definição final da lista de alimentos após a aplicação de todos os inquéritos alimentares (QFA e três R24h) poderia culminar na ausência de alguns alimentos habitualmente consumidos pela população, presentes nos R24h. Felizmente, poucos alimentos não estavam contemplados no QFA inicialmente aplicado; e quando isso ocorria, a contribuição percentual de ácidos graxos do alimento era demasiadamente baixa, já que houve o cuidado de selecionar os alimentos fontes de LCPUFA, e secundariamente os fontes de PUFA e de lipídeos totais.

De modo geral, apesar de superestimar o consumo alimentar, o QFA apresentou moderada correlação e boa concordância quando comparado com o R24h. Destacou-se a relevância da elaboração do QFA com duas versões, que podem ser aplicadas simultaneamente, pois permite a análise diferenciada dos dados segundo nutriente de interesse e dos objetivos da avaliação do consumo alimentar. Em conclusão, este Questionário de Frequência Alimentar semiquantitativo nutriente-específico é um instrumento aceitável e confiável, sendo possível o seu uso em estudos epidemiológicos que avaliem o nível de consumo de ácidos graxos em gestantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Su HY, Lee HC, Cheng WY, et al. (2015) A calorie-restriction diet supplemented with fish oil and high-protein powder is associated with reduced severity of metabolic syndrome in obese women. *Eur J Clin Nutr* 69, 322 – 328.
2. Yoshihara T, Shimada K, Fukao K, et al. (2015) Omega 3 Polyunsaturated Fatty Acids Suppress the Development of Aortic Aneurysms Through the Inhibition of Macrophage-Mediated Inflammation. *Circ J* 79, 1470 – 1478.
3. Weldon SM, Mullen AC, Loscher CE, et al. (2007) Docosahexaenoic acid induces an anti-inflammatory profile in lipopolysaccharide-stimulated human THP-1 macrophages more effectively than eicosapentaenoic acid. *J Nutr Biochem* 18, 250 – 258.
4. Jaureguiberry MS, Triccerri MA, Sanchez SA, et al. (2014) Role of plasma membrane lipid composition on cellular homeostasis: learning from cell line models expressing fatty acid desaturases. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 46, 273 – 282.
5. Qawasmi A, Landeros-Weisenberger A, Bloch MH. (2013) Meta-analysis of LCPUFA supplementation of infant formula and visual acuity. *Pediatrics* 131, e262 – e272.
6. Huffman SL, Harika RK, Eilander A, et al. (2011) Essential fats: how do they affect growth and development of infants and young children in developing countries? A literature review. *Matern Child Nutr* 7, Suppl. 3, 44-65.
7. Glaser C, Lattka E, Rzehak P, et al. (2011) Genetic variation in polyunsaturated fatty acid metabolism and its potential relevance for human development and health. *Matern Child Nutr* 7, 27 – 40.
8. Koletzko B, Lattka E, Zeilinger S, et al. (2011) Genetic variants of the fatty acid desaturase gene cluster predict amounts of red blood cell docosahexaenoic and

other polyunsaturated fatty acids in pregnant women: findings from the Avon Longitudinal Study of Parents and Children. *Am J Clin Nutr* 93, 211 – 219.

9. Koletzko B, Cetin I, Brenna JT, et al. (2007) Dietary fat intakes for pregnant and lactating women. *Br J Nutr* 98, 873 – 877.

10. Noakes PS, Vlachava M, Kremmyda LS, et al. (2012) Increased intake of oily fish in pregnancy: effects on neonatal immune responses and on clinical outcomes in infants at 6 mo. *Am J Clin Nutr* 95, 395 – 404.

11. Olsen SF, Østerdal ML, Salvig JD, et al. (2008) Fish oil intake compared with olive oil intake in late pregnancy and asthma in the offspring: 16 y of registry-based follow-up from a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 88, 167 – 175.

12. Dunstan JA, Simmer K, Dixon G, et al. (2008) Cognitive assessment of children at age 2(1/2) years after maternal fish oil supplementation in pregnancy: a randomized controlled trial. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 93, F45 – F50.

13. van Eijsden M, Hornstra G, van der Wal MF, et al. (2008) Maternal n-3, n-6, and trans fatty acid profile early in pregnancy and term birth weight: a prospective cohort study. *Am J Clin Nutr* 87, 887 – 895.

14. Serra-Majem L, Nissensohn M, Øverby NC, et al. (2012) Dietary methods and biomarkers of omega 3 fatty acids: a systematic review. *Br J Nutr* 107, Suppl. 2, S64 – S76.

15. Mirmiran P, Esfahani FH, Mehrabi Y, et al. (2010) Reliability and relative validity of an FFQ for nutrients in the Tehran lipid and glucose study. *Public Health Nutr* 13, 654 – 662.

16. Jelliffe DB (1968) Evaluación del estado de nutrición de la comunidad. Ginebra: Organización Mundial de La Salud.

17. Monteiro JP, Pfrimer K, Tremeschin MH, et al. (2007) Consumo Alimentar – Visualizando porções (Série Nutrição e Metabolismo). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
18. IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2011) Pesquisa de Orçamentos Familiares - POF 2008 – 2010: Tabela de medidas referidas para os alimentos consumidos no Brasil. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.
19. Pinheiro ABV, Lacerda EMA, Benzecry EH, et al. (2005) Tabela para avaliação de consumo alimentar em medidas caseiras. Rio de Janeiro: Atheneu.
20. Sullivan BL, Brown J, Williams PG, et al. (2008) Dietary validation of a new Australian food-frequency questionnaire that estimates long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids. *Br J Nutr* 99, 660 – 666.
21. Lora KR, Lewis NM, Eskridge KM, et al. (2010) Validity and reliability of an omega-3 fatty acid food frequency questionnaire for first-generation Midwestern Latinas. *Nutr Res* 30, 550 – 557.
22. Ingram MA, Stonehouse W, Russell KG, et al. (2012) The New Zealand PUFA semiquantitative food frequency questionnaire is a valid and reliable tool to assess PUFA intakes in healthy New Zealand adults. *J Nutr* 142, 1968 – 1974.
23. Block G, Dresser CM, Hartman AM, et al. (1985) Nutrient sources in the American diet: quantitative data from the NHANES II survey. II. Macronutrients and fats. *Am J Epidemiol* 122, 27 – 40.
24. Meyer B (2013) Re: Food-frequency questionnaire for assessing long-chain ω -3 fatty-acid intake. *Nutrition* 29, 808 – 809.
25. NEPA – UNICAMP (2011) Tabela brasileira de composição de alimentos / NEPA – UNICAMP - 4. ed. rev. e ampl. Campinas: NEPAUNICAMP.

26. USDA. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service (2014). USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 27. Nutrient Data Laboratory Home Page, <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl> [accessed on 08 jul 2014].
27. Swierk M, Williams PG, Wilcox J, et al. (2011) Validation of an Australian electronic food frequency questionnaire to measure polyunsaturated fatty acid intake. *Nutrition* 27, 641 – 646.
28. Orton HD, Szabo NJ, Clare-Salzler M, et al. (2008) Comparison between omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acid intakes as assessed by a food frequency questionnaire and erythrocyte membrane fatty acid composition in young children. *Eur J Clin Nutr* 62, 733 – 738.
29. Paalanen L, Männistö S, Virtanen MJ, et al. (2006) Validity of a food frequency questionnaire varied by age and body mass index. *J Clin Epidemiol* 59, 994 – 1001.
30. Willett WC (1998) *Nutritional Epidemiology*. New York: Oxford University Press.
31. Øverby NC, Serra-Majem L, Andersen LF (2009) Dietary assessment methods on n-3 fatty acid intake: a systematic review. *Br J Nutr* 102, Suppl. 1, S56 – S63.
32. Bland JM & Altman DG (1986) Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1, 307 – 310.
33. Bland JM & Altman DG (2010) Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Int J Nurs Stud* 47, 931 – 936.
34. Zanolla AF, Olinto MTA, Henn RL, et al. (2009) Avaliação de reprodutibilidade e validade de um questionário de frequência alimentar em adultos residentes em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. *Cad. Saúde Pública* 25, 840 – 848.
35. Giacomello A, Schmidt MI, Nunes MAA, et al. (2008) Validação relativa de Questionário de Frequência Alimentar em gestantes usuárias de serviços do

Sistema Único de Saúde em dois municípios no Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev Bras Saúde Mater Infant* 8, 445 – 454.

36. Gunes FE, Imeryuz N, Akalin A, et al. (2015) Development and validation of a semi-quantitative food frequency questionnaire to assess dietary intake in Turkish adults. *J Pak Med Assoc* 65, 756 – 763.

37. Deschamps V, de Lauzon-Guillain B, Lafay L, et al. (2009) Reproducibility and relative validity of a food-frequency questionnaire among French adults and adolescents. *Eur J Clin Nutr* 63, 282 – 291.

38. Patterson AC, Hogg RC, Kishi DM, et al. (2012) Biomarker and dietary validation of a Canadian food frequency questionnaire to measure eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid intakes from whole food, functional food, and nutraceutical sources. *J Acad Nutr Diet* 112, 1005 – 1014.

39. Bonatto S, Henn RL, Olinto MTA, et al. (2014) Reprodutibilidade, validade relativa e calibração de um questionário de frequência alimentar para adultos da Região Metropolitana de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. *Cad Saúde Pública* 30, 1837 – 1848.

40. Molina MCB, Benseñor IM, Cardoso LO, et al. (2013) Reprodutibilidade e validade relativa do Questionário de Frequência Alimentar do ELSA-Brasil. *Cad Saúde Pública* 29, 379 – 389.

41. Chan SS, Luben R, Olsen A, et al. (2014) Association between high dietary intake of the n-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid and reduced risk of Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 39, 834 – 842.

42. Serra-Majem L, Nissensohn M, Øverby NC, et al. (2012) Dietary methods and biomarkers of omega 3 fatty acids: a systematic review. *Br J Nutr* 107, Suppl. 2, S64 – S76.

43. Knutsen SF, Fraser GE, Beeson WL, et al. (2003) Comparison of adipose tissue fatty acids with dietary fatty acids as measured by 24-hour recall and food frequency questionnaire in Black and White Adventists: the Adventist Health Study. *Ann Epidemiol* 13, 119 – 127.
44. Parker G, McClure G, Hegarty BD, et al. (2015) The validity of a food frequency questionnaire as a measure of PUFA status in pregnancy. *BMC Pregnancy Childbirth* 18, 15:60.
45. Wallin A, Di Giuseppe D, Burgaz A, et al. (2014) Validity of a food frequency questionnaire-based estimates of long-term long-chain n-3 polyunsaturated fatty acid intake. *Eur J Nutr* 53, 549 – 555.

TABELAS

Tabela 1 – Contribuição percentual para o consumo total de ácidos graxos e energia dos alimentos citados nos três recordatórios de 24 horas e que compõem o QFA – versão expandida (89 alimentos) e reduzida (27 alimentos) – do Estudo de Validação do Questionário de Frequência de Alimentos para gestantes adultas (n = 49), em Santo Antônio de Jesus, Bahia, Brasil, 2015.

Nutrientes / Energia ¹	QFA – Versão Reduzida (%)	QFA – Versão Expandida (%)
	27 alimentos	89 alimentos
Gramas	13,49	48,40
Saturados	33,87	92,11**
MUFA	40,17	92,45**
PUFA	28,62	89,34**
n-3 PUFA		
ALA	26,34	89,49**
EPA	99,46**	99,46**
DPA	99,69**	99,69**
DHA	96,82**	96,82**
Total n-3 PUFA	38,61	91,12**
Total LCPUFA n-3	97,60**	97,60**
n-6 PUFA		
LA	26,45	89,00**
AA	83,82*	92,90**
Total n-6 PUFA	27,2	89,05**
Colesterol	62,99	90,15**
Lipídeos Totais	35,35	91,61**
Calorias	21,77	67,41

MUFA: Ácidos graxos monoinsaturados; PUFA: Ácidos Graxos Poli-insaturados; n-3 PUFA: Ácidos Graxos Poli-insaturados da série n-3; ALA: Ácido α -Linolênico (18:3; n-3). EPA: Ácido Eicosapentaenoico (20:5; n-3). DPA: Ácido Docosapentaenoico (22:5; n-3). DHA: Ácido Docosa-hexaenoico (22:6; n-3). Total n-3 PUFA: Somatória dos ácidos graxos ALA, EPA, DPA e DHA; Total LCPUFA n-3: Somatória dos ácidos graxos de cadeia longa EPA, DPA e DHA; n-6 PUFA: Ácidos Graxos Poli-insaturados da série n-6; LA: Ácido Linoléico (18:2; n-6). AA: Ácido Araquidônico (20:4; n-6).

% = Percentual de contribuição dos alimentos listados no QFA expandido e no QFA reduzido em relação ao total do nutriente (**ver materiais e métodos**).

* Percentual de contribuição dos alimentos superior a 80% do total do nutriente nos três R24h.

** Percentual de contribuição dos alimentos superior a 89% do total do nutriente nos três R24h.

Tabela 2 – Ingestão de lipídeos e energia segundo QFA - versão expandida (89 alimentos) e reduzida (27 alimentos) – e R24h, e coeficiente de correlação entre os métodos, do Estudo de Validação do Questionário de Frequência de Consumo de Alimentos para gestantes adultas (n = 49), em Santo Antônio de Jesus, Bahia, Brasil, 2015.

Nutriente	QFA (Bruto)		R24h (Bruto)		Coeficiente de Correlação de Pearson (r =)	
	Média	DP	Média	DP	Bruto	Ajustado ¹
QFA - Versão Expandida						
Saturados (g)	37,92 [†]	18,46	26,26 [†]	10,30	0,517**	0,368**
MUFA (g)	32,79 [†]	15,96	21,62 [†]	9,56	0,584**	0,421**
PUFA (g)	20,58 [†]	9,94	12,44 [†]	6,12	0,606**	0,400**
n-3 PUFA						
ALA (g)	1,87 [†]	0,89	1,16 [†]	0,51	0,466**	0,234
EPA (g)	0,060	0,060	0,042	0,053	-0,103	-0,115
DPA (g)	0,038	0,050	0,026	0,046	-0,051	-0,041
DHA (g)	0,231 [†]	0,174	0,167 [†]	0,181	0,329*	0,221
Total n-3 PUFA (g)	2,201 [†]	1,013	1,399 [†]	0,652	0,455**	0,221
Total LCPUFA n-3 (g)	0,330 [†]	0,232	0,235 [†]	0,237	0,174	0,091
n-6 PUFA						
LA (g)	18,035 [†]	8,957	10,84 [†]	5,46	0,617**	0,414**
AA (g)	0,212 [†]	0,208	0,143 [†]	0,136	0,263	0,257
Total n-6 PUFA (g)	18,247 [†]	8,986	10,987 [†]	5,500	0,614**	0,406**
Colesterol (mg)	465,92 [†]	253,39	341,96 [†]	183,84	0,255	0,192
Lipídeos (g)	104,63 [†]	47,46	69,92 [†]	28,24	0,573**	0,404**

Continua...

... continuação.

Energia	2266,48	952,27	2169,07	561,78	-	-
QFA - Versão Reduzida						
n-3 PUFA						
EPA (g)	0,037	0,025	0,042	0,053	0,091	0,010
DPA (g)	0,017	0,022	0,026	0,046	0,121	0,116
DHA (g)	0,202	0,163	0,167	0,181	0,404**	0,277
Total LCPUFA n-3 (g)	0,256	0,188	0,235	0,237	0,324*	0,191
n-6 PUFA						
AA (g)	0,164	0,167	0,143	0,136	0,358*	0,334*

MUFA: Ácidos graxos monoinsaturados; PUFA: Ácidos Graxos Poli-insaturados; n-3 PUFA: Ácidos Graxos Poli-insaturados da série n-3; ALA: Ácido α -Linolênico (18:3; n-3). EPA: Ácido Eicosapentaenoico (20:5; n-3). DPA: Ácido Docosapentaenóico (22:5; n-3). DHA: Ácido Docosa-hexaenoico (22:6; n-3). Total n-3 PUFA: Somatória dos ácidos graxos ALA, EPA, DPA e DHA; Total LCPUFA n-3: Somatória dos ácidos graxos de cadeia longa EPA, DPA e DHA; n-6 PUFA: Ácidos Graxos Poli-insaturados da série n-6; LA: Ácido Linoléico (18:2; n-6). AA: Ácido Araquidônico (20:4; n-6).

¹ O consumo dos nutrientes foi ajustado pelo consumo total de energia pelo método residual.

† p < 0,05 para o teste t pareado para as diferenças entre o QFA e a média dos três R24hs.

*Significante em P<0,05

**Significante em P<0,01

Tabela 3 – Concordância da ingestão de lipídeos pelo QFA - versão expandida (89 alimentos) e reduzida (27 alimentos) – comparada com a média de consumo de três R24h, do Estudo de Validação do Questionário de Frequência de Consumo de Alimentos para gestantes adultas (n = 49), em Santo Antônio de Jesus, Bahia, Brasil, 2015.

Nutrientes	BLAND-ALTMAN			CONCORDÂNCIA INTER-QUARTIL	
	Média das diferenças ¹	LoA ² inferior	LoA superior	Mesmo Quartil (%)	Quartis extremos (%)
QFA - Versão Expandida					
Saturados (g)	-11,66	-42,66	19,34	36,7	2,0
Monoinsaturados (g)	-11,17	-36,47	14,12	34,7	6,1
Poli-insaturados (g)	-8,15	-23,63	7,34	38,8	6,1
(n-3) PUFA					
ALA (mg)	-0,71	-2,25	0,84	32,7	6,1
EPA (mg)	-0,30	-1,56	0,96	22,4	10,2
DPA (mg)	0,82	-1,88	1,37	26,5	14,3
DHA (mg)	-0,29	-1,52	0,95	24,5	8,2
Total n-3 PUFA (mg)	-0,80	-2,61	1,00	36,7	6,1
Total LCPUFA n-3 (mg)	-0,31	-1,52	0,91	26,5	10,2
(n-6) PUFA					
LA (mg)	-7,19	-14,39	0,11	40,8	6,1
AA (mg)	-0,17	-0,60	0,27	24,5	6,1
Total n-6 PUFA (mg)	-7,26	-14,55	0,03	44,9	6,1
Colesterol (mg)	-123,96	-658,18	410,25	36,7	4,1
Lipídeos (g)	-34,71	-110,99	41,57	42,9	4,1

Continua...

... continuação.

QFA – Versão Reduzida						
(n-3) PUFA						
EPA (mg)	0,005	-0,11	0,11	22,4	6,1	
DPA (mg)	0,008	-0,09	0,10	26,5	12,2	
DHA (mg)	-0,034	-0,40	0,33	16,3	8,2	
Total LCPUFA n-3 (mg)	-0,022	-0,49	0,45	36,7	6,1	
(n-6) PUFA						
AA (mg)	-0,021	-0,36	0,32	26,5	2,0	

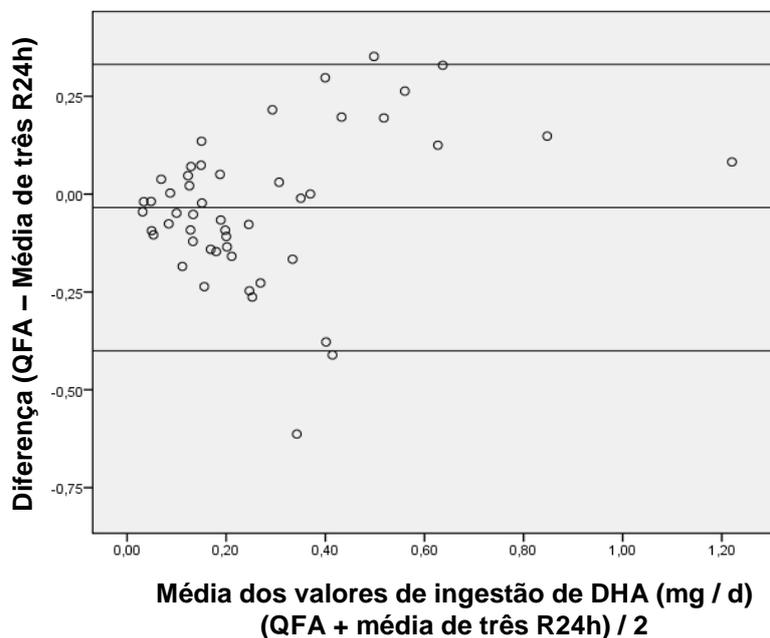
MUFA = Ácidos graxos monoinsaturados. PUFA = Ácidos Graxos Poli-insaturados. n-3 PUFA = Ácidos Graxos Poli-insaturados da série n-3. ALA = Ácido α -Linolênico (18:3; n-3). EPA = Ácido Eicosapentaenoico (20:5; n-3). DPA: Ácido Docosapentaenoico (22:5; n-3). DHA: Ácido Docosa-hexaenoico (22:6; n-3). Total n-3 PUFA: Somatória dos ácidos graxos ALA, EPA, DPA e DHA; Total LCPUFA n-3: Somatória dos ácidos graxos de cadeia longa EPA, DPA e DHA; n-6 PUFA: Ácidos Graxos Poli-insaturados da série n-6; LA: Ácido Linoléico (18:2; n-6). AA: Ácido Araquidônico (20:4; n-6).

¹ Média das diferenças = Diferença média entre: a) a diferença (ou viés) entre os dois métodos ($x - y$) e b) as médias dos valores dos dois métodos ($x + y$) / 2.

² LoA = limites de concordância (Média das diferenças \pm 1,96 SD).

FIGURAS

a)



b)

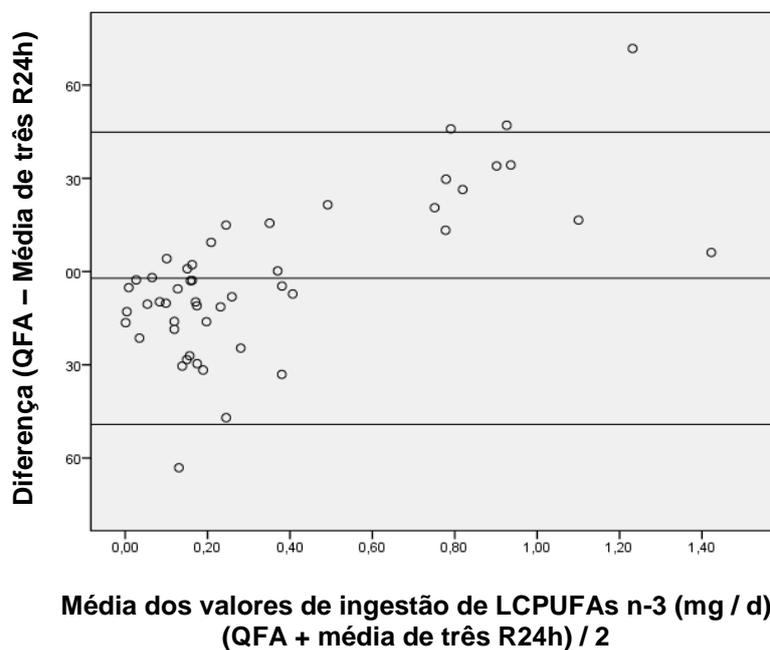


Figura 1. Concordância entre o QFA – versão curta e estendida e a média de ingestão do recordatório de 24 horas (R24h) na estimativa da a) Ingestão de ácido docosa-hexaenoico (DHA) e b) Ingestão de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (LCPUFAs) da série ômega 3 (n-3), avaliados pelo método de Bland-Altman (1986) (veja **Material e métodos**).

6.2 Manuscrito 2

POLIMORFISMOS MATERNOS NOS GENES DAS DESSATURASES (*FADS1* E *FADS2*) MODIFICAM A ASSOCIAÇÃO ENTRE INGESTÃO DE PUFAS E CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS ÔMEGA 3

RESUMO

Variantes genéticas no agrupamento de genes *FADS* têm sido consideradas um importante elo entre a ingestão e o perfil sanguíneo de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs). Assim, o objetivo do presente estudo foi verificar a interação entre polimorfismos nos genes *FADS* e ingestão de ácido α -linolênico (ALA) ou da razão LA/ALA nas concentrações plasmáticas de PUFAs ômega 3 (n-3) em gestantes. Foram realizadas coleta sanguínea e avaliação do consumo alimentar em 250 gestantes. Três polimorfismos do agrupamento *FADS* (*FADS1*: rs174561; *FADS2*: rs174575; Intergênico – *FADS2*: rs3834458) foram genotipados utilizando ensaios TaqMan[®]. Anova one way foi utilizada para comparar as médias das proporções plasmáticas de PUFAS n-3 segundo os genótipos, em cada tercil de ingestão de ALA e LA/ALA. No maior tercil de ingestão de ALA e da razão LA/ALA, as gestantes homozigotas para o alelo de menor frequência dos polimorfismos rs174561 e rs3834458 apresentavam maiores concentrações plasmáticas de ALA ($p < 0,05$). Para esses polimorfismos, EPA e DHA não foram afetados pela ingestão de ALA e da razão LA/ALA. Para o SNP rs174575, gestantes que carregavam o alelo de menor frequência apresentaram menores proporções de EPA plasmático no segundo tercil de ingestão da razão LA/ALA, em comparação com as gestantes homozigotas para o alelo de maior frequência ($p < 0,05$). Concluiu-se que o aumento da ingestão de ALA e da razão LA/ALA parece promover acúmulo plasmático de ALA nas homozigotas para o alelo de menor frequência dos polimorfismos rs174561 e rs3834458. A ingestão moderada da razão LA/ALA pode também reduzir a concentração plasmática de EPA nas gestantes que carregavam o alelo de menor frequência do polimorfismo rs174575.

Palavras-chave: Polimorfismo genético. Gestantes. Ácidos Graxos Essenciais. Nutrigenômica.

INTRODUÇÃO

As alterações no padrão de consumo da dieta ocidental ocorridas nas últimas décadas culminaram no aumento da ingestão de ácidos graxos ômega 6 (n-6) e na redução de ômega 3 (n-3), o que a caracteriza por uma alimentação essencialmente pró-inflamatória (Chilton et al., 2014; Patterson et al., 2012). Esse padrão de alimentação é particularmente prejudicial na gestação, quando grandes quantidades de ácido docosa-hexaenoico (DHA; 22:6; n-3), principal ácido graxo de cadeia longa (LCPUFA) n-3, são depositadas na retina e no tecido cerebral do feto, influenciando o desenvolvimento cognitivo e a acuidade visual da criança (Innis, 2007, Innis, 2014).

Os ácidos graxos α -linolênico (ALA, 18:3 n-3) e linoleico (LA, 18:2 n-6) não são sintetizados pelo organismo, devido à ausência das enzimas delta-15 e delta-12 dessaturases, respectivamente, e devem ser supridos pela alimentação (JANSSEN e KILIAAN, 2014; PATTERSON et al., 2012), sendo os óleos extraídos de sementes e as oleaginosas as principais fontes alimentares (Gunaratne et al., 2015; Huffman et al., 2011; Wall et al., 2010). Os LCPUFAs são as formas ativas dos ácidos graxos n-3 e n-6 no organismo, e podem ser obtidos por meio da alimentação, ou por meio de síntese endógena a partir do ALA ou LA, respectivamente (Yeates et al., 2015). Os LCPUFAs da série n-3, ácido eicosapentaenoico (EPA; 20:5; n-3) e ácido docosa-hexaenoico (DHA; 22:6; n-3), estão presentes em algas e alimentos de origem animal, principalmente peixes de águas frias e profundas. O ácido araquidônico (AA; 20:4; n-6), principal LCPUFA n-6, pode ser encontrado em carnes, aves e ovos (Gunaratne et al., 2015; Huffman et al., 2011; Wall et al., 2010; Meyer et al., 2000).

LA e ALA competem pelas mesmas enzimas no metabolismo de LCPUFAs (**Figura 1**). Para conversão de LA e ALA dietéticos em AA e EPA, respectivamente, são necessárias três etapas enzimáticas, sendo duas etapas de dessaturação reguladas pelos genes *FADS2* e *FADS1*, nessa ordem. A conversão de EPA a DHA exige mais 3 etapas enzimáticas, sendo uma etapa de dessaturação regulada pelo gene *FADS2*, e uma etapa de B-oxidação (Chilton et al., 2014; Guillou et al., 2010; Hester et al., 2014; Sprecher, 1981).

O agrupamento de genes humano das dessaturases (*FADS* – fatty acid dessaturases), genes *FADS1*, *FADS2* e *FADS3*, foi mapeado no ano 2000 e está

localizado no cromossomo 11q12-13.1 (Koletzko et al., 2011; Bokor et al., 2010; Marquardt et al., 2000). Polimorfismos de nucleotídeo único nos genes *FADS* têm sido associados com alterações das concentrações sanguíneas de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAS). No entanto, estudos têm mostrado resultados heterogêneos, já que a maioria dos SNPs parece reduzir as concentrações de LCPUFAs, mas em determinados estudos os mesmos loci podem não apresentar efeitos (Hong et al., 2013) ou os resultados são contraditórios (Lattka et al., 2013). A alta prevalência dos alelos de menor frequência na população em geral (11% a 40%) e sua relevância no metabolismo de ácidos graxos essenciais caracteriza essas variantes como um problema de saúde pública (Koletzko et al., 2011).

Destaca-se que, em função da influência no metabolismo de LCPUFAs, as variantes genéticas nos genes *FADS* parecem um importante elo entre a ingestão e o perfil sanguíneo de LCPUFAs (Takkunen et al., 2016; Gillingham et al., 2013). Os efeitos dessa interação gene-nutriente na saúde humana têm sido observados mais claramente nos indivíduos com o alelo de menor frequência (Mm ou mm), os quais apresentam menor atividade das enzimas dessaturases, e, por isso, costumam se beneficiar da maior ingestão ou suplementação de ALA (Hellstrand et al., 2014; Gillingham et al., 2013; Hellstrand et al., 2012) e de DHA (Gonzalez-Casanova et al., 2016; Scholtz et al., 2015; Moltó-Puigmartí et al., 2014; Al-Hilal et al., 2013).

Já foi demonstrado que a interação gene-nutriente pode afetar de forma heterogênea as concentrações de ácidos graxos (Scholtz et al., 2015; Al-Hilal et al., 2013; Gillingham et al., 2013; Harsløf et al., 2013; Cormier et al., 2012; Hellstrand et al., 2012; Moltó-Puigmartí et al., 2010) as concentrações de lipídeos séricos (Hellstrand et al., 2012; Standl et al., 2012; Lu et al., 2010), o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Hellstrand et al., 2014) e o quociente de inteligência de crianças (Steer et al., 2013). Entretanto, poucos estudos foram realizados com os polimorfismos rs174561 (*FADS1*), rs174575 e rs3834458 (*FADS2*) em gestantes, sendo necessário maior conhecimento das alterações no metabolismo de LCPUFAs associadas a essas variantes.

Considerando que as interações gene-nutriente influenciam as concentrações plasmáticas de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa e de seus precursores ALA e LA (Hellstrand et al., 2014), o objetivo do presente estudo foi verificar se as variantes dos genes *FADS1* (rs174561) e *FADS2* (rs174575 e rs3834458) afetam a relação entre ingestão de ácido α -linolênico (ALA) ou da razão

LA/ALA e as concentrações plasmáticas de ácidos graxos poli-insaturados da série ômega 3 em gestantes.

MATERIAIS E MÉTODOS

População do estudo

Trata-se de um estudo transversal aninhado à coorte prospectiva de gestantes do NISAMI. A coorte do NISAMI (Núcleo de Investigação em Saúde Materno Infantil) foi desenvolvida na zona urbana de Santo Antônio de Jesus, Bahia, Brasil, no período entre 2008 a 2016, e objetivava investigar os determinantes da saúde materno-infantil.

Foram convidadas a participar todas as gestantes da coorte com mais de 18 anos de idade e idade gestacional menor ou igual a 34 semanas no momento da coleta sanguínea, entre agosto de 2013 a dezembro de 2014. As que aceitaram participar realizaram avaliações adicionais de consumo alimentar e a coleta sanguínea para as análises de ácidos graxos e a genotipagem. Os critérios de exclusão foram: gestação múltipla, HIV, doenças contagiosas, imunológicas e metabólicas, e o consumo de dieta VEGAN.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), número do parecer: 241.225 de 09/04/2013.

Coleta de dados

A coleta de dados foi realizada após estudo piloto para calibragem dos instrumentos. O primeiro contato com a gestante ocorreu nas unidades de saúde em que realizavam o pré-natal, quando foi assinado o termo de consentimento informado e aplicado o questionário sóciodemográfico, de saúde e obstétrico. Em seguida, as gestantes foram encaminhadas para um laboratório de análises clínicas da cidade, onde realizaram a avaliação da ingestão alimentar e, em jejum, a avaliação antropométrica e a coleta sanguínea.

Características maternas e Ingestão de ácidos graxos poli-insaturados

Dados sociodemográficos, potenciais determinantes não-genéticos e possíveis fatores de confusão foram obtidos por um questionário estruturado. A avaliação antropométrica foi realizada em triplicata, de acordo com protocolos recomendados por Jelliffe (1968).

A ingestão de ácidos graxos pela gestante foi estimada por meio de um Questionário de Frequência de Consumo (QFA) semiquantitativo nutriente-específico, construído e validado para este fim. O QFA continha 89 itens, e estimava o consumo de alimentos fontes de PUFAS durante o período da gestação. As participantes eram questionadas quanto à frequência de consumo do alimento e o número de porções consumidas por vez. A quantidade, em gramas, do alimento ingerido por dia foi utilizado para cálculo dos nutrientes, tendo a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO) (NEPA – UNICAMP, 2011) como referência ou a Tabela de Composição de Alimentos da USDA (USDA, 2014), quando o alimento ou o nutriente não era encontrado na TACO. No caso de preparações, os ingredientes foram estimados e calculados individualmente (MIRMIRAN et al., 2010).

Composição de ácidos graxos plasmáticos

O plasma foi separado das células vermelhas e do buffy coat após centrifugação a 2500 rpm por 15 minutos, e congelado imediatamente em nitrogênio líquido até o momento das análises. A extração dos lipídeos foi realizada no Laboratório de Bioquímica Nutricional da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa – MG, Brasil, com 600mcL de plasma pelo método Folch (solução de Folch - clorofórmio/metanol 2:1) (Folch et al., 1957). A etapa de derivatização foi realizada pelo método de Hartman & Lago (1973).

A separação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos foi realizada em um cromatógrafo a gás modelo CG Solution da marca SHIMADZU, equipado com detector por ionização de chama (FID). A identificação dos ácidos graxos foi feita pela comparação dos tempos de retenção dos ésteres das amostras com o padrão de referência F.A.M.E. mix (Sigma-Aldrich[®], EUA). O conteúdo relativo dos ácidos graxos foi calculado pelo programa GC solution, e se baseava na contribuição de cada ácido graxo em relação à área total dos cromatogramas identificados, expresso como percentual de ácidos graxos (%).

Análises genéticas

O DNA genômico foi extraído a partir do buffy coat no período máximo de até 72 horas após a coleta sanguínea, utilizado kit de extração da Qiagen®, FlexiGene® DNA Kit (250). A extração foi realizada no Laboratório de Genética Humana da UFRB, onde permaneceu armazenado a -20°C até o momento das análises.

Os três SNPs foram selecionados por estarem relacionados com as concentrações corporais de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa em crianças e gestantes (Koletzko et al., 2011; Moltó-Puigmartí et al 2010; Rzehak et al., 2010; Xie e Innis, 2008). No Núcleo de Genética Humana e Molecular da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Vitória – ES, Brasil, as amostras foram genotipadas, utilizando ensaios TaqMan® pré-desenhados (rs174575 e rs174561) e customizado (rs3834458), com as condições de termociclagem indicadas pelo fabricante. Os seguintes primers e sondas foram utilizados para o SNP rs3834458: Primers (5'–3') forward AGAGCAGAGGTTCCGCAATT e reverse GCCTTGGATTAGAGGGCTTTGAA e Sondas (5'–3') alelo T VIC/TCAGACAATCTTAGAAAAG-NFQ e alelo Del FAM/TCAGACAATCTTGAAAAG-NFQ.

Análise estatística

Os dados foram digitados no programa Epidata e os dados analisados no software Stata versão 14. Na análise exploratória, as variáveis categóricas foram apresentadas como frequências absoluta e relativa. As variáveis discretas e contínuas foram descritas como média \pm DP. As variáveis que apresentaram dados assimétricos, avaliado pelo teste de Kolmogorov-Smirnov ou por meio de gráficos de dispersão e histograma, sofreram transformação logarítmica.

A frequência genotípica e a menor frequência alélica (MAF) foram calculadas. Foram considerados raros SNPs que apresentem frequência alélica entre 1% e 5% na população, os quais devem ser excluídos a fim de evitar a diminuição do poder das análises estatísticas (ZENG et al., 2015; ZIEGLER et al., 2008). A distribuição dos genótipos foi testada para o equilíbrio de Hardy-Weinberg utilizando-se o teste qui-quadrado ($p > 0,05$) no Software Arlequin versão 3.5.2.2. Gestantes homozigotas para o alelo de maior frequência (MM) foram codificadas como 1, heterozigotas (Mm) 2 e homozigotas para o alelo de menor frequência (mm) codificadas como 3.

As gestantes foram classificadas quanto ao tercil de consumo de ácido α -Linolênico (ALA) e da relação Ácido Linoleico: Ácido α -Linolênico (LA:ALA). Anova one way e Teste de Tukey foram utilizados para comparar as médias das concentrações plasmáticas de PUFAS segundo genótipos; e as médias das proporções plasmáticas de PUFAS n-3 segundo os genótipos, em cada tercil de consumo de ALA e LA:ALA.

O nível de significância utilizado nas análises foi de 5%.

RESULTADOS

Características da amostra

Das 379 gestantes que aceitaram participar do estudo, 272 compareceram ao laboratório para coleta sanguínea. Foram excluídas da análise 13 gestantes que não responderam ao questionário de consumo alimentar e seis que não responderam por completo ao questionário sociodemográfico. Três gestantes deixaram o estudo após abortarem. A amostra final era composta por 250 gestantes, com média de idade de 27,24 anos (**Tabela 1**).

Frequências alélica e genotípica

Os três polimorfismos dos genes *FADS1* (rs174561) e *FADS2* (rs174575 e rs3834458) foram genotipados com taxa de sucesso de 100%. Os alelos de menor frequência variavam de 22,0% a 28,8%, e as variantes genéticas estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,05$; **Tabela 2**).

Ácidos graxos plasmáticos segundo polimorfismos dos genes *FADS*

As concentrações plasmáticas de PUFAs segundo genótipos são mostradas na tabela 3. As proporções plasmáticas de PUFAs n-6 não diferiram entre os genótipos. Para os PUFAS n-3, eram maiores as proporções do substrato das dessaturases (ALA) nas gestantes homozigotas para o alelo de menor frequência dos polimorfismos rs174561 e rs3834458, em comparação com as homozigotas para o alelo de maior frequência ($p < 0,05$; **Tabela 3**). Para os três polimorfismos avaliados, não foram encontradas diferenças significativas nas concentrações plasmáticas de EPA, DHA e da razão EPA/ALA entre os genótipos.

Ácidos graxos plasmáticos segundo tercil de ingestão de ALA e polimorfismos dos genes *FADS*

Independente do tercil de ingestão de ALA, as concentrações plasmáticas de PUFAS n-3 não diferiram entre os genótipos, quando considerado o polimorfismo rs174575. Quando avaliados os polimorfismos rs174561 e rs3834458, observou-se que as concentrações plasmáticas de EPA e DHA não foram influenciados pela ingestão de ALA, sendo observadas diferenças significativas apenas para as concentrações plasmáticas de ALA. Das gestantes classificadas no tercil mais alto de ingestão de ALA, as concentrações plasmáticas de ALA eram mais elevadas nas homozigotas para o alelo de menor frequência ($p < 0,05$), em comparação com aquelas que carregavam o alelo de maior frequência (MM e Mm). Não foram encontradas diferenças significativas nas concentrações plasmáticas de ALA para gestantes classificadas nos dois primeiros tercis de ingestão de ALA (**Tabela 4; Figura 2**).

Ácidos graxos plasmáticos segundo tercil de ingestão da razão LA/ALA e polimorfismos dos genes *FADS*

Quando considerado o polimorfismo rs174575, apenas as concentrações plasmáticas de EPA foram influenciadas pela ingestão da razão LA/ALA, não sendo observadas diferenças significativas nas concentrações plasmáticas de ALA e DHA. No segundo tercil de ingestão da razão LA/ALA, gestantes que carregavam o alelo de menor frequência (Mm e mm) apresentavam menores níveis plasmáticos de EPA, quando comparadas com as gestantes homozigotas para o alelo de maior frequência ($p < 0,05$; **Tabela 5; Figura 3**).

Para os polimorfismos rs174561 e rs3834458, no terceiro tercil de ingestão da razão LA/ALA, as concentrações plasmáticas de ALA eram maiores nas gestantes homozigotas para o alelo de menor frequência em comparação com as gestantes que carregavam o alelo de maior frequência, homozigotas ou heterozigotas ($p < 0,05$) (**Tabela 5; Figura 3**). Não foram observadas diferenças significativas nas concentrações plasmáticas dos produtos das dessaturases (EPA e DHA) entre os genótipos (**Tabela 5; Figura 3**).

DISCUSSÃO

No presente estudo, os resultados apontaram para uma possível interação gene-nutriente nas concentrações plasmáticas de PUFAS n-3. A maior ingestão de ALA e da razão LA/ALA promoveu aumento das concentrações plasmáticas de ALA nas gestantes homozigotas para o alelo de menor frequência dos polimorfismos rs174561 e rs3834458, mas não alteraram as concentrações dos produtos das dessaturases, EPA e DHA. Em relação ao polimorfismo rs174575, foi observada alteração apenas nas concentrações plasmáticas de EPA, que estavam reduzidos no segundo tercil de ingestão da razão LA/ALA nas gestantes que carregavam o alelo de menor frequência, em comparação com as gestantes homozigotas para o alelo de menor frequência.

O aumento expressivo de ALA plasmático em resposta à maior ingestão de ALA nas gestantes homozigotas para o alelo de menor frequência dos polimorfismos rs174561 e rs3834458 pode ser reflexo da limitada conversão enzimática dos LCPUFAs em gestantes com esse genótipo. Provavelmente, esses polimorfismos afetam os mecanismos envolvidos com a transcrição gênica, promovendo o acúmulo de ALA plasmático em resposta ao aumento da ingestão desse ácido graxo.

Foi observado que gestantes homozigotas para o alelo de menor frequência dos polimorfismos rs174561 e rs3834458 apresentavam maiores concentrações plasmáticas do substrato das dessaturases ALA. Esse perfil plasmático, caracterizado por maior concentração de ALA, tem sido associado à menor atividade das enzimas Δ -5 e Δ -6 dessaturases (Lattka et al., 2013; Hong et al., 2013; Koletzko et al., 2011). Variantes genéticas nos genes *FADS1* e *FADS2* podem reduzir a transcrição gênica e a taxa de conversão enzimática das dessaturases, o que resultaria em aumento do substrato (ALA) e redução dos produtos (EPA e DHA) (Wang et al., 2015; Tintle et al., 2015; Al-Hilal et al., 2013; Glaser et al., 2011; Koletzko et al., 2011). O polimorfismo rs174575 apresentou comportamento distinto, já que as concentrações plasmáticas de PUFAs n-3 e n-6 estavam semelhantes, independente do genótipo.

Tem sido demonstrado que os indivíduos que possuem o alelo de menor frequência (Mm ou mm) podem compensar a menor conversão dos ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa da série ômega 3 pelo aumento do consumo de ácido α -Linolênico (ALA) (Hellstrand et al., 2014; Gillingham et al., 2013; Hellstrand

et al., 2012) ou, mais diretamente, pela suplementação ou ingestão de alimentos fontes de DHA (Gonzalez-Casanova et al., 2016; Scholtz et al., 2015; Moltó-Puigmartí et al., 2014; Al-Hilal et al., 2013).

Alguns estudos não encontraram associação entre polimorfismos nos genes *FADS* e concentração sanguínea de DHA, provavelmente porque a fonte desse nutriente é principalmente nutricional (Al-Hilal et al., 2013; Gillingham et al., 2013). Em condições normais, a conversão endógena de ALA para DHA é baixa, apresentando taxas que variam de 1 a 10%, dependendo de fatores genéticos (Huffman et al., 2011). Assim, em indivíduos geneticamente predispostos à biossíntese limitada de DHA, a principal estratégia para melhoria das concentrações plasmáticas seria por meio da ingestão direta de alimentos ricos nesse nutriente (Gillingham et al., 2013). Assim é possível que as gestantes homozigotas para o alelo de menor frequência dos polimorfismos rs174561 e rs3834458 sejam pouco beneficiadas pela ingestão de ALA, sendo melhores os resultados pela ingestão direta de DHA.

Estudos de interação gene-nutriente envolvendo a ingestão de EPA e DHA, geralmente por meio de suplementação, são mais comuns e mostram resultados mais expressivos nas concentrações sanguíneas de LCPUFAs (Gonzalez-Casanova et al., 2016; Scholtz et al., 2015; Al-Hilal et al., 2013; Gillingham et al., 2013, Cormier et al., 2012). Al-Hilal et al. (2013) observaram interação entre os genótipos do SNP rs174537 (*FADS1*) e ingestão de óleo de peixe na atividade da Δ -5 dessaturase, estimado pela razão AA:DGLA em eritrócitos. Após o tratamento, a atividade da Δ -5 dessaturase aumentou em função da dose do suplemento em indivíduos saudáveis que possuíam o alelo de menor frequência (GT e TT), mas sem alteração da atividade enzimática nas homozigotas para o alelo de maior frequência (GG).

Segundo Hellstrand et al. (2014), o consumo de ALA apresenta benefício adicional em relação ao consumo de LCPUFAs n-3. Enquanto ALA pode prevenir a via de conversão dos LCPUFAs n-6, já que compete com LA nas primeiras etapas do metabolismo de PUFAS, os LCPUFAs n-3 só competem mais tardiamente com LCPUFAs n-6 nas etapas do metabolismo de eicosanoides (Hellstrand et al., 2014, Hester et al., 2014; Patterson et al., 2012). Chilton et al. (2014) sugerem a existência de mecanismos epigenéticos que ligam as concentrações de LCPUFAs à maquinaria transcricional envolvida no metabolismo de ácidos graxos poli-insaturados.

No presente estudo, a maior ingestão da razão LA/ALA também favoreceu o aumento plasmático de ALA no plasma de gestantes homozigotas para o alelo de menor frequência dos polimorfismos rs174561 e rs3834458, e, adicionalmente, reduziu as concentrações de EPA nas gestantes que carregavam o alelo de menor frequência. Esse resultado também pode ser decorrente da competição enzimática de LA e ALA na etapa inicial do metabolismo de LCPUFAs (Chilton et al., 2014, Hellstrand et al., 2014, Patterson et al., 2012).

O EPA é considerado um fator protetor independente (Gillingham et al., 2013), já que compete pelas enzimas ciclooxigenases e lipoxigenases com o ácido araquidônico, favorecendo a síntese dos eicosanoides da série ímpar, que são menos inflamatórios (Hester et al., 2014). Ao contrário do observado no presente estudo, Gillingham et al. (2013) mostraram que, em indivíduos hiperlipidêmicos homozigotos para o alelo de menor frequência dos SNPs dos genes *FADS1* (rs174561, rs174545 e rs174537) e *FADS2* (rs174583), a dieta rica em ácido α -linolênico (ALA) elevou as concentrações plasmáticas de EPA, mas sem aumento de DHA. Os autores sugeriram que consumir dieta rica em ALA (aproximadamente 10% do valor calórico total) compensaria a aparente baixa atividade enzimática das dessaturases nos homozigotos para o alelo de menor frequência, elevando as concentrações plasmáticas de EPA.

Dessa forma, para favorecer a via de conversão de LCPUFAs n-3, o padrão alimentar deve ser caracterizado pelo o aumento da ingestão de ALA concomitante à menor ingestão de LA (Chilton et al., 2014, Hellstrand et al., 2014, Patterson et al., 2012). Hellstrand et al. (2014) não observaram relação do SNP rs174546 (*FADS1*) ou do consumo de PUFAS, avaliado pela história dietética, na incidência de doenças cardiovasculares, em 24.032 indivíduos saudáveis. No entanto, foi observada interação gene-nutriente, já que o maior consumo de ALA e da relação ALA/LA era inversamente relacionado ao risco de doenças cardiovasculares no genótipo homozigoto de menor frequência (TT) do SNP rs174546. Isso sugere que as variantes dos genes *FADS1* agem como modificadores de efeito na relação entre ingestão de PUFAS e doenças cardiovasculares, provavelmente por alterarem os níveis corporais de ácidos graxos poli-insaturados.

O desenvolvimento de um estudo de coorte prospectivo bem controlado, a coleta de dados padronizada e a aplicação de questionário de frequência alimentar para avaliação do consumo usual de ácidos graxos pelas gestantes foram

considerados pontos positivos do estudo. Os entrevistadores, nutricionistas e estudantes de nutrição, foram treinados antes do início do estudo para a padronização da avaliação do consumo alimentar. As amostras plasmáticas foram coletadas especificamente para a estimativa de ácidos graxos poli-insaturados, sendo, desde a coleta sanguínea, adotados todos os cuidados, em relação ao tempo, temperatura, exposição ao oxigênio e à luz, a fim de se diminuir ao máximo a degradação dos componentes plasmáticos.

Dentre as limitações, pode-se citar o delineamento complexo do estudo, a amostra reduzida e a necessidade de deslocamento das participantes para a coleta sanguínea. A amostra reduzida foi particularmente desfavorável para a determinação de ácidos graxos poli-insaturados no plasma, já que a análise é muito sensível. Amostras com ácidos graxos não detectados nos cromatogramas foram excluídas, o que reduziu ainda mais o número final da amostra. Em especial, destaca-se o DHA, cuja concentração usualmente muito baixa nos componentes sanguíneos é confundida com ruídos nos cromatogramas, o que dificulta sua detecção.

Estudos como esse, de interação gene-nutriente, devem ser incentivados, pois facilitam a compreensão da maior vulnerabilidade de determinados grupos. Conhecer os genótipos de risco facilita a elaboração de recomendações nutricionais e o planejamento alimentar individualizados, que considerem as variantes genéticas envolvidas em alterações metabólicas que impliquem em fenótipos desfavoráveis à saúde. Concomitantemente, devem ser conduzidos estudos que investiguem a importância biológica das alterações plasmáticas de ácidos graxos resultantes da interação gene-nutriente, a fim de identificar resultados que apresentem relevância clínica e não apenas estatística.

Os estudos que avaliam a interação gene-nutriente por meio de suplementação de nutrientes são importantes, pois permitem a melhor percepção de causalidade. No entanto, esses estudos utilizam-se de doses elevadas do nutriente, geralmente em quantidades acima da estabelecida por diretrizes nutricionais. De outro modo, o presente estudo avaliou se a interação gene-nutriente nas concentrações plasmáticas de PUFAS poderiam ser percebida em doses usualmente consumidas pela população geral, sem o uso de suplementos de DHA ou óleo de peixe (DHA + EPA) pelas gestantes. Para isso, foi desenvolvido e validado um QFA semiquantitativo nutriente-específico para a população do estudo.

Esse é um instrumento adequado para a estimativa de LCPUFAs n-3, já que os principais alimentos fonte, como os peixes, são consumidos com baixa frequência pela população de estudo, e podem não ser adequadamente estimados em outros tipos de inquéritos alimentares (Hellstrand et al., 2012).

Foi possível concluir que os polimorfismos rs174561 (*FADS1*) e rs3834458 (*FADS2*) atuam como modificadores de efeito na relação entre a ingestão de ALA e da razão LA/ALA e as concentrações plasmáticas de ácidos graxos poli-insaturados da série ômega 3 em gestantes. Nas homozigotas para o alelo de menor frequência dos polimorfismos rs174561 e rs3834458, o aumento do consumo de ALA parece não favorecer a conversão dos ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, EPA e DHA; no entanto, a menor ingestão da razão LA/ALA pode evitar o acúmulo plasmático de ALA. É possível que, nas gestantes homozigotas para o alelo de menor frequência dos polimorfismos rs174561 e rs3834458, o consumo de alimentos fontes de DHA seja recomendado, considerando a provável ocorrência de menor transcrição gênica e conversão enzimática. Em relação ao SNP rs174575, as concentrações plasmáticas de EPA estavam reduzidas em resposta à maior ingestão da razão LA/ALA nas gestantes que carregavam o alelo de menor frequência. Provavelmente, a menor ingestão de LA em relação à ingestão de ALA seja importante para promover o adequado perfil plasmático de LCPUFAs n-3 nessas gestantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al-Hilal M, Alsaleh A, Maniou Z, Lewis FJ, Hall WL, Sanders TA, O'Dell SD; MARINA study team. Genetic variation at the *FADS1-FADS2* gene locus influences delta-5 desaturase activity and LC-PUFA proportions after fish oil supplement. *J Lipid Res.* 2013;54(2):542-51.

Bokor S, Dumont J, Spinneker A, Gonzalez-Gross M, Nova E, Widhalm K, Moschonis G, Stehle P, Amouyel P, De Henauw S, Molnàr D, Moreno LA, Meirhaeghe A, Dallongeville J; HELENA Study Group. Single nucleotide polymorphisms in the *FADS* gene cluster are associated with delta-5 and delta-6 desaturase activities estimated by serum fatty acid ratios. *J Lipid Res.* 2010;51(8):2325-33.

Chilton FH, Murphy RC, Wilson BA, Sergeant S, Ainsworth H, Seeds MC, Mathias R. A. Diet-gene interactions and PUFA metabolism: a potential contributor to health disparities and human diseases. *Nutrients.* 2014;6(5):1993-2022.

Cormier H, Rudkowska I, Paradis AM, Thifault E, Garneau V, Lemieux S, Couture P, Vohl MC. Association between polymorphisms in the fatty acid desaturase gene cluster and the plasma triacylglycerol response to an n-3 PUFA supplementation. *Nutrients.* 2012;4(8):1026-41.

Folch J, Lees M, Stanley GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem.* 1957;226(1):497-509.

Gillingham LG, Harding SV, Rideout TC, Yurkova N, Cunnane SC, Eck PK, Jones PJ. Dietary oils and *FADS1-FADS2* genetic variants modulate [¹³C]α-linolenic acid metabolism and plasma fatty acid composition. *Am J Clin Nutr.* 2013;97(1):195-207.

Glaser C, Lattka E, Rzehak P, Steer C, Koletzko B. Genetic variation in polyunsaturated fatty acid metabolism and its potential relevance for human development and health. *Matern Child Nutr.* 2011;7(Suppl 2):27-40.

Gonzalez-Casanova I, Rzehak P, Stein AD, Garcia Feregrino R, Dommarco JA, Barraza-Villarreal A, Demmelmair H, Romieu I, Villalpando S, Martorell R, Koletzko B, Ramakrishnan U. Maternal single nucleotide polymorphisms in the fatty acid desaturase 1 and 2 coding regions modify the impact of prenatal supplementation with DHA on birth weight. *Am J Clin Nutr.* 2016;103(4):1171-8.

Gunaratne AW, Makrides M, Collins CT. Maternal prenatal and/or postnatal n-3 long chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) supplementation for preventing allergies in early childhood. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015;(7):CD010085.

Guillou H, Zadavec D, Martin PG, Jacobsson A. The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Prog Lipid Res.* 2010;49(2):186-99.

Harsløf LB, Larsen LH, Ritz C, Hellgren LI, Michaelsen KF, Vogel U, Lauritzen L. *FADS* genotype and diet are important determinants of DHA status: a cross-sectional study in Danish infants. *Am J Clin Nutr.* 2013;97(6):1403-10.

Hartman L, Lago RC. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab Practice.* 1973;22(6):475-476.

Hellstrand S, Ericson U, Gullberg B, Hedblad B, Orho-Melander M, Sonestedt E. Genetic variation in *FADS1* has little effect on the association between dietary PUFA intake and cardiovascular disease. *J Nutr.* 2014;144(9):1356-63.

Hellstrand S, Sonestedt E, Ericson U, Gullberg B, Wirfält E, Hedblad B, Orho-Melander M. Intake levels of dietary long-chain PUFAs modify the association between genetic variation in *FADS* and LDL-C. *J Lipid Res.* 2012;53(6):1183-9.

Hester AG, Murphy RC, Uhlson CJ, Ivester P, Lee TC, Sergeant S, Miller LR, Howard TD, Mathias RA, Chilton FH. Relationship between a common variant in the fatty acid desaturase (*FADS*) cluster and eicosanoid generation in humans. *J Biol Chem.* 2014;289(32):22482-9.

Hong SH, Kwak JH, Paik JK, Chae JS, Lee JH. Association of polymorphisms in *FADS* gene with age-related changes in serum phospholipid polyunsaturated fatty acids and oxidative stress markers in middle-aged nonobese men. *Clin Interv Aging.* 2013;8:585-96.

Huffman SL, Harika RK, Eilander A, Osendarp SJ. Essential fats: how do they affect growth and development of infants and young children in developing countries? A literature review. *Maternal Child Nutr.* 2011;7(Suppl 3):44-65.

Janssen CI, Kiliaan AJ. Long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) from genesis to senescence: the influence of LCPUFA on neural development; aging; and neurodegeneration. *Progress Lipid Res.* 2014;53:1-17.

Jelliffe, DB. Evaluación del estado de nutrición de la comunidad. Ginebra: Organización Mundial de La Salud; 1968.

Koletzko B, Lattka E, Zeilinger S, Illig T, Steer C. Genetic variants of the fatty acid desaturase gene cluster predict amounts of red blood cell docosahexaenoic and other polyunsaturated fatty acids in pregnant women: findings from the Avon Longitudinal Study of Parents and Children. *Am J Clin Nutr.* 2011;93(1):211-9.

Lattka E, Koletzko B, Zeilinger S, Hibbeln JR, Klopp N, Ring SM, Steer CD. Umbilical cord PUFA are determined by maternal and child fatty acid desaturase (*FADS*) genetic variants in the Avon Longitudinal Study of Parents and Children (ALSPAC). *Br J Nutr.* 2013;109(7):1196-210.

Marquardt A, Stöhr H, White K, Weber BH. cDNA cloning, genomic structure, and chromosomal localization of three members of the human fatty acid desaturase family. *Genomics.* 2000;66(2):175-83.

Mirmiran P, Esfahani FH, Mehrabi Y, Hedayati M, Azizi F. Reliability and relative validity of an FFQ for nutrients in the Tehran lipid and glucose study. *Public Health Nutr.* 2010;13(5):654-62.

Moltó-Puigmartí C, Plat J, Mensink RP, Müller A, Jansen E, Zeegers MP, Thijs C. *FADS1 FADS2* gene variants modify the association between fish intake and the docosahexaenoic acid proportions in human milk. *Am J Clin Nutr.* 2010;91(5):1368-76.

Nepa – Unicamp. Tabela brasileira de composição de alimentos / NEPA – UNICAMP - 4. ed. rev. e ampl. Campinas: NEPAUNICAMP; 2011.

Patterson E, Wall R, Fitzgerald GF, Ross RP, Stanton C. Health implications of high dietary omega-6 polyunsaturated Fatty acids. *J Nutr Metabol.* 2012;2012:539426.

Rzehak P, Thijs C, Standl M, Mommers M, Glaser C, Jansen E, Klopp N, Koppelman GH, Singmann P, Postma DS, Sausenthaler S, Dagnelie PC, van den Brandt PA, Koletzko B, Heinrich J; KOALA study group; LISA study group. Variants of the

FADS1 FADS2 gene cluster, blood levels of polyunsaturated fatty acids and eczema in children within the first 2 years of life. *PLoS One*. 2010;5(10):e13261.

Scholtz SA, Kerling EH, Shaddy DJ, Li S, Thodosoff JM, Colombo J, Carlson SE. Docosahexaenoic acid (DHA) supplementation in pregnancy differentially modulates arachidonic acid and DHA status across *FADS* genotypes in pregnancy. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2015;94:29-33.

Sprecher H. Biochemistry of essential fatty acids. *Prog Lipid Res*. 1981;20:13-22.

Takkunen MJ, de Mello VD, Schwab US, Kuusisto J, Vaittinen M, Ågren JJ, Laakso M, Pihlajamäki J, Uusitupa MI. Gene-diet interaction of a common *FADS1* variant with marine polyunsaturated fatty acids for fatty acid composition in plasma and erythrocytes among men. *Mol Nutr Food Res*. 2016;60(2):381-9.

Tintle NL, Pottala JV, Lacey S, Ramachandran V, Westra J, Rogers A, Clark J, Olthoff B, Larson M, Harris W, Shearer GC. A genome-wide association study of saturated, mono- and polyunsaturated red blood cell fatty acids in the Framingham Heart Offspring Study. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2015;94:65-72.

Usda. U.S. Department of Agriculture; Agricultural Research Service. 2014. USDA National Nutrient Database for Standard Reference; Release 27. Nutrient Data Laboratory Home Page; <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl> [acessado em 08 jul 2014].

Xie L, Innis SM. Genetic variants of the *FADS1 FADS2* gene cluster are associated with altered (n-6) and (n-3) essential fatty acids in plasma and erythrocyte phospholipids in women during pregnancy and in breast milk during lactation. *J Nutr*. 2008;138(11):2222-8.

Wall R, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. *Nutr Rev*, 2010;68(5):280-289.

Wang L, Athinarayanan S, Jiang G, Chalasani N, Zhang M, Liu W. Fatty acid desaturase 1 gene polymorphisms control human hepatic lipid composition. *Hepatology*. 2015;61(1):119-28.

Zeng P, Zhao Y, Qian C, Zhang L, Zhang R, Gou J, Liu J, Liu L, Chen F. Statistical analysis for genome-wide association study. *J Biomed Res.* 2015;29(4):285-97.

Ziegler A, König IR, Thompson JR. Biostatistical aspects of genome-wide association studies. *Biom J.* 2008;50(1):8-28.

TABELAS

Tabela 1 – Características das gestantes e dos recém-nascidos da amostra (n = 250), Santo Antônio de Jesus – Bahia, Brasil, 2016

Variável	Valor
Características Maternas	
Idade (anos)	27,24 ± 6,01
Cor	
- Negras	105 (42%)
- Pardas	105 (42%)
- Brancas	25 (10%)
- Outros	15 (6%)
Escolaridade (anos)	4,62 ± 1,53
-Ensino médio	208 (83,2%)
-Ensino fundamental	42 (16,8%)
Classe socioeconômica (n=244)	
-A	2 (0,8%)
-B	39 (15,6%)
-C	155 (62%)
-D	46 (18,4%)
-E	2 (0,8%)
Tabagismo, sim:não	18 (7,2%) : 232 (92,8%)
Consumo de álcool, sim:não	21 (8,4%) : 229 (91,6%)
Peso (Kg)	67,17 ± 12,82
Estatura (m)	1,61 ± 0,06
IMC (kg/m ²)	26,07 ± 5,01

Continua...

...continuação.

IMC pré-gestacional (kg/m ²)	24,17 ± 4,90
Primigesta (n=249)	106 (42,4%)
Número de gestações	0,96 ± 1,14
Idade gestacional (semanas) (n=243)	19,79 ± 7,18
Ingestão de n-3 PUFA	
- ALA (g/dia)	1,87 ± 0,87
- EPA (mg/dia)	65,58 ± 73,12
- DHA (mg/dia)	209,88 ± 211,72
Ingestão de n-6 PUFA	
- LA (g/dia)	18,21 ± 8,77
- AA (mg/dia)	186,23 ± 283,09
Características da criança ao nascer	
Sexo, fem:masc	134 (53,6%) : 116 (46,4%)
Idade Gestacional (semanas)	38,60 ± 1,96
Peso (g)	3324,06 ± 494,60

IMC = Índice de Massa Corporal. n-3 PUFA = Ácidos graxos poli-insaturados da série ômega 3. ALA = Ácido α -linolênico (18:3; n-3). EPA = Ácido Eicosapentaenoico (20:5; n-3). DHA = Ácido docosa-hexaenoico (22:6; n-3). n-6 PUFA = Ácidos graxos poli-insaturados da série n-6. LA = Ácido linoleico (18:2; n-6). AA = Ácido araquidônico (20:4 n-6). Fem = feminino. Masc = masculino.

Tabela 2 – Características dos três polimorfismos dos genes das dessaturases (*FADS*) da amostra de gestantes (n = 250)

Gene/SNP	Genótipo (%)			MAF	HWE
	MM	Mm	mm	%	p ¹
<i>FADS2</i>					
rs174575	CC (49,6)	CG (43,2)	GG (7,2)	28,8	0,44490
<i>FADS1</i>					
rs174561	TT (61,6)	TC (32,8)	CC (5,6)	22,0	0,46273
Intergênico (<i>FADS2</i>)					
rs3834458	TT (58,8)	TDel (34,8)	DelDel (6,4)	23,8	0,72693

SNP = Polimorfismo de nucleotídeo único. MM = Homozigoto de maior frequência. Mm = Heterozigoto. mm = homozigoto de menor frequência. MAF = Menor Frequência Alélica. HWE = Equilíbrio de Hardy-Weingberg. Del = Deleção.

¹ Derivado do Teste Qui-quadrado do Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Tabela 3 – Concentrações plasmáticas de ácidos graxos poli-insaturados (%) segundo polimorfismos dos genes das dessaturases (*FADS*) na amostra de gestantes

	rs174575				rs174561				rs3834458			
	MM	Mm	mm	P value*	MM	Mm	mm	P value*	MM	Mm	mm	P value*
PUFAS n-6												
LA (n = 193)	12,60	13,53	15,57	0,101	13,10	13,17	16,07	0,217	13,04	13,25	15,30	0,320
AA (n = 226)	1,53	1,88	1,52	0,126	1,65	1,61	2,56	0,051	1,63	1,66	2,28	0,184
AA/LA (n = 183)	0,11	0,15	0,15	0,125	0,13	0,13	0,17	0,655	0,13	0,13	0,15	0,895
PUFAS n-3												
ALA (n = 235)	1,75	1,76	1,46	0,752	1,71 ^a	1,55 ^a	3,14 ^b	0,004	1,66 ^a	1,66 ^a	2,76 ^b	0,028
EPA (n = 227)	2,95	2,24	2,59	0,053	2,58	2,75	2,22	0,689	2,57	2,77	2,15	0,554
DHA (n = 101)	2,29	2,83	2,96	0,426	2,30	3,06	2,19	0,201	2,37	2,93	2,16	0,367
EPA/ALA (n = 226)	2,21	1,61	1,89	0,088	1,94	2,00	1,23	0,454	1,98	1,95	1,32	0,464

MM = Homozigoto de maior frequência. Mm = Heterozigoto. mm = homozigoto de menor frequência. PUFAS n-6 = Ácidos graxos poli-insaturados da série n-6. LA: Ácido linoleico (18:2; n-6). AA = Ácido araquidônico (20:4; n-6). AA/LA = Relação ácido araquidônico/ ácido linoleico. PUFAS n-3 = Ácidos graxos poli-insaturados da série ômega 3. ALA = Ácido α -linolênico (18:3; n-3). EPA = Ácido Eicosapentaenoico (20:5; n-3); DHA = Ácido docosa-hexaenoico – (22:6; n-3). EPA/ALA = Relação Ácido eicosapentaenoico/ Ácido α -linolênico.

* ANOVA One Way. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 4 – Concentrações plasmáticas de ácidos graxos ômega-3 (%) segundo tercil de ingestão de ácido α -linolênico (ALA) e polimorfismos dos genes das dessaturases (*FADS*) na amostra de gestantes

	ALA ¹			EPA ²			DHA ³		
	1° Tercil	2° Tercil	3° Tercil	1° Tercil	2° Tercil	3° Tercil	1° Tercil	2° Tercil	3° Tercil
rs174575									
MM	1,39	1,46	2,10	3,03	2,51	2,90	2,52	2,19	2,16
Mm	2,08	1,61	1,66	2,28	1,72	2,30	3,49	2,83	2,33
mm	1,37	1,41	1,93	2,46	2,63	1,39	5,05	2,21	0,46
P-value*	0,054	0,739	0,582	0,333	0,208	0,350	0,275	0,698	0,530
rs174561									
MM	1,74	1,56	1,81 ^a	2,64	2,50	2,38	2,75	1,79	2,28
Mm	1,57	1,45	1,60 ^a	2,77	1,54	3,10	3,68	3,27	2,29
mm	1,91	1,58	4,53 ^b	2,17	1,41	2,64	4,04	2,67	1,25
P-value*	0,810	0,899	0,004	0,880	0,131	0,389	0,596	0,141	0,575
rs3834458									
MM	1,63	1,53	1,76 ^a	2,71	2,36	2,45	2,82	1,84	2,34
Mm	1,73	1,48	1,75 ^a	2,59	1,79	3,11	3,50	3,10	2,22
mm	1,82	1,65	4,30 ^b	2,80	2,11	1,75	4,04	2,44	1,25
P-value*	0,924	0,919	0,011	0,962	0,529	0,292	0,741	0,262	0,562

MM = Homozigoto de maior frequência. Mm = Heterozigoto. mm = homozigoto de menor frequência. ALA = Ácido α -Linolênico (18:3; n-3). EPA =Ácido Eicosapentaenoico (20:5; n-3); DHA = Ácido Docosa-hexaenoico (22:6; n-3).

¹ n = 235

² n = 226

³ n = 101

* ANOVA One Way. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey (p < 0,05).

Tabela 5 – Concentrações plasmáticas de ácidos graxos ômega-3 (%) segundo tercil de consumo de razão ácido linoleico/ácido linolênico (LA/ALA) e genótipos *FADS*

	ALA ¹			EPA ²			DHA ³		
	1° Tercil	2° Tercil	3° Tercil	1° Tercil	2° Tercil	3° Tercil	1° Tercil	2° Tercil	3° Tercil
rs174575									
MM	1,54	1,82	1,84	3,10	3,44 ^a	2,05	2,42	2,10	2,43
Mm	1,65	1,55	2,04	2,17	1,99 ^b	2,12	2,61	2,63	3,30
mm	1,23	1,35	2,12	3,43	1,50 ^b	4,22	1,33	3,02	5,29
P-value*	0,696	0,531	0,899	0,176	0,009	0,092	0,520	0,621	0,283
rs174561									
MM	1,52	1,86	1,71 ^a	2,72	2,70	2,17	1,78	2,30	2,58
Mm	1,63	1,36	1,69 ^a	2,56	2,83	2,10	3,02	2,38	4,27
mm	1,70	1,33	6,38 ^b	2,73	1,54	2,38	1,21	2,12	1,32
P-value*	0,869	0,268	<0,001	0,957	0,605	0,957	0,102	0,810	0,198
rs3834458									
MM	1,57	1,79	1,61 ^a	2,90	2,66	2,10	1,89	2,33	2,64
Mm	1,58	1,53	1,99 ^a	2,46	2,93	2,18	2,93	2,35	3,85
mm	1,57	1,29	5,41 ^b	2,11	1,50	2,84	1,48	3,12	1,32
P-value*	0,999	0,591	<0,001	0,628	0,466	0,413	0,194	0,815	0,369

MM = Homozigoto de maior frequência. Mm = Heterozigoto. mm = homozigoto de menor frequência. ALA = Ácido α -Linolênico (18:3; n-3). EPA = Ácido Eicosapentaenoico (20:5; n-3); DHA = Ácido Docosa-hexaenoico (22:6; n-3).

¹ n = 235

² n = 227

³ n = 101

* ANOVA One Way. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey (p < 0,05).

FIGURAS

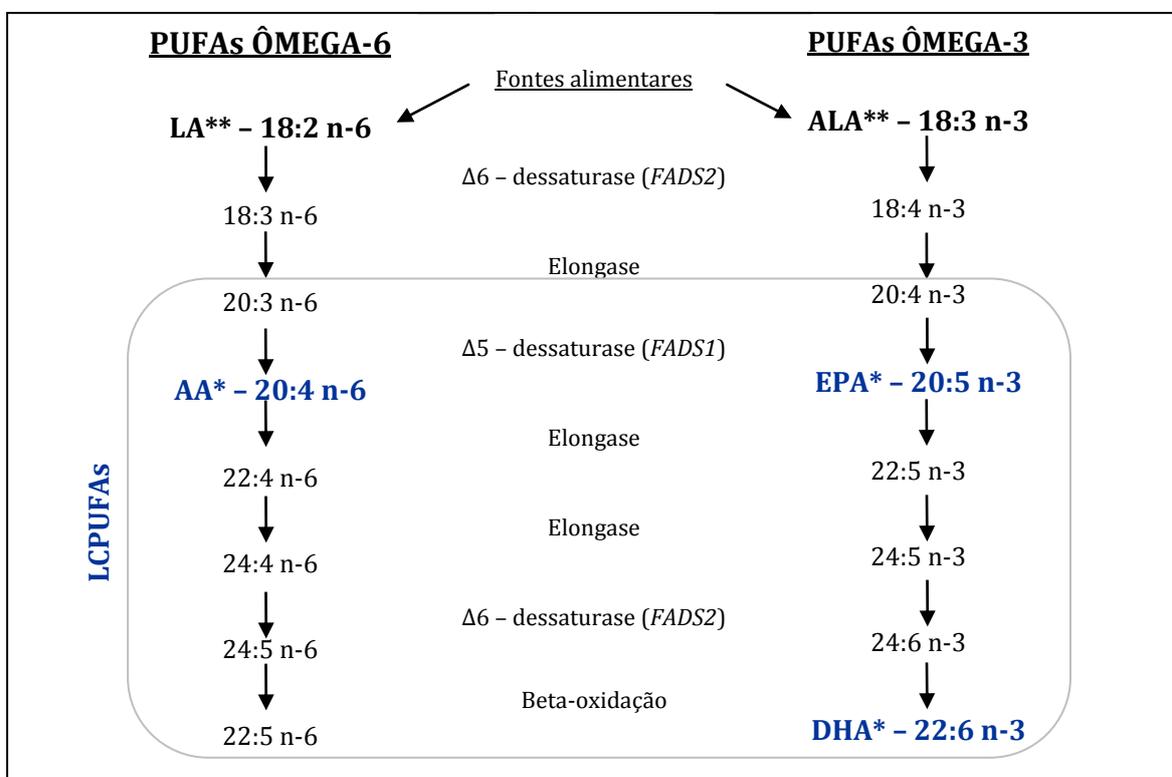


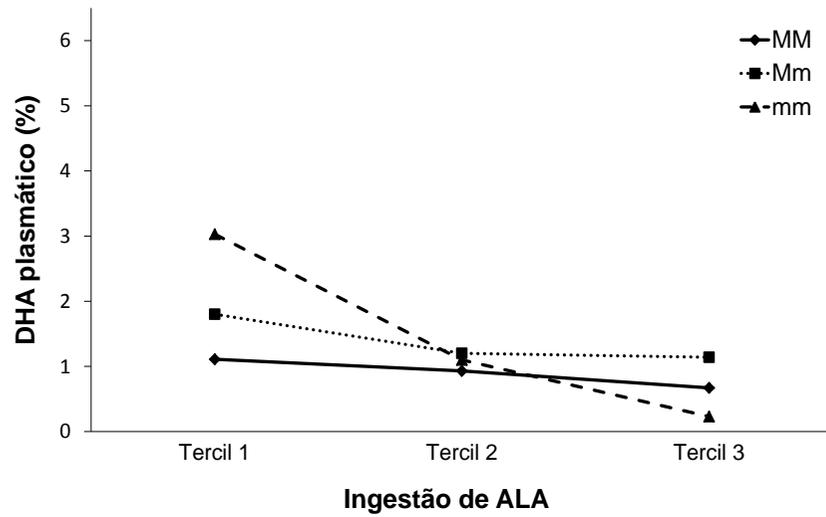
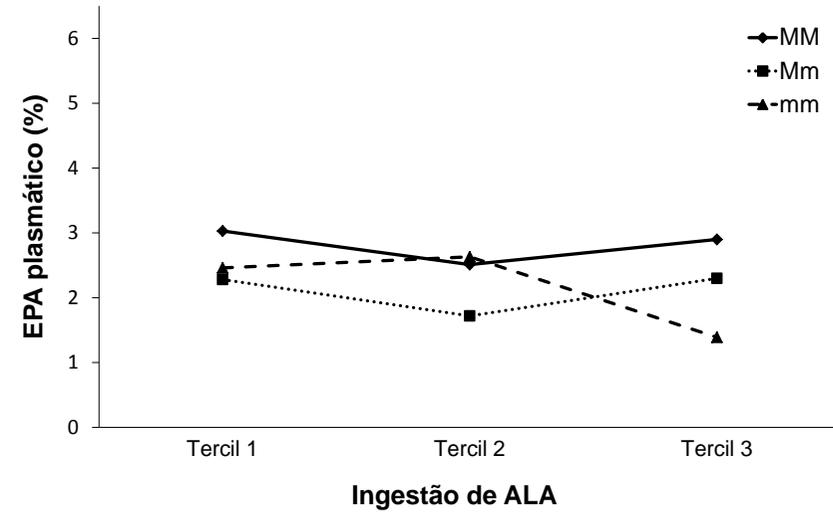
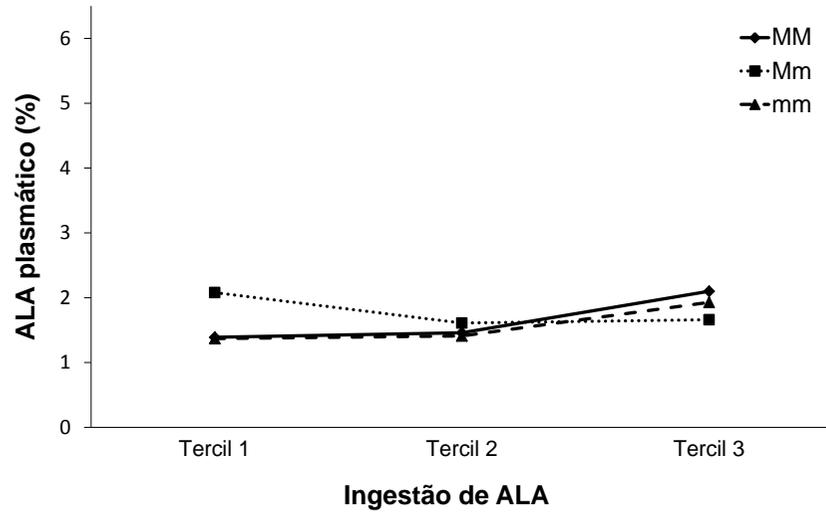
Figura 1. Representação esquemática da rota metabólica dos ácidos graxos poli-insaturados das séries ômega-3 e ômega-6 em humanos

* Forma ativa. ** Forma dietética.

PUFAs = Ácidos graxos poli-insaturados. LCPUFAs = Ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa. LA = Ácido Linoléico. ALA = Ácido α -Linolênico. AA = Ácido Araquidônico. EPA = Ácido Eicosapentaenoico. DHA = Ácido Docosa-hexaenoico.

Fonte: Lattka et al. (2010b); Gonzalez-Casanova et al. (2016) – adaptado.

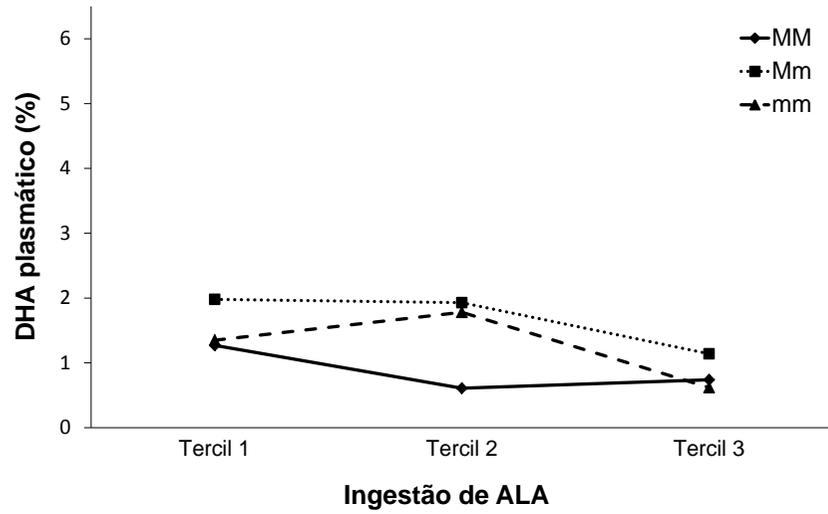
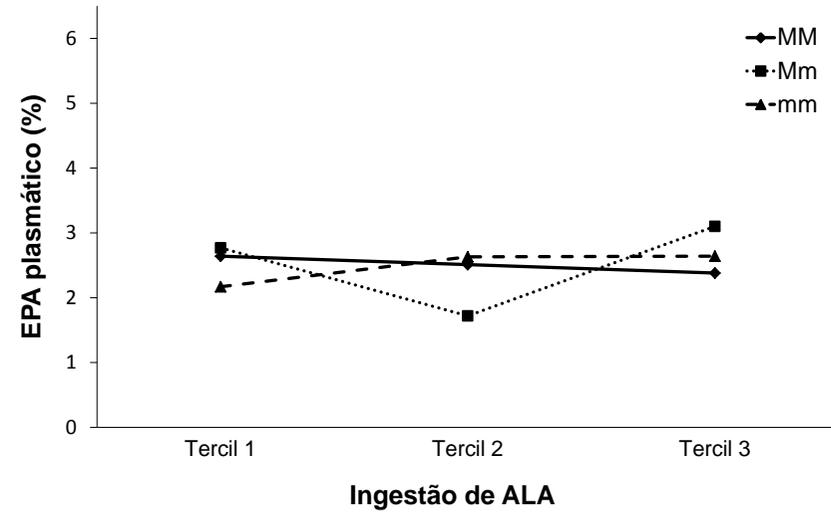
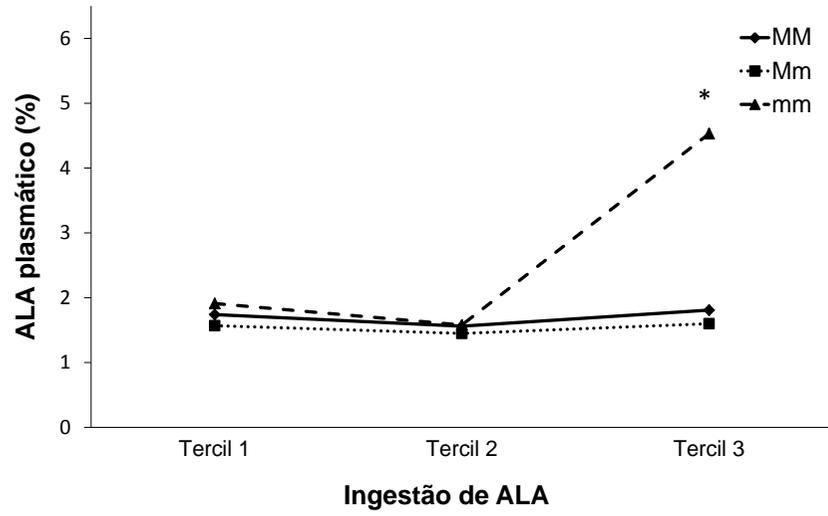
rs174575



Continua...

... continuação.

rs174561



Continua...

... continuação.

rs3834458

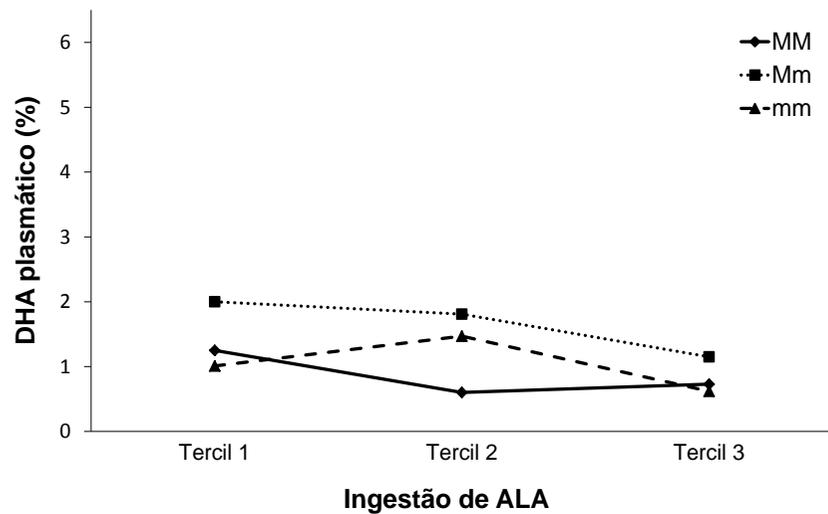
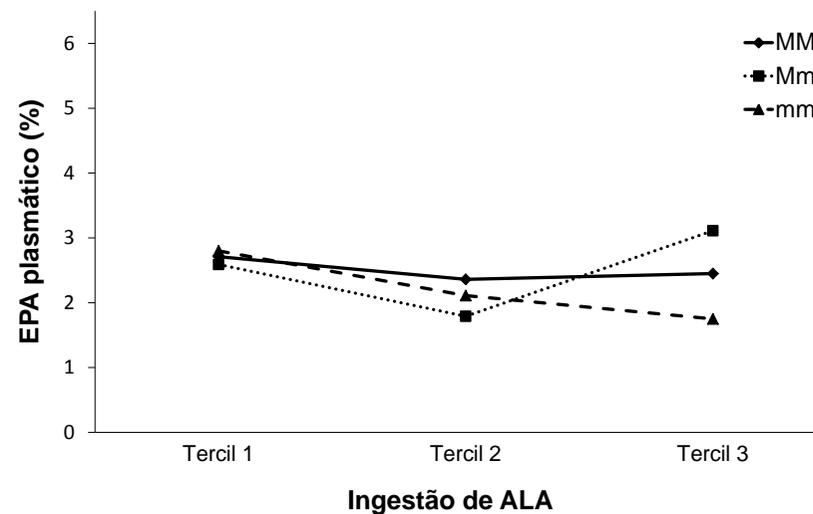
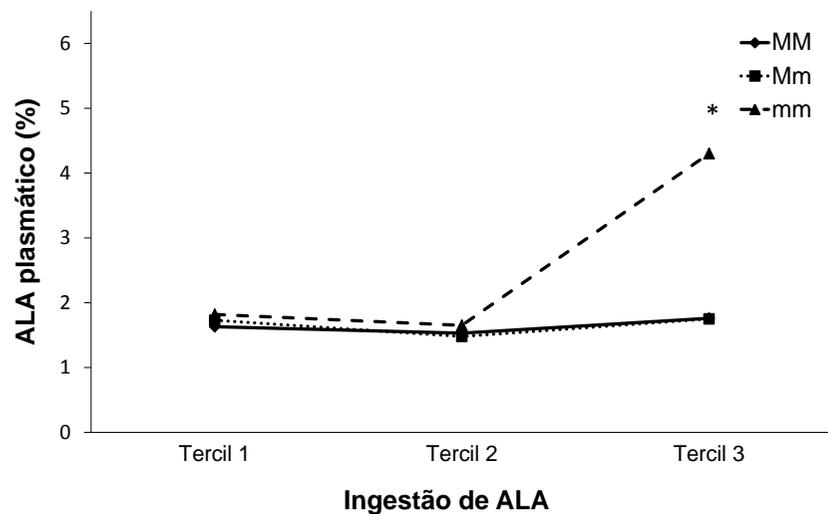
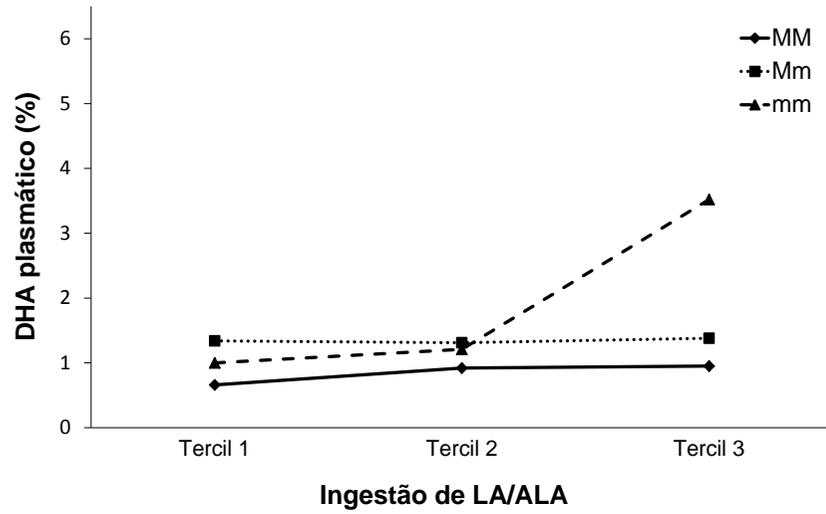
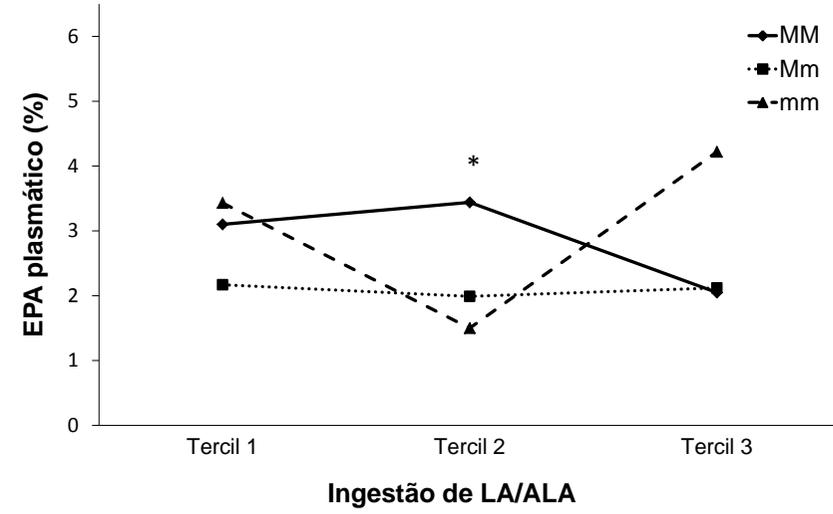
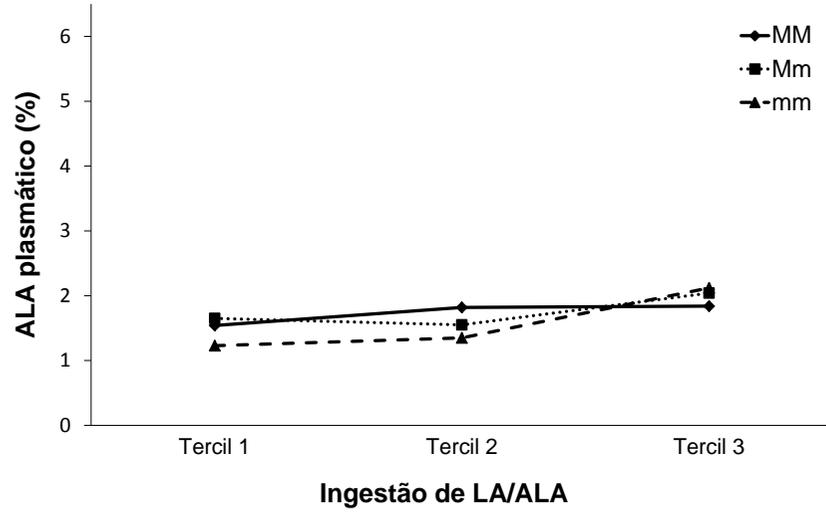


Figura 2. Concentrações plasmáticas de ácidos graxos ômega-3 (%) segundo tercil de ingestão de ácido α -linolênico (ALA) e polimorfismos dos genes *FADS1* (rs174561) e *FADS2* (174575 e rs3834458). ALA = Ácido α -linolênico (18:3; n-3). EPA = Ácido Eicosapentaenoico (20:5; n-3); DHA = Ácido docosa-hexaenoico – (22:6; n-3). rs174575 (MM = CC; Mm = CG; mm = GG). rs174561 (MM = TT; Mm = TC; mm = CC). rs3834458 (MM = TT; Mm = TDel; mm = DelDel).

* Anova One Way (Teste de Tukey. $p < 0,05$).

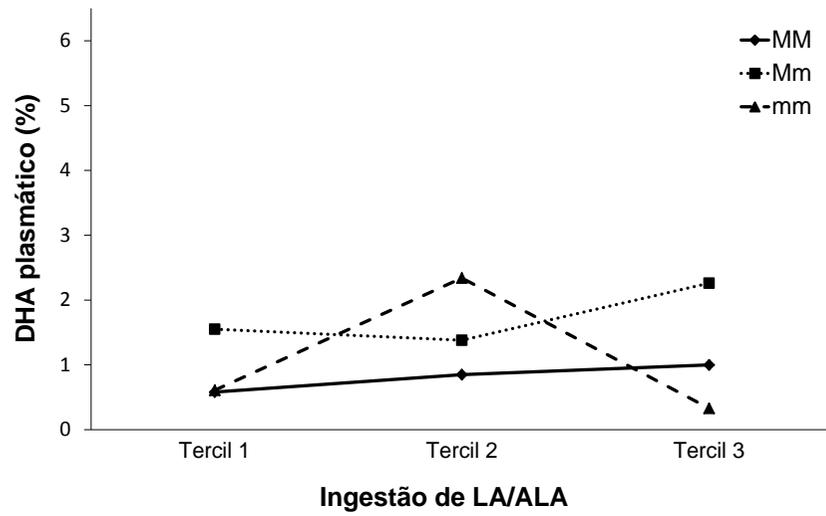
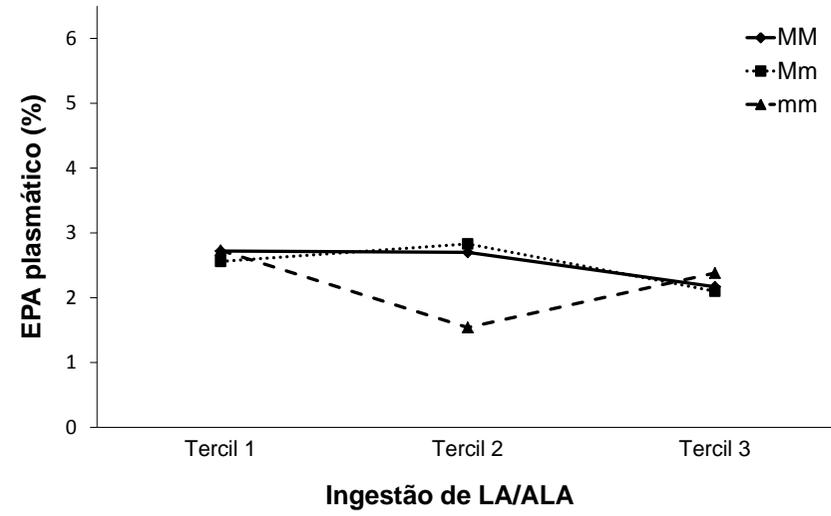
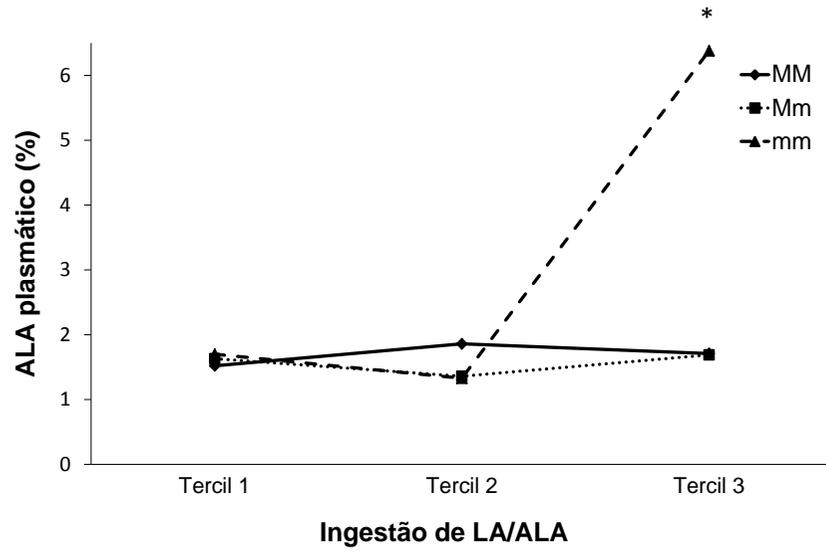
rs174575



Continua...

... continuação.

rs174561



Continua...

... continuação.

rs3834458

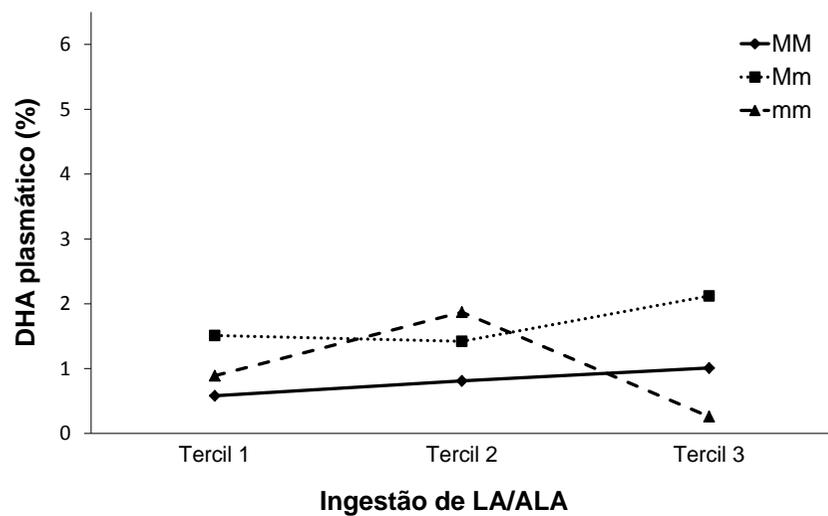
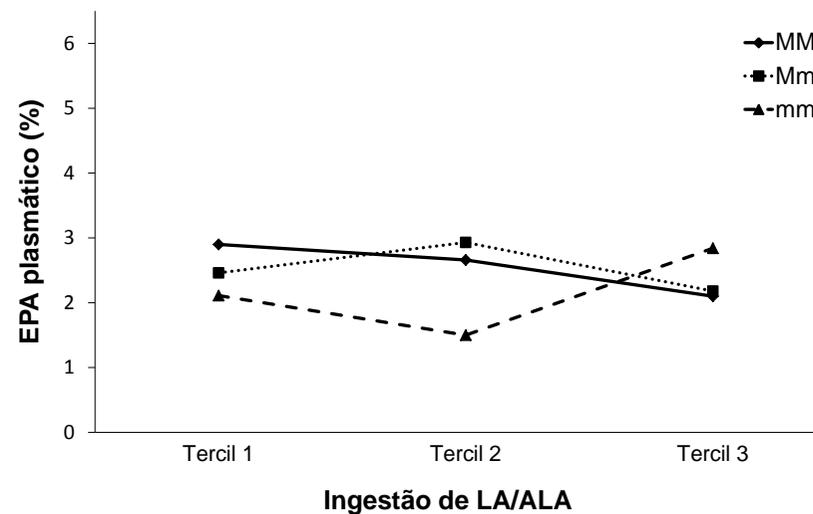
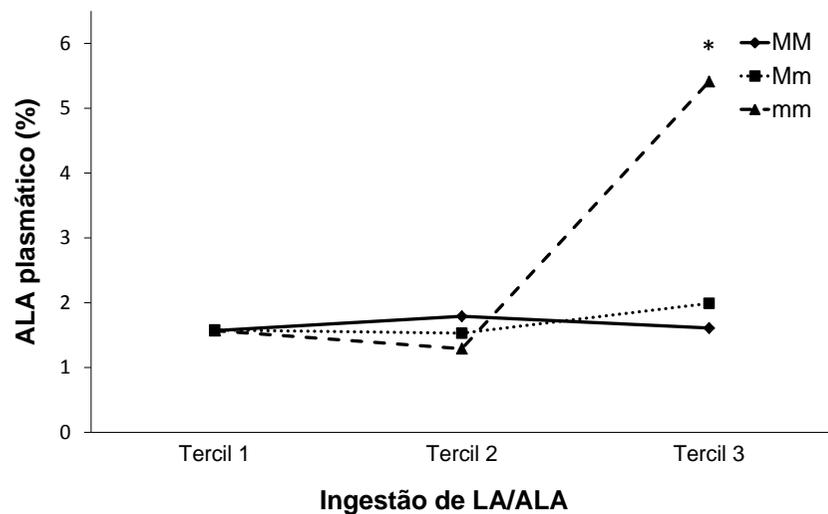


Figura 3. Concentrações plasmáticas de ácidos graxos ômega-3 (%) segundo tercil de ingestão da relação ácido linoleico / ácido α -linolênico (LA/ALA) e polimorfismos dos genes *FADS1* (rs174561) e *FADS2* (174575 e rs3834458). ALA = Ácido α -linolênico (18:3; n-3). EPA = Ácido Eicosapentaenoico (20:5; n-3); DHA = Ácido docosa-hexaenoico – (22:6; n-3). rs174575 (MM = CC; Mm = CG; mm = GG). rs174561 (MM = TT; Mm = TC; mm = CC). rs3834458 (MM = TT; Mm = TDel; mm = DelDel).
* Anova One Way (Teste de Tukey. $p < 0,05$).

6.3 Manuscrito 3

VARIAÇÃO GENÉTICA NO GENE *FADS2* MODULA O EFEITO DO CONSUMO DE ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS NA DURAÇÃO DA GESTAÇÃO

RESUMO

Menores concentrações sanguíneas de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (LCPUFAs) da série ômega n-3 em gestantes têm sido associadas com o aumento do risco de prematuridade. Além do consumo alimentar, os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) dos genes das dessaturases (*FADS*) parecem influenciar as concentrações plasmáticas de LCPUFAs. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi investigar se a existência de interação entre polimorfismos dos genes *FADS* e consumo de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAS) na duração da gestação. Foram avaliadas 250 mulheres de uma coorte prospectiva de gestantes de Santo Antônio de Jesus, Bahia, Brasil. A ingestão de PUFAS foi avaliada por questionário de frequência de consumo alimentar. Três SNPs do agrupamento dos genes *FADS* foram genotipados, utilizando ensaios TaqMan: rs174561 (*FADS1*), rs174575 (*FADS2*), rs3834458 (Intergênico – *FADS2*). A análise de regressão linear foi utilizada para avaliação da interação gene-nutriente na duração da gestação, ajustada para co-variáveis. Os resultados não mostraram associação entre consumo de PUFAS e a duração da gestação. Houve tendência de associação negativa entre os genótipos homozigotos para o alelo de menor frequência e a duração da gestação. Em gestantes heterozigotas (CG) do SNP rs174575, o consumo de ALA se associou positivamente e o consumo de LA se associou negativamente com a duração da gestação ($p < 0,05$). Não foi observada interação gene-nutriente para os polimorfismos rs174561 e rs3834458. Concluiu-se que gestantes heterozigotas (CG) do SNP rs174575 (*FADS2*) podem se beneficiar do maior do consumo de ALA no aumento do tempo de gestação, enquanto que o elevado consumo de LA pode reduzir a duração gestação.

Palavras-chave: Gestantes. Polimorfismo genético. Ácidos graxos insaturados. Idade gestacional. Nutrigenômica.

INTRODUÇÃO

O perfil de ácidos graxos no sangue e em tecidos são importantes determinantes da saúde do indivíduo (Umemoto et al., 2016; Mumford et al., 2016; Chaddha e Eagle, 2015; Hidaka et al., 2015). Na gestação, maiores concentrações de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) da série ômega 3 (n-3), em especial o ácido docosa-hexaenoico (DHA; 22:6; n-3), estão relacionadas com melhor resultado obstétrico, enquanto os da série ômega 6 (n-6) parecem influenciar negativamente os desfechos gestacionais (Best et al., 2016; Kar et al., 2016; Gunaratne et al., 2015; Harris et al., 2015; Zhao et al., 2014; Carlson et al., 2013; Noakes et al., 2012; Innis, 2007; Innis, 2003). Estudos com gestantes mostraram associação entre ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (LCPUFAs) n-3 na ocorrência de gestações mais longas e no menor risco de prematuridade (Christian et al., 2016; Chen et al., 2016; Carlson et al., 2013; Ramakrishnan et al., 2010; Van Eijsden et al., 2008; Facchinetti et al., 2005, Smuts et al., 2003, Olsen et al., 1991).

Os principais ácidos graxos de cadeia longa são o ácido araquidônico (AA; 20:4; n-6), o ácido eicosapentaenoico (EPA; 20:5; n-3) e ácido docosa-hexaenoico (DHA; 22:6; n-3) (XIE E INNIS, 2008). Os LCPUFAs são as formas ativas dos ácidos graxos n-3 e n-6 no organismo, e podem ser obtidos por meio da alimentação, ou por meio de síntese endógena hepática a partir do ALA (18:3 n-3) ou LA (20:4 n-6), respectivamente (Yeates et al., 2015) (**Figura 1**). Essa via de conversão dos ácidos graxos poli-insaturados de 18 carbonos (ALA e LA) para a formação de LCPUFA, que possuem de 20 a 22 carbonos, envolve a ação das enzimas elongases e dessaturases (Lattka et al., 2010b; Tu et al., 2010).

FADS1 e *FADS2* são os genes que codificam as enzimas delta-5 e delta-6 dessaturase (Koletzko et al., 2011; Bokor et al., 2010; Marquardt et al., 2000). Variantes nos genes *FADS* podem influenciar a atividade das dessaturases e, com isso, a taxa de conversão dos LCPUFAs. Indivíduos contendo um ou dois alelos de menor frequência geralmente apresentam maiores concentrações dos substratos ALA e LA, e menores concentrações dos produtos da dessaturação AA, EPA e DHA (Wang et al., 2015; Tintle et al., 2015; Glaser et al., 2011; Koletzko et al., 2011). Dessa forma, sugere-se que as concentrações sanguíneas de DHA sejam moduladas tanto pela ingestão alimentar quanto por fatores genéticos (Scholtz et al.,

2015; Yeates et al., 2015; Al-Hilal et al., 2013; Gillingham et al., 2013, Harsløfet al., 2013).

No período intrauterino e até os seis meses após o nascimento, a criança depende fundamentalmente da transferência materna de LCPUFAs pelo cordão umbilical e pelo leite materno (Dirix et al., 2009; Xie e Innis, 2008). Isso porque a placenta não possui as enzimas delta-5 e delta-6 dessaturases, e a atividade enzimática no feto e na criança menor de 6 meses é muito limitada (Hanebutt et al., 2008). Alguns autores sugeriram que polimorfismos dos genes *FADS* em gestantes poderiam influenciar a duração da gestação (Moltó-Puigmartí et al., 2014; Liu et al., 2012), apesar de poucos estudos sobre o assunto terem sido encontrados. Estudos com gestantes mostraram a interação entre determinados SNPs dos genes *FADS* e consumo de ácidos graxos poli-insaturados nas concentrações corporais de LCPUFAs (Scholtz et al., 2015) ou na duração da gestação (Moltó-Puigmartí et al., 2014). No entanto, esse ainda é um assunto recente e pouco explorado.

Dessa forma, considerando que as concentrações maternas de LCPUFAs podem influenciar a duração da gestação, e que tanto a alimentação como o perfil genético da gestante podem influenciar essas concentrações, no presente estudo foi proposto: 1) investigar a associação entre consumo de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) e dos polimorfismos maternos dos genes *FADS* na duração da gestação; 2) verificar a existência de interação gene-nutriente na duração da gestação.

METODOLOGIA

População de estudo

A coorte do NISAMI (Núcleo de Investigação em Saúde Materno Infantil) é uma coorte prospectiva de gestantes que investigou os fatores determinantes da saúde materno-infantil na zona urbana de Santo Antônio de Jesus, Bahia, Brasil, no período de 2009 e 2016. No presente estudo, foram incluídas as gestantes que participaram da coorte do NISAMI entre agosto de 2013 a dezembro de 2014. Foram incluídas as gestantes clinicamente saudáveis, inscritas no serviço público de saúde pré-natal da cidade, residentes e domiciliadas na zona urbana de Santo Antônio de Jesus – Bahia, Brasil, com idade superior a 18 anos e idade gestacional menor ou

igual a 34 semanas no momento da coleta sanguínea. Foram excluídas as mulheres com gestação múltipla, HIV positivas, com doenças contagiosas, imunológicas e metabólicas, e as que consumiam dieta VEGAN.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), número do parecer: 241.225 de 09/04/2013. Todas as participantes assinaram o termo de consentimento escrito.

Coleta de dados

Anterior à coleta de dados, foi realizado um estudo piloto para calibragem dos instrumentos e equipamentos da pesquisa (**Figura 2**). O estudo foi, então, conduzido em duas etapas, durante a gestação e após o parto. Na **primeira etapa**, entrevistas padronizadas foram conduzidas por entrevistadores treinados nas unidades de saúde para obtenção de informações sócio-demográficas, de saúde e obstétricas das gestantes. A coleta sanguínea foi realizada em um laboratório de análises clínicas da cidade por profissional capacitado. Nesse local também foram avaliados o peso, em jejum, a estatura e o consumo alimentar da gestante. Na **segunda etapa**, as datas de nascimento das crianças foram coletadas no Departamento de Vigilância Epidemiológica (VIEP) da Secretaria Municipal de Saúde. Visitas domiciliares foram realizadas ao final do estudo para aquelas gestantes cujos dados dos desfechos gestacionais não foram encontrados no VIEP.

Características maternas

Características sociodemográficas, potenciais determinantes não-genéticos e possíveis fatores de confusão do resultado obstétrico foram obtidos por meio de questionário estruturado, aplicado durante a gestação. O peso, em jejum, e a estatura materna foram aferidos em triplicata, seguindo protocolos recomendados por Jelliffe (1968).

Ingestão de ácidos graxos poli-insaturados

Um Questionário de Frequência de Consumo (QFA) semiquantitativo nutriente-específico foi construído e validado para estimar o consumo usual de lipídeos durante a gestação, em especial, o consumo de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa das séries n-3 e n-6. Para a estimativa de consumo, a

gestante relatou a frequência de consumo do alimento, a partir do início da gestação, e o número de porções consumidas por vez. Na análise dos dados, cada alimento do QFA foi convertido em consumo diário (g), considerando a frequência de consumo e o número de porções relatados pelas gestantes.

Para estimativa da ingestão de ácidos graxos, foi utilizada a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO) (NEPA – UNICAMP, 2011). Para as preparações, os nutrientes foram estimados de acordo com seus ingredientes (Mirmiran et al., 2010). Quando um alimento ou nutriente não era encontrado na TACO, foi utilizada a Tabela de Composição de Alimentos (National Nutrient Database for Standard Reference) do Departamento de Agricultura do Estados Unidos – USDA (USDA, 2014).

Análises genéticas

O DNA genômico foi extraído das células brancas das amostras sanguíneas maternas, em até 72 horas após a coleta, no Laboratório de Genética Humana da UFRB. Foi utilizado o kit de extração da Qiagen®, FlexiGene® DNA Kit (250), de acordo com a metodologia recomendada pelo fabricante. Após extração do DNA, as amostras foram acondicionadas a -20°C até o momento da genotipagem.

Os SNPs selecionados foram relacionados, pela literatura, com alterações nas concentrações de ácidos graxos de cadeia longa em crianças e gestantes (Koletzko et al., 2011; Moltó-Puigmartí et al 2010; Rzehak et al., 2010; Xie e Innis, 2008). A genotipagem foi realizada no Núcleo de Genética Humana e Molecular da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Vitória-ES, Brasil, utilizando ensaios TaqMan® pré-desenhados (rs174575 – *FADS2*, e rs174561 – *FADS1*) e customizado (rs3834458 – *FADS2*), com as condições de termociclagem indicadas pelo fabricante. Os seguintes primers e sondas foram utilizados para o SNP rs3834458: Primers (5'–3') forward AGAGCAGAGGTTCCGCAATT e reverse GCCTTGGATTAGAGGGCTTTGAA e Sondas (5'–3') alelo T VIC/TCAGACAATCTTAGAAAAG-NFQ e alelo Del FAM/TCAGACAATCTTGAAAAG-NFQ.

O controle de qualidade do padrão de genotipagem incluiu controles negativos em cada placa. Três amostras foram genotipadas em cada placa para avaliação da reprodutibilidade da genotipagem. A reprodutibilidade e a taxa de sucesso na genotipagem foram de 100% (Taxa de falha na genotipagem foi de 0%).

Duração da gestação

A data de nascimento da criança foi obtida no Departamento de Vigilância Epidemiológica (VIEP) da Secretaria Municipal de Saúde. O cálculo da duração da gestação, em dias, foi baseado na diferença entre a data de nascimento da criança e a data da última menstruação (DUM) da gestante. Visitas domiciliares foram realizadas ao final do estudo para aquelas gestantes cujos dados dos desfechos gestacionais não foram encontrados no VIEP.

Análise estatística

Os dados foram digitados no programa Epidata e analisados no software Stata versão 14. Na análise exploratória, as variáveis categóricas foram apresentadas como frequências absoluta e relativa. As variáveis discretas e contínuas foram descritas como média \pm DP. As variáveis que apresentaram dados com distribuição assimétrica, avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov ou por meio de gráficos de dispersão e histograma, sofreram transformação logarítmica.

A frequência genotípica e a menor frequência alélica (MAF) foram calculadas. Foram considerados raros SNPs com frequência alélica entre 1% e 5% na população, os quais seriam excluídos a fim de evitar a diminuição do poder das análises estatísticas (Zeng et al., 2015; Ziegler et al., 2008). A distribuição dos genótipos foi testada para o equilíbrio de Hardy-Weinberg utilizando-se o teste qui-quadrado ($p > 0,05$). Gestantes homozigotas para o alelo de maior frequência (MM) foram codificadas como 1, as heterozigotas (Mm) 2 e as homozigotas para o alelo de menor frequência (mm) como 3.

Anova one way e Teste de Tukey foram utilizados para comparar as médias de ingestão de PUFAS segundo os genótipos. A associação entre o consumo de PUFAS e a duração da gestação foi analisada por meio da regressão linear múltipla, ajustada para variáveis maternas (idade, escolaridade, cor, IMC pré-gestacional, número de gestações, ingestão de bebida alcoólica e tabagismo durante a gestação) e sexo da criança. Para avaliar a associação entre genótipos *FADS* e duração da gestação, cada SNP foi avaliado individualmente, ajustados para as mesmas variáveis maternas e sexo da criança. O genótipo homozigoto de maior frequência foi utilizado como referência.

Para avaliar a interação criaram-se termos produto gene-nutriente, para cada genótipo e cada PUFA, ajustando os modelos com e sem os termos produto. Foi o

usado o teste da razão da verossimilhança para comparar os modelos e decidir pela significância da interação.

O nível de significância utilizado nas análises foi de 5%.

RESULTADOS

Dentre as 379 gestantes que aceitaram participar da coleta sanguínea, 272 compareceram ao laboratório no dia do agendamento e foram genotipadas, e 259 responderam ao questionário de consumo alimentar. Foram excluídas da análise estatística três gestantes que sofreram aborto e seis que não responderam por completo ao questionário sociodemográfico. A amostra final correspondeu em 250 gestantes, cujas características gerais estão apresentadas na **Tabela 1**. Com idade média de $27,24 \pm 6,01$ anos e escolaridade média de $4,62 \pm 1,53$ anos, a maioria era de classe média, não tabagista, não etilista, e mais de 80% eram negras ou pardas.

A taxa de sucesso na genotipagem foi de 100% para os 3 SNPs. As frequências dos alelos variantes foram de 22,0% a 28,8% na população de gestantes avaliada, e a distribuição genotípica dos 3 SNPs estava consistente com o equilíbrio de Hardy-Weingberg (**Tabela 2**).

As gestantes heterozigotas dos polimorfismos rs174561 e rs3834458 ingeriam menores quantidades de LA que as gestantes homozigotas para o alelo de maior frequência ($p < 0,05$). Não foram observadas diferenças na ingestão de AA, ALA, EPA e DHA entre os genótipos dos três polimorfismos avaliados (**Tabela 3**).

A ingestão de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) pelas gestantes não se associou com a duração da gestação, mesmo após ajuste para covariáveis maternas e sexo da criança (**Tabela 4**). Houve tendência de associação negativa entre ingestão de DHA, AA e LA com a duração da gestação, e tendência de associação positiva para a ingestão de ALA e EPA, mas não foram estatisticamente significantes. No entanto, ressalta-se que o coeficiente β para o DHA era muito reduzido, com valor muito próximo a zero, o que pode não ter relevância clínica nesse caso.

Os polimorfismos dos genes *FADS* nas gestantes também não se associaram com a duração da gestação (**Tabela 5**). Houve tendência de associação negativa

entre os genótipos homozigotos de menor frequência e a duração da gestação, sem significância estatística.

Foi observada interação entre o SNP rs174575 e o consumo de PUFAS na duração da gestação (**Tabela 6**). Em gestantes heterozigotas (CG), o consumo de ALA se associou positivamente e o consumo de LA se associou negativamente com a duração da gestação ($p < 0,05$). Não foi observada interação entre a ingestão materna de PUFAS e genótipos maternos dos SNPs rs174561 e rs3834458 na duração da gestação (dados não mostrados).

DISCUSSÃO

No presente estudo foi observada interação entre consumo alimentar de PUFAS e genótipos maternos do SNP rs174575 na duração da gestação, sem efeitos para as variantes genéticas rs174561 e rs3834458. Nas gestantes heterozigotas (CG) do SNP rs174575, ALA e LA influenciaram a duração da gestação de maneiras opostas; enquanto ALA prolonga a gestação, LA reduz sua duração. Embora, isoladamente, o consumo alimentar e os polimorfismos dos genes *FADS* investigados não tenham apresentado associação estatística com a duração da gestação, eles devem ser considerados, pois interagem e favorecem o resultado obstétrico na medida em que modulam o tempo de gestação.

Vários estudos avaliaram os efeitos dos PUFAS no resultado obstétrico, e mostraram efeitos positivos para os PUFAS da série n-3 no aumento da duração da gestação e na redução do risco de parto prematuro (Kar et al., 2016; Harris et al., 2015; Christian et al., 2016; Chen et al., 2016; Carlson et al., 2013; Ramakrishnan et al., 2010; Van Eijsden et al., 2008; Facchinetti et al., 2005, Smuts et al., 2003, Olsen et al., 1991). Os LCPUFAs n-3, EPA e DHA, metabolizados a partir do ácido graxo essencial ALA, são os que mais se destacaram quanto aos benefícios à saúde materna e da criança nesses estudos.

Dentre os mecanismos biológicos envolvidos na duração da gestação, foi proposto que os LCPUFAs n-6, em especial o ácido araquidônico, promoveriam o aumento da produção de prostaglandinas da série 2, responsáveis pelo início do trabalho de parto por favorecerem o amadurecimento cervical e a contração uterina. Por outro lado, devido à competição enzimática, os LCPUFAs n-3 inibem a produção

de eicosanoides derivados do ácido araquidônico, aumentando as taxas de prostaglandinas e tromboxanos da série ímpar, e prevenindo o parto prematuro (Moltó-Puigmartí et al., 2014; Olsen et al., 1986).

Atualmente, em virtude da existência de contradições nos estudos de associação entre o perfil de LCPUFAs n-3 e n-6 e os resultados obstétricos (Saccone et al., 2016; Stratakis et al., 2014; Dunstan et al., 2008), a influência de fatores genéticos tem sido cada vez mais aceita. A interação gene-nutriente parece explicar a variabilidade dos estudos de associação, já que ambos influenciam as concentrações de LCPUFAs no organismo (Scholtz et al., 2015; Yeates et al., 2015; Al-Hilal et al., 2013; Gillingham et al., 2013, Harsløfet al., 2013). Os efeitos da interação gene-nutriente na saúde humana têm sido observados mais claramente nos indivíduos com o alelo de menor frequência (Mm ou mm), os quais apresentam menor atividade das enzimas dessaturases, e, por isso, costumam se beneficiar da maior ingestão ou suplementação de ALA (Hellstrand et al., 2014; Gillingham et al., 2013; Hellstrand et al., 2012) e, principalmente, de DHA (Gonzalez-Casanova et al., 2016; Scholtz et al., 2015; Moltó-Puigmartí et al., 2014; Al-Hilal et al., 2013).

No presente estudo, o aumento da ingestão de ácido α -linolênico (ALA) favoreceu a ocorrência de gestações mais extensas nas gestantes heterozigotas (CG) do SNP rs174575, enquanto maior ingestão de ácido linoleico (LA) reduziu o tempo de gestação. A possível explicação seria que o ALA em maior concentração compete com o LA na primeira etapa do processo de alongação, favorecendo a síntese de DHA e diminuindo o acúmulo de ácido araquidônico (Park et al., 2016; Hester et al., 2014; Nakamura e Nara, 2003; Los e Murata, 1998). Conseqüentemente, é reduzida a capacidade de síntese de eicosanoides pró-inflamatórios (Hester et al., 2014) e o risco de parto prematuro (Moltó-Puigmartí et al., 2014; Olsen et al., 1986). Gillingham et al. (2013) em um ensaio clínico randomizado crossover com 36 indivíduos hiperlipidêmicos, mostraram que o consumo de dieta rica em ALA, suplementada com óleo de linhaça, estava associado ao aumento de EPA em nos homozigotos para o alelo de menor frequência dos SNPs rs174545, 174537, rs174561 (*FADS1*) e rs174583 (*FADS2*).

Outros estudos também já mostraram efeitos benéficos do maior consumo de ALA no risco cardiovascular por indivíduos que possuíam o alelo de menor frequência (Hellstrand et al., 2014; Hellstrand et al., 2012). Em concordância com a tendência do presente estudo, Hellstrand et al. (2012), em uma coorte prospectiva

na Suíça com 4.635 indivíduos, mostraram que o aumento do consumo da relação ALA/LA elevou as concentrações de HDL em adultos que possuíam o alelo de menor frequência do SNP rs174547 (TC e CC – gene *FADS1*), sem efeitos para os homocigotos para o alelo de maior frequência (TT). Segundo Hellstrand et al., (2014), ainda não está totalmente claro se a concentração de ALA é fator de proteção independente, ou se seu efeito é relativo à sua conversão em LCPUFAs n-3.

A interação gene-nutriente não foi observada nas homocigotas para o alelo de menor frequência (GG) do SNP rs174575 no presente estudo. Uma das hipóteses seria a de que as gestantes heterocigotas podem apresentar melhor atividade enzimática e maior taxa de conversão de ALA em DHA que as gestantes homocigotas para o alelo de menor frequência. Em acordo com essa hipótese, tem sido observado que indivíduos heterocigotos apresentam concentrações intermediárias de substratos e produtos das dessaturases quando comparado com os outros genótipos (Gillingham et al., 2013). Provavelmente, nessas gestantes a redução da atividade enzimática não pode ser compensada pelo aumento do fornecimento de substrato (ALA), as quais seriam mais beneficiadas pelo fornecimento direto de DHA.

Também é possível que a quantidade de PUFAS ingerida pelas gestantes homocigotas para o alelo de menor frequência, mesmo os de cadeia longa DHA, AA e EPA, não seria suficiente para promover efeitos claros na duração da gestação. Nota-se que a maioria dos estudos encontrados avaliaram o efeito da suplementação de DHA nos resultados obstétricos utilizando doses elevadas do nutriente (300 a 600mg/dia) (Kar et al., 2016; Harris et al., 2015; Carlson et al., 2013), superiores às recomendações de ingestão de 200mg/dia de DHA para gestantes (KOLETZKO et al., 2007), já que o consumo de doses maiores de nutrientes facilita a observação dos efeitos nos desfechos.

Até o momento, foi encontrado apenas um trabalho que verificou a interação gene-nutriente na duração da gestação, avaliando o SNP rs174556 (*FADS1*) (Moltó-Puigmartí et al., 2014). Os autores mostraram que o DHA se associou positivamente com a duração da gestação, e LA e AA se associaram negativamente. Além disso, gestantes homocigotas para o alelo de menor frequência (TT) do SNP rs174556 possuíam gestações menores. No entanto, não foi observada interação gene-

nutriente na duração da gestação para essa variante genética (Moltó-puigmartí et al., 2014).

Os resultados do presente estudo apontam para um interessante caminho, à medida que se sugere a interação gene-nutriente no desenvolvimento de determinados fenótipos, e a importância de se considerar aspectos genéticos na formulação de recomendações nutricionais. À luz dos atuais conhecimentos em nutrigenômica, não se pode imaginar que todos os indivíduos apresentem a mesma resposta a uma determinada quantidade de nutriente ingerido. Faz-se, nesse caso, importante conhecer quais as variantes genéticas que realmente influenciam as concentrações de LCPUFAs, e que, assim, merecem atenção quanto ao consumo alimentar. Algumas variantes podem não resultar em diferenças expressivas na atividade enzimática, e não seriam variantes de real interesse.

Não foram encontrados estudos que avaliassem a interação entre os polimorfismos selecionados no presente estudo (rs174575, rs174561, rs3834458) e o consumo de PUFAS na duração da gestação, o que se configura como fator relevante desse estudo. Também podem ser considerados pontos positivos o desenvolvimento de um estudo de coorte prospectivo bem controlado e a qualidade dos dados obtidos por meio de: a) padronização da coleta de dados e da avaliação antropométrica; b) a coleta sanguínea realizada por profissional qualificado; c) utilização de questionário de frequência alimentar nutriente-específico desenvolvido e validado para essa população; e d) a avaliação da ingestão de PUFAS pelo consumo habitual das gestantes, uma vez que a maioria dos estudos de associação utiliza a ingestão de suplementos de DHA ou de óleo de peixe. Dentre as limitações, pode-se citar o delineamento complexo do estudo, a amostra reduzida e a necessidade de deslocamento das participantes para a coleta sanguínea.

Em conclusão, o estudo mostrou que gestantes heterozigotas (CG) para o SNP rs174575 podem se beneficiar da maior ingestão de ALA no aumento do tempo de gestação, enquanto a elevada ingestão de LA exerce efeitos contrários. Não foram observados efeitos dos SNPs rs174561 e rs3834458 ou da ingestão de PUFAS, isoladamente, na duração da gestação. Espera-se que o conhecimento das variantes dos genes *FADS* envolvidos na modulação da duração da gestação em resposta à dieta seja relevante na saúde pública, na medida em que permite a identificação de populações de risco, e possibilita a tomada de decisões no sentido de otimizar o resultado obstétrico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al-Hilal M, Alsaleh A, Maniou Z, Lewis FJ, Hall WL, Sanders TA, O'Dell SD; MARINA study team. Genetic variation at the FADS1-FADS2 gene locus influences delta-5 desaturase activity and LC-PUFA proportions after fish oil supplement. *J Lipid Res.* 2013;54(2):542-51.

Best KP, Gold M, Kennedy D, Martin J, Makrides M. Omega-3 long-chain PUFA intake during pregnancy and allergic disease outcomes in the offspring: a systematic review and meta-analysis of observational studies and randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr.* 2016;103(1):128-43.

Bokor S, Dumont J, Spinneker A, Gonzalez-Gross M, Nova E, Widhalm K, Moschonis G, Stehle P, Amouyel P, De Henauw S, Molnár D, Moreno LA, Meirhaeghe A, Dallongeville J; HELENA Study Group. Single nucleotide polymorphisms in the FADS gene cluster are associated with delta-5 and delta-6 desaturase activities estimated by serum fatty acid ratios. *J Lipid Res.* 2010;51(8):2325-33.

Carlson SE, Colombo J, Gajewski BJ, Gustafson KM, Mundy D, Yeast J, Georgieff MK, Markley LA, Kerling EH, Shaddy DJ. DHA supplementation and pregnancy outcomes. *Am J Clin Nutr.* 2013;97(4):808-15.

Chaddha A, Eagle KA. Cardiology Patient Page. Omega-3 Fatty Acids and Heart Health. *Circulation.* 2015 Dec 1;132(22):e350-2.

Chen B, Ji X, Zhang L, Hou Z, Li C, Tong Y. Fish oil supplementation improves pregnancy outcomes and size of the newborn: a meta-analysis of 21 randomized controlled trials. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2016;29(12):2017-27.

Christian LM, Blair LM, Porter K, Lower M, Cole RM, Belury MA. Polyunsaturated Fatty Acid (PUFA) Status in Pregnant Women: Associations with Sleep Quality, Inflammation, and Length of Gestation. *PLoS One.* 2016;11(2):e0148752.

Dirix CE, Kester AD, Hornstra G. Associations between term birth dimensions and prenatal exposure to essential and trans fatty acids. *Early Hum Dev.* 2009;85(8):525-30.

Dunstan JA, Simmer K, Dixon G, Prescott SL. Cognitive assessment of children at age 2(1/2) years after maternal fish oil supplementation in pregnancy: a randomised controlled trial. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2008;93(1):F45-50.

Facchinetti F, Fazio M, Venturini P. Polyunsaturated fatty acids and risk of preterm delivery. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2005;9(1):41-8.

Gillingham LG, Harding SV, Rideout TC, Yurkova N, Cunnane SC, Eck PK, Jones PJ. Dietary oils and FADS1-FADS2 genetic variants modulate [¹³C]α-linolenic acid metabolism and plasma fatty acid composition. *Am J Clin Nutr.* 2013;97(1):195-207.

Glaser C, Lattka E, Rzehak P, Steer C, Koletzko B. Genetic variation in polyunsaturated fatty acid metabolism and its potential relevance for human development and health. *Matern Child Nutr.* 2011;7 Suppl 2:27-40.

Gonzalez-Casanova I, Rzehak P, Stein AD, Garcia Feregrino R, Dommarco JA, Barraza-Villarreal A, Demmelmair H, Romieu I, Villalpando S, Martorell R, Koletzko B, Ramakrishnan U. Maternal single nucleotide polymorphisms in the fatty acid desaturase 1 and 2 coding regions modify the impact of prenatal supplementation with DHA on birth weight. *Am J Clin Nutr.* 2016;103(4):1171-8.

Gunaratne AW, Makrides M, Collins CT. Maternal prenatal and/or postnatal n-3 long chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) supplementation for preventing allergies in early childhood. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015;(7):CD010085.

Hanebutt FL, Demmelmair H, Schiessl B, Larqué E, Koletzko B. Long-chain polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA) transfer across the placenta. *Clin Nutr.* 2008;27(5):685-93.

Harris MA, Reece MS, McGregor JA, Wilson JW, Burke SM, Wheeler M, Anderson JE, Auld GW, French JI, Allen KG. The Effect of Omega-3 Docosahexaenoic Acid Supplementation on Gestational Length: Randomized Trial of Supplementation Compared to Nutrition Education for Increasing n-3 Intake from Foods. *Biomed Res Int.* 2015;2015:123078.

Harsløf LB, Larsen LH, Ritz C, Hellgren LI, Michaelsen KF, Vogel U, Lauritzen L. FADS genotype and diet are important determinants of DHA status: a cross-sectional study in Danish infants. *Am J Clin Nutr.* 2013;97(6):1403-10.

Hellstrand S, Ericson U, Gullberg B, Hedblad B, Orho-Melander M, Sonestedt E. Genetic variation in FADS1 has little effect on the association between dietary PUFA intake and cardiovascular disease. *J Nutr.* 2014;144(9):1356-63.

Hester AG, Murphy RC, Uhlson CJ, Ivester P, Lee TC, Sergeant S, Miller LR, Howard TD, Mathias RA, Chilton FH. Relationship between a common variant in the fatty acid desaturase (FADS) cluster and eicosanoid generation in humans. *J Biol Chem.* 2014;289(32):22482-9.

Hidaka A, Shimazu T, Sawada N, Yamaji T, Iwasaki M, Sasazuki S, Inoue M, Tsugane S; Japan Public Health Center-based Prospective Study Group. Fish, n-3 PUFA intake, and pancreatic cancer risk in Japanese: a large, population-based, prospective cohort study. *Am J Clin Nutr.* 2015;102(6):1490-7.

Innis SM. Dietary (n-3) fatty acids and brain development. *J Nutr.* 2007;137(4):855-9.

Innis SM. Impact of maternal diet on human milk composition and neurological development of infants. *Am J Clin Nutr.* 2014;99(3):734S-41S.

Jelliffe, DB. Evaluación del estado de nutrición de la comunidad. Ginebra: Organización Mundial de La Salud; 1968.

Kar S, Wong M, Rogozinska E, Thangaratinam S. Effects of omega-3 fatty acids in prevention of early preterm delivery: a systematic review and meta-analysis of randomized studies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2016;198:40-6.

Koletzko B, Lattka E, Zeilinger S, Illig T, Steer C. Genetic variants of the fatty acid desaturase gene cluster predict amounts of red blood cell docosahexaenoic and other polyunsaturated fatty acids in pregnant women: findings from the Avon Longitudinal Study of Parents and Children. *Am J Clin Nutr.* 2011;93(1):211-9.

Koletzko B1, Cetin I, Brenna JT; Perinatal Lipid Intake Working Group; Child Health Foundation; Diabetic Pregnancy Study Group; European Association of Perinatal Medicine; European Association of Perinatal Medicine; European Society for Clinical Nutrition and Metabolism; European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition, Committee on Nutrition; International Federation of Placenta Associations; International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids. Dietary fat intakes for pregnant and lactating women. *Br J Nutr.* 2007;98(5):873-7.

Lattka E, Illig T, Heinrich J, Koletzko B. Do FADS genotypes enhance our knowledge about fatty acid related phenotypes? *Clin Nutr.* 2010;29(3):277-87.

Liu X, Wang G, Hong X, Tsai HJ, Liu R, Zhang S, Wang H, Pearson C, Ortiz K, Wang D, Hirsch E, Zuckerman B, Wang X. Associations between gene polymorphisms in fatty acid metabolism pathway and preterm delivery in a US urban black population. *Hum Genet.* 2012;131(3):341-51.

Los DA, Murata N. Structure and expression of fatty acid desaturases. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1394(1):3-15.

Marquardt A, Stöhr H, White K, Weber BH. cDNA cloning, genomic structure, and chromosomal localization of three members of the human fatty acid desaturase family. *Genomics.* 2000;66(2):175-83.

Mirmiran P, Esfahani FH, Mehrabi Y, Hedayati M, Azizi F. Reliability and relative validity of an FFQ for nutrients in the Tehran lipid and glucose study. *Public Health Nutr.* 2010;13(5):654-62.

Moltó-Puigmartí C, Plat J, Mensink RP, Müller A, Jansen E, Zeegers MP, Thijs C. FADS1 FADS2 gene variants modify the association between fish intake and the docosahexaenoic acid proportions in human milk. *Am J Clin Nutr.* 2010;91(5):1368-76.

Moltó-Puigmartí C, van Dongen MC, Dagnelie PC, Plat J, Mensink RP, Tan FE, Heinrich J, Thijs C. Maternal but not fetal FADS gene variants modify the association between maternal long-chain PUFA intake in pregnancy and birth weight. *J Nutr.* 2014;144(9):1430-7.

Mumford SL, Chavarro JE, Zhang C, Perkins NJ, Sjaarda LA, Pollack AZ, Schliep KC, Michels KA, Zarek SM, Plowden TC, Radin RG, Messer LC, Frankel RA, Wactawski-Wende J. Dietary fat intake and reproductive hormone concentrations and ovulation in regularly menstruating women. *Am J Clin Nutr.* 2016;103(3):868-77.

Nakamura MT, Nara TY. Essential fatty acid synthesis and its regulation in mammals. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2003;68(2):145-50.

Nepa – Unicamp. Tabela brasileira de composição de alimentos / NEPA – UNICAMP - 4. ed. rev. e ampl. Campinas: NEPAUNICAMP; 2011.

Noakes PS, Vlachava M, Kremmyda LS, Diaper ND, Miles EA, Erlewyn-Lajeunesse M, Williams AP, Godfrey KM, Calder PC. Increased intake of oily fish in pregnancy: effects on neonatal immune responses and on clinical outcomes in infants at 6 mo. *Am J Clin Nutr.* 2012;95(2):395-404.

Olsen SF, Hansen HS, Sommer S, Jensen B, Sørensen TI, Secher NJ, Zachariassen P. Gestational age in relation to marine n-3 fatty acids in maternal erythrocytes: a study of women in the Faroe Islands and Denmark. *Am J Obstet Gynecol.* 1991;164(5 Pt 1):1203-9.

Olsen SF, Hansen HS, Sørensen TI, Jensen B, Secher NJ, Sommer S, Knudsen LB. Intake of marine fat, rich in (n-3)-polyunsaturated fatty acids, may increase birthweight by prolonging gestation. *Lancet.* 1986;2(8503):367-9.

Park HG, Kothapalli KS, Park WJ, DeAllie C, Liu L, Liang A, Lawrence P, Brenna JT. Palmitic acid (16:0) competes with omega-6 linoleic and omega-3 α -linolenic acids for FADS2 mediated $\Delta 6$ -desaturation. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1861(2):91-7.

Ramakrishnan U, Stein AD, Parra-Cabrera S, Wang M, Imhoff-Kunsch B, Juárez-Márquez S, Rivera J, Martorell R. Effects of docosahexaenoic acid supplementation during pregnancy on gestational age and size at birth: randomized, double-blind, placebo-controlled trial in Mexico. *Food Nutr Bull.* 2010;31(2 Suppl):S108-16.

Rzehak P, Thijs C, Standl M, Mommers M, Glaser C, Jansen E, Klopp N, Koppelman GH, Singmann P, Postma DS, Sausenthaler S, Dagnelie PC, van den Brandt PA, Koletzko B, Heinrich J; KOALA study group; LISA study group. Variants of the FADS1 FADS2 gene cluster, blood levels of polyunsaturated fatty acids and eczema in children within the first 2 years of life. *PLoS One.* 2010;5(10):e13261.

Saccone G, Saccone I, Berghella V. Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and fish oil supplementation during pregnancy: which evidence? *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2016;29(15):2389-97.

Scholtz SA, Kerling EH, Shaddy DJ, Li S, Thodosoff JM, Colombo J, Carlson SE. Docosahexaenoic acid (DHA) supplementation in pregnancy differentially modulates arachidonic acid and DHA status across FADS genotypes in pregnancy. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2015;94:29-33.

Smuts CM, Huang M, Mundy D, Plasse T, Major S, Carlson SE. A randomized trial of docosahexaenoic acid supplementation during the third trimester of pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2003;101(3):469-79.

Stratakis N, Gielen M, Chatzi L, Zeegers MP. Effect of maternal n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation during pregnancy and/or lactation on adiposity in childhood: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur J Clin Nutr.* 2014;68(12):1277-87.

Tintle NL, Pottala JV, Lacey S, Ramachandran V, Westra J, Rogers A, Clark J, Olthoff B, Larson M, Harris W, Shearer GC. A genome-wide association study of saturated, mono- and polyunsaturated red blood cell fatty acids in the Framingham Heart Offspring Study. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2015;94:65-72.

Tu WC, Cook-Johnson RJ, James MJ, Mühlhäusler BS, Gibson RA. Omega-3 long chain fatty acid synthesis is regulated more by substrate levels than gene expression. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2010;83(2):61-8.

Umemoto N, Ishii H, Kamoi D, Aoyama T, Sakakibara T, Takahashi H, Tanaka A, Yasuda Y, Suzuki S, Matsubara T, Murohara T. Reverse association of omega-3/omega-6 polyunsaturated fatty acids ratios with carotid atherosclerosis in patients on hemodialysis. *Atherosclerosis.* 2016;249:65-9.

Usda. U.S. Department of Agriculture; Agricultural Research Service. 2014. USDA National Nutrient Database for Standard Reference; Release 27. Nutrient Data Laboratory Home Page; <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl> [acessado em 08 jul 2014].

van Eijsden M, Hornstra G, van der Wal MF, Vrijkotte TG, Bonnel GJ. Maternal n-3, n-6, and trans fatty acid profile early in pregnancy and term birth weight: a prospective cohort study. *Am J Clin Nutr.* 2008;87(4):887-95.

Wang L, Athinarayanan S, Jiang G, Chalasani N, Zhang M, Liu W. Fatty acid desaturase 1 gene polymorphisms control human hepatic lipid composition. *Hepatology.* 2015;61(1):119-28.

Xie L, Innis SM. Genetic variants of the FADS1 FADS2 gene cluster are associated with altered (n-6) and (n-3) essential fatty acids in plasma and erythrocyte

phospholipids in women during pregnancy and in breast milk during lactation. *J Nutr.* 2008;138(11):2222-8.

Yeates AJ, Love TM, Engström K, Mulhern MS, McSorley EM, Grzesik K, Alhamdow A, Wahlberg K, Thurston SW, Davidson PW, van Wijngaarden E, Watson GE, Shamlaye CF, Myers GJ, Strain JJ, Broberg K. Genetic variation in FADS genes is associated with maternal long-chain PUFA status but not with cognitive development of infants in a high fish-eating observational study. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2015;102-103:13-20.

Zeng P, Zhao Y, Qian C, Zhang L, Zhang R, Gou J, Liu J, Liu L, Chen F. Statistical analysis for genome-wide association study. *J Biomed Res.* 2015;29(4):285-97.

Zhao JP, Levy E, Fraser WD, Julien P, Delvin E, Montoudis A, Spahis S, Garofalo C, Nuyt AM, Luo ZC. Circulating docosahexaenoic acid levels are associated with fetal insulin sensitivity. *PLoS One.* 2014;9(1):e85054.

Ziegler A, König IR, Thompson JR. Biostatistical aspects of genome-wide association studies. *Biom J.* 2008;50(1):8-28.

TABELAS

Tabela 1 – Características das gestantes e dos recém-nascidos da amostra (n = 250), Bahia, Brasil, 2016

Variável	Valor
Características Maternas	
Idade (anos)	27,24 ± 6,01
Cor	
- Negras	105 (42%)
- Pardas	105 (42%)
- Brancas	25 (10%)
- Outros	15 (6%)
Escolaridade (anos)	4,62 ± 1,53
-Ensino médio	208 (83,2%)
-Ensino fundamental	42 (16,8%)
Classe socioeconômica (n=244)	
-A	2 (0,8%)
-B	39 (15,6%)
-C	155 (62%)
-D	46 (18,4%)
-E	2 (0,8%)
Tabagismo, sim:não	18 (7,2%) : 232 (92,8%)
Consumo de álcool, sim:não	21 (8,4%) : 229 (91,6%)
Peso (Kg)	67,17 ± 12,82
Estatura (m)	1,61 ± 0,06
IMC (kg/m ²)	26,07 ± 5,01
IMC pré-gestacional (kg/m ²)	24,17 ± 4,90
Primigesta (n=249)	106 (42,4%)
Número de gestações	0,96 ± 1,14
Idade gestacional (semanas) (n=243)	19,79 ± 7,18
Ingestão de n-3 PUFA	
- ALA (g/dia)	1,87 ± 0,87
- EPA (mg/dia)	65,58 ± 73,12

Continua...

continuação...

- DHA (mg/dia)	209,88 ± 211,72
Ingestão de n-6 PUFA	
- LA (g/dia)	18,21 ± 8,77
- AA (mg/dia)	186,23 ± 283,09

Características da criança ao nascer

Sexo, fem:masc	134 (53,6%) : 116 (46,4%)
Idade Gestacional (semanas)	38,60 ± 1,96
Peso (g)	3324,06 ± 494,60

IMC = Índice de Massa Corporal. n-3 PUFA = Ácidos graxos poli-insaturados da série ômega 3. ALA = Ácido α -linolênico (18:3; n-3). EPA = Ácido Eicosapentaenoico (20:5; n-3). DHA = Ácido docosahexaenoico (22:6; n-3). n-6 PUFA = Ácidos graxos poli-insaturados da série n-6. LA = Ácido linoleico (18:2; n-6). AA = Ácido araquidônico (20:4 n-6). Fem = feminino. Masc = masculino.

Tabela 2 – Características dos três polimorfismos dos genes das dessaturases (*FADS*) da amostra de gestantes (n = 250)

SNP	Gene	Alelo	Genótipo			MAF %	HWE P ¹
			M/m	MM	Mm		
rs174575	<i>FADS2</i>	C/G	CC 124 (49,6%)	CG 108 (43,2%)	GG 18 (7,2%)	28,8	0,445
rs174561	<i>FADS1</i> intron1	T/C	TT 154 (61,6%)	TC 82 (32,8%)	CC 14 (5,6%)	22,0	0,463
rs3834458	Intergênico (<i>FADS2</i>)	T/Del	TT 147 (58,8%)	TDel 87 (34,8%)	DelDel 16 (6,4%)	23,8	0,727

SNP = Polimorfismo de nucleotídeo único. MM = Homozigoto de maior frequência. Mm = Heterozigoto. Mm = homozigoto de menor frequência. MAF = Menor Frequência Alélica. HWE = Equilíbrio de Hardy-Weingberg. Del = Deleção.

¹ Derivado do Teste Qui-quadrado do Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Tabela 3 – Ingestão materna de ácidos graxos poli-insaturados segundo polimorfismos dos genes das dessaturases (*FADS*) (n = 250)

Ingestão alimentar	rs174575				rs174561				rs3834458			
	MM	Mm	mm	P value*	MM	Mm	mm	P value*	MM	Mm	mm	P value
LA (g)	19,88	17,58	15,80	0,135	20,05 ^a	16,17 ^b	16,67 ^{a,b}	0,022	20,14 ^a	16,33 ^b	16,66 ^{a,b}	0,023
AA (mg)	187,41	186,76	174,94	0,985	184,51	182,20	228,79	0,845	188,60	177,43	212,38	0,892
ALA (g)	2,03	1,81	1,63	0,175	1,99	1,78	1,80	0,341	2,02	1,76	1,72	0,191
EPA (mg)	48,63	33,66	30,12	0,065	45,02	34,22	31,17	0,188	45,95	34,25	32,07	0,223
DHA (mg)	230,08	195,98	154,11	0,242	227,28	185,20	163,07	0,243	228,18	184,36	180,5	0,264

MM = Homozigoto de maior frequência. Mm = Heterozigoto. mm = homozigoto de menor frequência. LA: Ácido linoleico (18:2; n-6). AA = Ácido araquidônico (20:4; n-6). ALA = Ácido α -linolênico (18:3; n-3). EPA = Ácido Eicosapentaenoico (20:5; n-3); DHA = Ácido docosa-hexaenoico – (22:6; n-3).

* ANOVA One Way. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey (p < 0,05).

Tabela 4 – Análise de regressão linear múltipla da associação entre ingestão materna de ácidos graxos poli-insaturados e duração da gestação¹ (n = 250)

	Duração da gestação		
	Coefficiente B	95% IC	P value
Ingestão de ALA (g/dia)	0,07	-0,36; 0,50	0,755
Ingestão de EPA (mg/dia)	0,002	-0,0016; 0,0066	0,238
Ingestão de DHA (mg/dia)	-0,000055	-0,0017; 0,0016	0,946
Ingestão de LA (g/dia)	-0,014	-0,06; 0,03	0,559
Ingestão de AA (mg/dia)	-0,001	-0,002; 0,0004	0,267

¹Ajustado para variáveis maternas (idade, escolaridade, cor, IMC pré-gestacional, número de gestações, ingestão de bebida alcoólica e tabagismo durante a gestação) e sexo da criança.

ALA = Ácido α -linolênico (18:3; n-3). EPA = Ácido Eicosapentaenoico (20:5; n-3); DHA = Ácido docosa-hexaenoico – (22:6; n-3). LA: Ácido linoleico (18:2; n-6). AA = Ácido araquidônico (20:4; n-6).

Tabela 5 - Análise de regressão linear múltipla da associação entre polimorfismos dos genes das dessaturases (*FADS*) em gestantes e duração da gestação¹ (n = 250)

	Duração da gestação		
	Coeficiente B	95% IC	P value
<i>rs174575 (C/G) – FADS2</i>			
GG vs CC	-0,17	-1,17; 0,83	0,742
CG vs CC	0,09	-0,43; 0,61	0,741
<i>rs174561 (T/C) – FADS1</i>			
CC vs TT	-0,67	-1,78; 0,45	0,242
TC vs TT	0,21	-0,33; 0,76	0,445
<i>rs3834458 (T/Del) – FADS2</i>			
DelDel vs TT	-0,95	-1,99; 0,09	0,072
TDel vs TT	0,29	-0,24; 0,82	0,282

¹ Ajustado para variáveis maternas (ingestão de ALA, ingestão de EPA, ingestão de DHA, escolaridade, número de gestações, ingestão de bebida alcoólica na gestação, idade, tabagismo durante a gestação, cor, IMC pré-gestacional) e sexo da criança.

Tabela 6 – Interação gene-nutriente entre genótipos maternos do SNP rs174575 (*FADS2*) e ingestão de PUFA's na duração da gestação¹

	Duração da gestação		
	Coeficiente B	95% IC	P value
rs174575; GG vs CC	3,06	-0,62; 6,73	0,102
rs174575; CG vs CC	-0,05	-1,25; 1,15	0,938
Ingestão de ALA	-0,25	-0,75; 0,24	0,314
Ingestão de EPA	-0,004	-0,00;0,01	0,132
Ingestão de DHA	0,0002	-0,002; 0,001	0,843
Ingestão de LA	-0,029	-0,027; 0,086	0,299
Ingestão de AA	-0,001	-0,003; 0,000	0,088
Ingestão de ALA x genótipo (GG vs CC)	-2,835	-8,067; 2,396	0,287
Ingestão de ALA x genótipo (CG vs CC)	1,378	0,439; 2,317	0,004
Ingestão de EPA x genótipo (GG vs CC)	0,004	-0,028; 0,035	0,821
Ingestão de EPA x genótipo (CG vs CC)	-0,005	-0,014; 0,004	0,322
Ingestão de DHA x genótipo (GG vs CC)	-0,0003	-0,016; 0,015	0,973
Ingestão de DHA x genótipo (CG vs CC)	0,001	-0,002; 0,005	0,483
Ingestão de LA x genótipo (GG vs CC)	0,04	-0,591; 0,678	0,893
Ingestão de LA x genótipo (CG vs CC)	-0,14	-0,242; -0,041	0,006
Ingestão de AA x genótipo (GG vs CC)	0,003	-0,003; 0,010	0,271
Ingestão de AA x genótipo (CG vs CC)	0,00099	-0,001; 0,003	0,351

¹ Coeficiente de regressão linear ajustado para variáveis maternas (idade, escolaridade, cor, IMC pré-gestacional, número de gestações, ingestão de bebida alcoólica e tabagismo durante a gestação) e sexo da criança,

ALA = Ácido α -linolênico (18:3; n-3). EPA = Ácido Eicosapentaenoico (20:5; n-3); DHA = Ácido docosa-hexaenoico – (22:6; n-3). LA: Ácido linoleico (18:2; n-6). AA = Ácido araquidônico (20:4; n-6).

FIGURAS

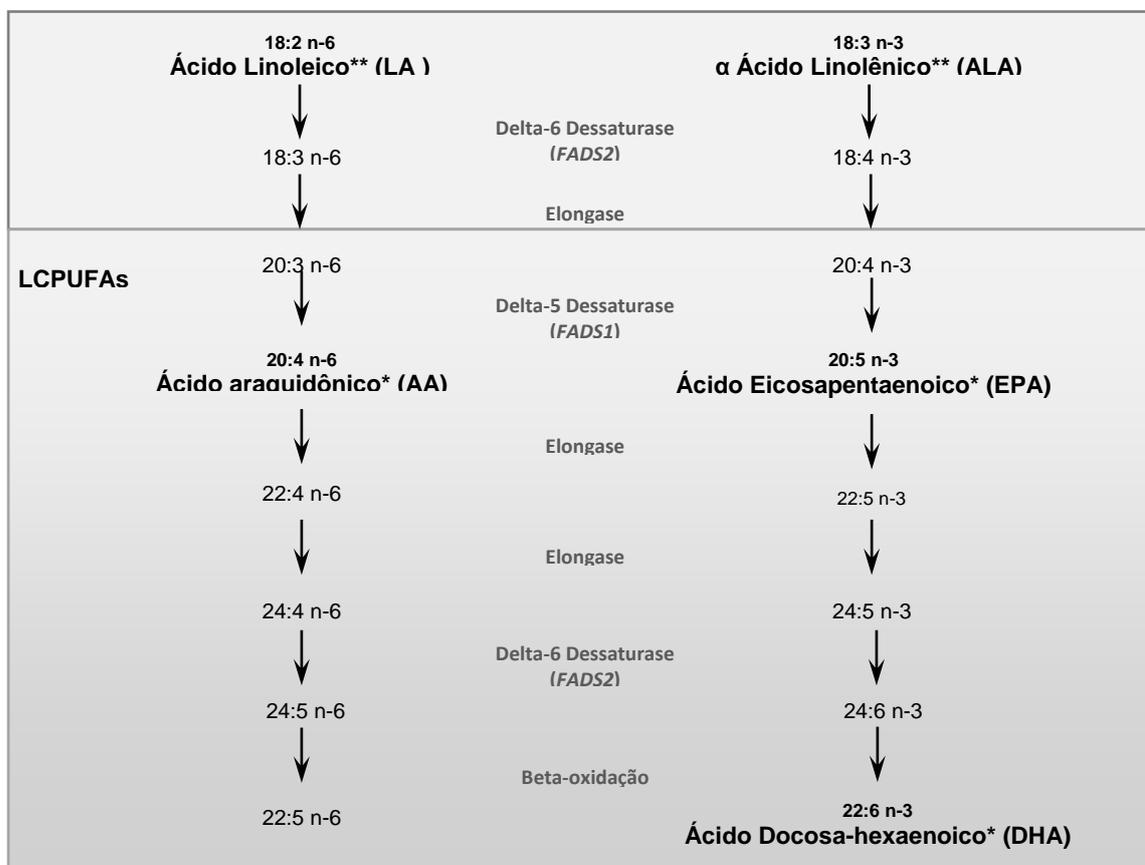


Figura 1. Representação esquemática da rota metabólica dos ácidos graxos poli-insaturados das séries ômega-3 e ômega-6 em humanos

* Forma ativa. ** Forma dietética.

LCPUFAs = Ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa.

Fonte: Lattka et al. (2010); Gonzalez-Casanova et al. (2016) – adaptado

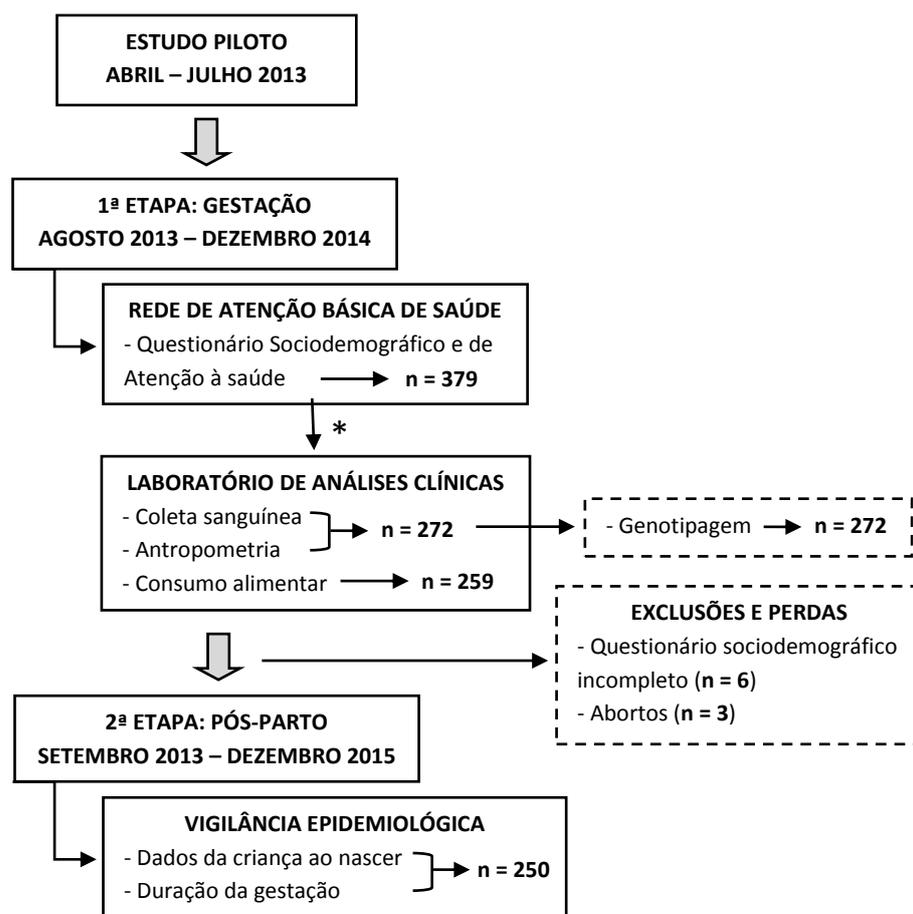


Figura 2: Fluxograma do desenho do estudo e da adesão na pesquisa conduzida com gestantes adultas atendidas no serviço público de saúde pré-natal de Santo Antônio de Jesus, Bahia, Brasil, 2016

* Perdas: Desistiu de participar; não compareceu à coleta sanguínea; atingiu mais de 34 semanas gestacionais no momento da coleta sanguínea; mudou de cidade; aborto; gestação múltipla (confirmado em USG).

6.4 Manuscrito 4

CONSUMO DE ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS E POLIMORFISMOS DOS GENES *FADS1* E *FADS2* EM GESTANTES: EXISTE INTERAÇÃO GENE-NUTRIENTE NO PESO AO NASCER?

RESUMO

A ingestão e o status maternos de DHA têm sido associados positivamente com o peso da criança ao nascer. Considerando que essa relação parece ser modulada por variantes nos genes *FADS* em gestantes, foi objetivo avaliar a interação entre os polimorfismos dos genes *FADS* maternos e a ingestão de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAS) n-3 e n-6 durante a gestação na modulação do peso ao nascer. Três SNPs do agrupamento *FADS* (*FADS1*: rs174561; *FADS2*: rs174575; Intergênico – *FADS2*: rs3834458) foram genotipados em 250 gestantes de uma coorte prospectiva brasileira, utilizando ensaios TaqMan. Questionário de frequência de alimentar foi utilizado para avaliar a ingestão de PUFAS. A interação gene-nutriente foi analisada por meio de regressão linear, ajustada para co-variáveis. Gestantes heterozigotas dos polimorfismos rs174561 e rs3834455 apresentavam menor ingestão de LA. Houve tendência de associação positiva entre ingestão de ALA e DHA e peso ao nascer, e tendência de associação negativa para EPA, LA e AA. Ao contrário dos outros dois SNPs que apresentaram tendência negativa, gestantes homozigotas para o alelo de menor frequência (DelDel) para o SNP rs3834458 apresentaram tendência de associação positiva com o peso ao nascer. Não foi observada interação gene-nutriente no peso da criança ao nascer para os três polimorfismos avaliados. Os resultados indicam ausência de interação gene-nutriente no peso da criança ao nascer, possivelmente como consequência da insuficiente ingestão de PUFAS pelas gestantes que carregavam o alelo de menor frequência. Sugere-se que a influência dos genótipos *FADS* na percepção gustativa e na preferência de alimentos fontes de lipídeos seja investigada.

Palavras-chave: Gestantes. Polimorfismo genético. Ácidos graxos insaturados. Peso ao Nascer. Nutrigenômica.

INTRODUÇÃO

O ácido docosa-hexaenoico (DHA; 22:6n-3), principal ácido graxo poli-insaturado de cadeia longa (LCPUFA) da série ômega 3 (n-3), desempenha importante função no período intrauterino, tendo sido associado com o desenvolvimento cerebral e da retina (Innis, 2014; Innis, 2007), diminuição da resistência insulínica fetal (Zhao et al., 2014), maior duração da gestação (Christian et al., 2016; Chen et al., 2016; Carlson et al., 2013) e maior crescimento somático (Kar et al., 2016; Harris et al., 2015; Carlson et al., 2013). Por outro lado, o ácido araquidônico (AA; 20:4n-6), principal LCPUFA da série ômega 6 (n-6), exerce efeitos contrários, influenciando negativamente a saúde da criança (Vidakovic et al., 2015; Moltó-Puigmartí et al., 2014; Bernard et al., 2013). Os ácidos graxos das séries n-3 e n-6 competem pelas mesmas enzimas no metabolismo de LCPUFAs (Park et al., 2016; Hester et al., 2014; Nakamura e Nara, 2003; Los e Murata, 1998), o que explica o aparente mecanismo de feedback negativo dose-dependente entre eles (Scholtz et al., 2015).

Olsen et al. (1986) propuseram o efeito protetor do alto consumo materno de alimentos ricos em DHA no peso ao nascer, o que foi confirmado por vários estudos posteriores sobre ingestão e/ou perfil maternos de DHA (Gould et al., 2016; Kar et al., 2016; GUNARATNE et al., 2015; Harris e Baack, 2015; Moltó-Puigmartí et al., 2014; Zhao et al., 2014; Carlson et al., 2013), mas com resultados contraditórios ou insuficientes em outros (Harris et al., 2015; Saccone et al., 2015; Carlsen et al., 2013; Heppe et al., 2011; Helland et al., 2001). Atualmente, sugere-se que polimorfismos nos genes *FADS* poderiam modular essa relação, uma vez que esses genes codificam as enzimas delta-5 e delta-6 dessaturases (**Figura 1**) (Gonzalez-Casanova et al., 2016; Moltó-Puigmartí et al., 2014). De modo geral, indivíduos contendo um ou dois alelos de menor frequência apresentam baixa atividade das dessaturases e, por consequência, menor conversão dos ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) de 18C, ácido linoleico (LA) e ácido alfa-linolênico (ALA), nos seus produtos de 20C, AA e DHA, respectivamente (Wang et al., 2015; Tintle et al., 2015; Glaser et al., 2011; Koletzko et al., 2011).

Estudos já demonstraram que as variantes dos genes *FADS* e a ingestão de PUFAS interagem e modulam o perfil de LCPUFAs no organismo (Scholtz et al., 2015; Al-Hilal et al., 2013; Gillingham et al., 2013; Harsløf et al., 2013; Cormier et al.,

2012; Hellstrand et al., 2012; Moltó-Puigmartí et al., 2010) as concentrações de lipídeos séricos (Hellstrand et al., 2012; Standl et al., 2012; Lu et al., 2010), o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Hellstrand et al., 2014) e o quociente de inteligência de crianças (Steer et al., 2013). Entretanto, pouco se sabe sobre a modulação dos polimorfismos dos genes *FADS* em gestantes na relação entre ingestão materna de PUFAS e peso da criança ao nascer (Gonzalez-Casanova et al., 2016; Moltó-Puigmartí et al., 2014).

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a) a associação entre o consumo de PUFAS durante a gestação e o peso da criança ao nascer; b) a associação entre polimorfismos maternos dos genes *FADS* e peso da criança ao nascer; e c) a interação entre o consumo de PUFAS durante a gestação e os genótipos maternos *FADS* (interação gene-nutriente) na modulação do peso da criança ao nascer.

MATERIAIS E MÉTODOS

População de estudo

No período de agosto de 2013 a dezembro de 2014, as gestantes da coorte do Núcleo de Investigação em Saúde Materno Infantil (NISAMI) foram convidadas a participar do presente estudo, cujas avaliações adicionais incluíram coleta sanguínea e avaliação do consumo alimentar. A coorte de gestantes do NISAMI (Núcleo de Investigação em Saúde Materno Infantil), desenvolvida entre 2009 e 2016, teve como objetivo avaliar fatores determinantes da saúde de gestantes e crianças da zona urbana de Santo Antônio de Jesus, Bahia, Brasil.

Foram incluídas gestantes com idade superior a 18 anos e idade gestacional menor ou igual a 34 semanas no momento da coleta sanguínea, e excluídas as mulheres com gestação múltipla, HIV positivas, com doenças contagiosas, imunológicas e metabólicas, e as que consumiam dieta VEGAN.

A aprovação ética para o desenvolvimento do estudo foi obtido pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), número do parecer: 241.225 de 09/04/2013. Todas as participantes foram informadas dos objetivos do estudo e assinaram o termo de consentimento escrito.

Coleta de dados

Após realização de estudo piloto, a coleta de dados ocorreu em duas etapas (**Figura 2**). A **primeira etapa** ocorreu durante a gestação nas unidades de saúde, com aplicação de questionário sócio-demográfico, de saúde e obstétrico, e no laboratório de análises clínicas da cidade, onde foi realizada avaliação antropométrica e coleta sanguínea. A **segunda etapa** ocorreu no Departamento de Vigilância Epidemiológica (VIEP) da Secretaria Municipal de Saúde, onde foram obtidos os dados ao nascer da criança. Quando os dados da criança ao nascer não foram encontrados no VIEP, foram realizadas visitas domiciliares às gestantes.

Características maternas e Ingestão de PUFAS

Um questionário estruturado foi aplicado durante a gestação para obtenção das características sociodemográficas, potenciais determinantes não-genéticos e possíveis fatores de confusão do resultado obstétrico. As medidas antropométricas maternas foram aferidas em triplicata, seguindo protocolos recomendados por Jelliffe (1968).

Para determinação do consumo de ácidos graxos pela gestante, foi construído e validado um Questionário de Frequência de Consumo (QFA) semiquantitativo nutriente-específico, contendo as principais fontes de PUFAS. Por meio da estimativa da frequência de consumo e do número de porções consumidas por vez, foi estimada a quantidade de alimento ingerido por dia, em gramas. Para os cálculos, foi utilizada a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO) (NEPA – UNICAMP, 2011) ou a Tabela de Composição de Alimentos da USDA (USDA, 2014), quando um alimento ou nutriente não era encontrado na TACO. A estimativa de nutrientes das preparações foi realizada de acordo com cada ingrediente presente, individualmente (Mirmiran et al., 2010).

Análises genéticas

A extração do DNA genômico foi realizada no Laboratório de Genética Humana da UFRB, no período máximo de até 72 horas após a coleta sanguínea, utilizando o buffy coat das amostras sanguíneas. O DNA foi extraído, por meio do uso do kit de extração da Qiagen®, FlexiGene® DNA Kit (250), e armazenado a -20°C até o momento das análises.

No Núcleo de Genética Humana e Molecular da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Vitória-ES, Brasil, as amostras foram genotipadas, utilizando ensaios TaqMan® pré-desenhados (rs174575 – *FADS2*; e rs174561 – *FADS1*) e customizado (rs3834458 – *FADS2*), com as condições de termociclagem indicadas pelo fabricante. Os três SNPs foram selecionados por estarem relacionados com as concentrações de LCPUFAs em crianças e gestantes (Koletzko et al., 2011; Moltó-Puigmartí et al 2010; Rzehak et al., 2010; Xie e Innis, 2008).

Os seguintes primers e sondas foram utilizados para o SNP rs3834458: Primers (5'–3') forward AGAGCAGAGGTTCCGCAATT e reverse GCCTTGGATTAGAGGGCTTTGAA e Sondas (5'–3') alelo T VIC/TCAGACAATCTTAGAAAAG-NFQ e alelo Del FAM/TCAGACAATCTTGAAAAG-NFQ. Controles negativos e positivos foram incluídos em cada reação para controle de qualidade e avaliação da reprodutibilidade da genotipagem.

Peso ao nascer

As medidas antropométricas da criança ao nascer foram aferidas pela equipe de enfermagem do Hospital Maternidade de Santo Antônio de Jesus, Bahia, Brasil, após treinamento realizado por profissionais do NISAMI. Para garantir a utilização de um instrumento com boa precisão e acurácia, no hospital-maternidade foi utilizada balança eletrônica pediátrica doada pelo NISAMI.

O peso da criança ao nascer foi obtido no Departamento de Vigilância Epidemiológica (VIEP) da Secretaria Municipal de Saúde. Visitas domiciliares foram realizadas ao final do estudo para aquelas gestantes cujos dados dos desfechos não foram encontrados no VIEP.

Análise estatística

Os dados foram digitados no programa Epidata e os dados analisados no software Stata versão 14. Na análise exploratória, as variáveis categóricas foram apresentadas como frequências absoluta e relativa. As variáveis discretas e contínuas foram descritas como média \pm DP. As variáveis que apresentaram dados com distribuição assimétrica, avaliado pelo teste de Kolmogorov-Smirnov ou por meio de gráficos de dispersão e histograma, sofreram transformação logarítmica.

A frequência genotípica e a menor frequência alélica (MAF) foram calculadas. Foram considerados raros SNPs que apresentem frequência alélica entre 1% e 5% na população, os quais devem ser excluídos a fim de evitar a diminuição do poder das análises estatísticas (Zeng et al., 2015; Ziegler et al., 2008). A distribuição dos genótipos foi testada para o equilíbrio de Hardy-Weinberg utilizando-se o teste qui-quadrado ($p > 0,05$). Gestantes homocigotas para o alelo de maior frequência (MM) foram codificadas como 1, as heterocigotas (Mm) 2, e as homocigotas para o alelo de menor frequência (mm) como 3.

Anova one way foi utilizada para comparar as médias de consumo de PUFAS segundo os genótipos. A associação entre o consumo de PUFAS e o peso ao nascer foi analisada por meio da regressão linear múltipla, ajustada para variáveis maternas (idade, escolaridade, cor, IMC pré-gestacional, duração da gestação, número de gestações, ingestão de bebida alcoólica e tabagismo durante a gestação) e sexo da criança. Para avaliar a associação entre genótipos *FADS* e peso ao nascer, cada SNP foi avaliado individualmente, ajustados para as mesmas variáveis maternas e sexo da criança. O genótipo homocigoto de maior frequência foi utilizado como referência.

Para avaliar a interação criaram-se termos produto gene-nutriente, para cada genótipo e cada PUFA, ajustando os modelos com e sem os termos produto. Foi o usado o teste da razão da verossimilhança para comparar os modelos e decidir pela significância da interação.

O nível de significância utilizado nas análises foi de 5%.

RESULTADOS

Estão disponíveis para análise dados de 250 gestantes, após exclusão de 6 gestantes que não responderam ao questionário socioeconômico e 12 que não realizaram a avaliação do consumo alimentar. Três gestantes sofreram aborto, e também não foram incluídas na amostra final. As gestantes eram, em sua maioria, negras ou pardas, de classe média, não tabagistas e não etilistas (**Tabela 1**).

Foram determinados os genótipos dos 3 polimorfismos (*FADS1*: rs174561; e *FADS2*: rs174575, rs3834458) em 100% das gestantes, cujas frequências alélica e genotípica estão apresentadas na **Tabela 2**. As frequências dos alelos variantes

foram de 22,0% a 28,8%, e a distribuição dos genótipos estava em equilíbrio de Hardy-Weingberg (**Tabela 2**).

A ingestão de AA e de PUFAs n-3 não diferiu entre os genótipos para os três polimorfismos avaliados. No entanto, as gestantes heterozigotas para os polimorfismos rs174561 e rs3834458 ingeriam menores quantidades de LA, quando comparadas com as gestantes homozigotas para o alelo de maior frequência ($p < 0,05$) (**Tabela 3**).

A ingestão de PUFAs pelas gestantes não se associou com peso ao nascer na análise multivariada (**Tabela 4**). Houve tendência de associação positiva entre ingestão de ALA e DHA no peso ao nascer, e tendência de associação negativa para EPA, LA e AA, mas sem significância.

Também não houve associação entre os SNPs investigados e peso ao nascer (**Tabela 5**). Entretanto, mesmo sem significância, houve tendência de associação negativa com peso ao nascer nas gestantes homozigotas para o alelo de menor frequência dos SNPs rs174575 (GG) e rs174561 (CC); para o SNP rs3834458 (DelDel) essa tendência foi positiva.

Não foi observada interação entre ingestão materna de PUFAs e os polimorfismos maternos dos genes *FADS* no peso da criança ao nascer (dados não mostrados).

DISCUSSÃO

No presente estudo, não houve interação entre os polimorfismos maternos rs174575 (*FADS2*), rs174561 (*FADS1*) e rs3834458 (*FADS2*) e o consumo de ácidos graxos poli-insaturados na modulação do peso ao nascer. No entanto, isoladamente, houve tendência de associação positiva entre ingestão de ALA e DHA no peso da criança ao nascer, e associação negativa para EPA, LA e AA. Em geral, as gestantes heterozigotas dos polimorfismos rs174561 e rs3834455 apresentaram menor ingestão de LA. Quanto aos genótipos *FADS*, isoladamente, houve tendência de associação negativa entre os homozigotos para o alelo de menor frequência dos polimorfismos rs174575 (GG) e rs174561 (CC) no peso ao nascer, e positiva para o rs3834458 (DelDel).

Apesar de não apresentar significância estatística, a tendência demonstrada com os resultados do consumo alimentar está de acordo com a literatura, que mostra que a ingestão de PUFAS n-3, principalmente o DHA, é fator protetor do resultado obstétrico (Gould et al., 2016; Kar et al., 2016; Gunaratne et al., 2015; Harris e Baack, 2015; Harris et al., 2015; Moltó-Puigmartí et al., 2014; Zhao et al., 2014; Carlson et al., 2013). Na gestação, o status materno de DHA (nível de ingestão ou conteúdo sanguíneo) tem sido associado positivamente com o peso da criança ao nascer (Moltó-Puigmartí et al., 2014; Carlson et al., 2013), enquanto LA e AA se associam negativamente (Meher et al., 2016, Moltó-Puigmartí et al., 2014; van Eijsden et al., 2008).

Propõe-se que o AA esteja relacionado com a ocorrência de prematuridade, já que é utilizado na síntese de prostaglandinas da série 2, responsáveis pelo início do trabalho de parto por favorecerem o amadurecimento cervical e a contração uterina. Os LCPUFAs n-3 agiriam de forma contrária, prevenindo o parto prematuro, devido à inibição da produção de eicosanoides derivados do AA por competição enzimática (Moltó-Puigmartí et al., 2014; Olsen et al., 1986). De acordo com essa teoria, o aumento do peso da criança seria uma mera consequência da maior duração da gestação. No entanto, outro mecanismo proposto sugere que os eicosanoides originados dos LCPUFAs n-3 também poderiam favorecer o crescimento e o desenvolvimento fetais pelo aumento do fornecimento sanguíneo para o feto em função da redução da viscosidade sanguínea materna, por inibição da agregação plaquetária, e à vasodilatação dos vasos sanguíneos placentários (Moltó-Puigmartí et al., 2014; Van Wijngaarden et al., 2014; Olsen et al., 1991). A combinação dos dois mecanismos parece explicar os efeitos do maior consumo materno de LCPUFAs n-3 na melhoria do peso ao nascer.

Entretanto, a associação positiva entre a ingestão de PUFAS na gestação, ou o consumo de peixes, e peso ao nascer não é unanimidade entre os estudos (Harris et al., 2015; Saccone et al., 2015; Carlsen et al., 2013; Heppe et al., 2011; Helland et al., 2001). Um estudo randomizado controlado comparou os efeitos da suplementação de DHA e da educação nutricional (para aumento do consumo de DHA por meio de peixes e alimentos fortificados) nos desfechos gestacionais (Harris et al., 2015). Tanto a educação nutricional quanto a suplementação com 600mg de DHA aumentaram em 4 a 4,5 dias a duração da gestação, comparados com o grupo

controle (óleo de oliva), mas peso ao nascer, comprimento e circunferência cefálica não diferiram entre os grupos.

Alguns autores sugeriram que os resultados contraditórios são reflexos de variações genéticas no metabolismo de LCPUFAs (Gonzalez-Casanova et al., 2016; Moltó-Puigmartí et al., 2014; Lattka et al., 2013, Xie e Innis, 2008). Em geral, os estudos mostraram que indivíduos que carregam um ou dois alelos de menor frequência de polimorfismos dos genes *FADS1* e *FADS2* apresentavam maiores proporções dos substratos do metabolismo de LCPUFAs (LA, 18:2n-6; DGLA, 20:3n-6 e ALA, 18:3n-3) e redução dos produtos da ação das dessaturases (AA, 20:4n-6; EPA, 20:5n-3; e DHA, 22:6n-3), provavelmente devido à menor atividade enzimática (Al-Hilal et al., 2013; LATTKA et al., 2013; Hong et al., 2013; Koletzko et al., 2011). Esse perfil em gestantes pode resultar em menor disponibilidade de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa para o feto (Barman et al., 2015; Lattka et al., 2013; Xie e Innis, 2008).

No estudo de Hasrslof et al. (2013), com crianças de 9 meses a 3 anos de idade, os genótipos *FADS* e o consumo de peixes eram responsáveis por 3% e 1,5%, respectivamente, da variação de DHA eritrocitário, sendo o aleitamento materno o maior responsável por essa variação (~20%). Apesar de pequena, a taxa de variação explicada pelos genótipos *FADS* é bastante relevante, já que nesse estudo foram analisados apenas quatro SNPs, enquanto outros não avaliados se somariam a esses resultados. Ainda, destaca-se que a atividade das enzimas delta-5 e delta-6 dessaturases é limitada no feto e na criança menor de 6 meses (Hanebutt et al., 2008), o que sugere a possibilidade de que níveis semelhantes sejam observados em adultos.

Surpreendentemente no presente estudo, ao contrário dos SNPs rs174575 (*FADS2*) e rs174561 (*FADS1*), houve tendência de associação positiva entre o genótipo homozigoto para o alelo de menor frequência (DelDel) do polimorfismo rs3834458 (*FADS2*) e peso ao nascer. Evidências sugeriram possível aumento da transcrição em indivíduos homozigotos para o alelo de menor frequência dessa variante genética, provavelmente por facilitar a ligação do fator de transcrição ELK1 (Nwankwo et al., 2003). Em acordo com essa hipótese, Steer et al. (2013) também demonstraram associação positiva entre o genótipo homozigoto para o alelo de menor frequência do SNP rs3834458 em gestantes e o coeficiente de inteligência de crianças aos 8 anos de idade. Harsløf et al. (2013) excluíram o rs3834458 das

análises, pois apresentava forte correlação ($r = 0,98$) com o rs1535 (*FADS2*), mas demonstrou que a presença do alelo de menor frequência do polimorfismo rs1535 foi associada com o aumento na concentração de DHA em relação ao alelo de maior frequência em homozigose. Entretanto, o perfil protetor associado ao alelo de menor frequência não é consenso em todos os estudos encontrados com o polimorfismo rs3834458, o que exige o desenvolvimento de mais estudos sobre o tema (Ding et al., 2016; Schuchardt et al., 2016; Yeates et al., 2015; Moltó-Puigmartí et al., 2013; Azrad et al., 2012; Lattka et al., 2010a).

Apesar da evidente influência do consumo de PUFA da série ômega 3 e dos polimorfismos dos genes *FADS* no perfil de LCPUFAs no organismo, no presente estudo não foi observada interação gene-nutriente no peso ao nascer. É possível que o consumo de PUFA tenha sido insuficiente para alterar o peso ao nascer de recém-nascidos de mães com esse genótipo, mesmo entre aquelas com maior ingestão de DHA.

A baixa ingestão de LA por gestantes heterozigotas no presente estudo pode indicar alguma influência dos genótipos *FADS* na preferência por determinados alimentos. Considerando a baixa tolerância de certas populações ao consumo de óleo de peixe, foi proposta a possível influência genética na sensibilidade gustativa e no consumo de óleo de peixes, embora o mecanismo ainda seja desconhecido (Minihane, 2016).

Variações genéticas nos receptores das papilas gustativas explicam as diferenças individuais de percepção/sensibilidade e a aceitação dos sabores doce e amargo, e, conseqüentemente, a escolha/preferência de determinados alimentos (Reed e Xia, 2015; Feeney et al., 2011). Alguns autores têm sugerido que as papilas gustativas seriam capazes de detectar os lipídeos em razão da presença de receptores de ácidos graxos, dentre os quais as proteínas CD36 e GPR120. Segundo esses autores, a percepção gustativa das gorduras seria considerada um sexto sabor, junto com o doce, o azedo, o amargo, o salgado e o umami (que detecta determinadas proteínas e aminoácidos) (Loper et al., 2015; Reed e Xia, 2015).

As proteínas CD36 e GPR120 se expressam em várias células, incluindo adipócitos, células endoteliais, macrófagos, músculo esquelético e plaquetas, além das papilas gustativas. Quando os receptores estão em menores quantidades na membrana plasmática ocorre redução do cálcio intracelular, o que diminui o vigor da

sinalização dos receptores (Reed e Xia, 2015). Estudos mostraram que maiores concentrações de EPA aumentaram a expressão de CD36 em cultura de macrófagos (Babaahmadi Rezaei et al., 2013) e a maior ingestão de DHA aumentou a ativação de GPR120 em células de Kupfer (Della Corte et al., 2016). Não foram encontrados estudos que avaliassem a expressão de CD36 e GPR120 nas papilas gustativas em resposta às concentrações de LCPUFAs n-3. Entretanto, considerando os resultados desses estudos, é possível que baixas concentrações de LCPUFAs n-3 estejam associados com menor expressão de CD36 e GPR120 em papilas gustativas, e na conseqüente menor aceitação de alimentos fontes de lipídeos.

Essa seria uma provável explicação para a menor ingestão de PUFAS por gestantes carreadoras do alelo de menor frequência (Mm ou mm) para os polimorfismos dos genes *FADS*, as quais geralmente apresentam menores níveis sanguíneos de LCPUFAs n-3. Entretanto, o SNP rs3834458 (*FADS2*) apresenta resultados heterogêneos em relação à concentração sanguínea de DHA (Ding et al., 2016; Schuchardt et al., 2016; Yeates et al., 2015; Harsløf et al., 2013; Steer et al., 2013; Lattka et al., 2010b; Nwankwo et al., 2003), e pode não se enquadrar nessa hipótese. Mais estudos são necessários para se verificar a possível influência dos polimorfismos dos genes *FADS* na percepção gustativa e na preferência de alimentos fontes lipídeos.

Com relação à interação entre polimorfismos dos genes *FADS* e ingestão de PUFAS nos resultados obstétricos, até o momento, foram encontrados apenas dois estudos (Gonzalez-Casanova et al., 2016; Moltó-Puigmartí et al., 2014). Gonzalez-Casanova et al. (2016) utilizaram amostras sanguíneas de um estudo randomizado duplo cego no México, realizado com 654 gestantes de 18 a 22 semanas gestacionais, divididas em grupos placebo ou suplementadas com 400 mg/dia de DHA. Foi mostrado que genótipos dos SNPs rs174556 (*FADS1*), rs498793 (*FADS2*) e 174455 (*FADS3*) não modificaram a associação entre suplementação de DHA e peso ao nascer. No entanto, recém-nascidos de mães que carregavam um ou dois alelos de menor frequência (TT e TC) do SNP rs174602 (*FADS2*) eram mais pesados no grupo suplementado. Não houve diferenças em recém-nascidos de mães homozigotas para o alelo de maior frequência (CC).

O resultado do estudo de Gonzalez-Casanova et al. (2016) indica que gestantes com um ou dois alelos de menor frequência do SNP rs174602 (*FADS2*)

são consideradas de risco para a concepção de crianças com baixo peso ao nascer. Nesse caso, a suplementação com 400mg de DHA pode diminuir esse risco, aumentando o peso das crianças ao nascer por compensar uma alteração metabólica geneticamente regulada, que culmina em menores concentrações de DHA no organismo. Provavelmente, as mães homozigotas para o alelo de maior frequência não apresentaram diferenças no peso ao nascer de seus conceptos, pois a melhor atividade enzimática das dessaturases materna, com melhor taxa de conversão de ALA em DHA, implica na ausência de necessidade de DHA externo (suplementado).

Moltó-Puigmartí et al. (2014) mostraram resultado diferente para o SNP rs174556 (*FADS1*), que não apresentou interação gene-nutriente no estudo de Gonzalez-Casanova et al. (2016). Gestantes homozigotas para o alelo de menor frequência do SNP rs174556 concebiam crianças mais leves (-140g) que as homozigotas para o alelo de maior frequência. Nas homozigotas para o alelo de menor frequência o DHA se associava positivamente com peso ao nascer, enquanto o AA se associava negativamente. O genótipo da criança, avaliado pelo sangue do cordão umbilical, não influenciou a interação gene-nutriente, o que ratifica a importância da alimentação e dos genótipos maternos no status de LCPUFAs da criança.

Até onde sabemos, esse foi o primeiro estudo a verificar a interação entre os polimorfismos maternos rs174575 (*FADS2*), rs174561 (*FADS1*) e rs3834458 (*FADS2*) e a ingestão de PUFAS durante a gestação no peso ao nascer, o que se configura um ponto forte do nosso estudo. Outros pontos fortes incluem a condução de um estudo de coorte prospectivo bem controlado, a avaliação da ingestão habitual de PUFAs por meio de um questionário de frequência de consumo desenvolvido especificamente para o estudo, e a qualidade dos dados coletados por profissionais treinados e qualificados pelo NISAMI em todas as etapas do estudo, desde o convite para participação, a aplicação dos questionários socioeconômico e de consumo, a coleta sanguínea, a realização das análises genéticas e a coleta dos desfechos gestacionais. O insuficiente consumo de PUFAS por essas gestantes dificultou a observação clara de causalidade em relação ao desfecho, entretanto, permitiu a compreensão de causa e efeito em níveis de consumo usuais na população. Dentre outras limitações, pode-se citar o delineamento complexo do

estudo, a amostra reduzida e a necessidade de deslocamento das participantes para a coleta sanguínea.

Os resultados mostrados no estudo foram importantes. A tendência de associação positiva entre o genótipo homozigoto para o alelo de menor frequência do rs3834458 (*FADS2*) e o peso ao nascer das crianças indica que esse SNP pode agir como um fator protetor em relação a este desfecho. Parece clara a existência de diversidade fenotípica nas variações dos genes *FADS*, o que impede a generalização do seu efeito no metabolismo de PUFAS. Segundo Steer et al. (2013), parecem existir efeitos opostos dos SNPs localizados na região promotora, como o rs3834458, e dos situados nos íntrons (região intrônica) do gene *FADS2*, o que exige cautela na interpretação dos estudos. Conhecer o efeito de cada variante no metabolismo de ácidos graxos facilita a identificação de indivíduos com risco e que seriam beneficiadas pelo maior consumo de n3 PUFAS em geral, ou especificamente de DHA, caso sejam geneticamente propensas à menor conversão dos LCPUFAs.

Em conclusão, não foi observada interação gene-nutriente no peso da criança ao nascer para os três SNPs avaliados, o que pode ter sido um reflexo da insuficiente ingestão de PUFAS pelas gestantes que carreavam o alelo de menor frequência. Sugere-se que a influência dos polimorfismos dos genes *FADS* na percepção gustativa e na preferência de alimentos fontes lipídeos seja investigada, a fim de se compreender os determinantes do consumo de PUFAS em indivíduos carreadores do alelo de menor frequência. Os genótipos homozigotos de menor frequência apresentaram tendência de risco em relação ao peso ao nascer nos SNPs rs174575 (GG) e rs174561 (CC), e protetor no SNP rs3834458 (Del/Del), entretanto, não houve associação estatística. Mais estudos são necessários para o entendimento das interações gene-nutriente no metabolismo de LCPUFAs e dos seus fenótipos em gestantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al-Hilal M, Alsaleh A, Maniou Z, Lewis FJ, Hall WL, Sanders TA, O'Dell SD; MARINA study team. Genetic variation at the FADS1-FADS2 gene locus influences delta-5 desaturase activity and LC-PUFA proportions after fish oil supplement. *J Lipid Res.* 2013;54(2):542-51.

Azrad M, Zhang K, Vollmer RT, Madden J, Polascik TJ, Snyder DC, Ruffin MT, Moul JW, Brenner D, Hardy RW, Demark-Wahnefried W. Prostatic alpha-linolenic acid (ALA) is positively associated with aggressive prostate cancer: a relationship which may depend on genetic variation in ALA metabolism. *PLoS One.* 2012;7(12):e53104.

Babaahmadi Rezaei H, Doosti M, Aminian M, Shabani P. Compare the effect of eicosapentaenoic acid and oxidized low-density lipoprotein on the expression of CD36 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Iran Biomed J.* 2013;17(2):84-92.

Barman M, Nilsson S, Torinsson Nalwai Å, Sandin A, Wold AE, Sandberg AS. Single Nucleotide Polymorphisms in the FADS Gene Cluster but not the ELOVL2 Gene are Associated with Serum Polyunsaturated Fatty Acid Composition and Development of Allergy (in a Swedish Birth Cohort). *Nutrients.* 2015;7(12):10100-15.

Bernard JY, De Agostini M, Forhan A, de Lauzon-Guillain B, Charles MA, Heude B; EDEN Mother-Child Cohort Study Group. The dietary n6:n3 fatty acid ratio during pregnancy is inversely associated with child neurodevelopment in the EDEN mother-child cohort. *J Nutr.* 2013;143(9):1481-8.

Carlsen K, Pedersen L, Bønnelykke K, Stark KD, Lauritzen L, Bisgaard H. Association between whole-blood polyunsaturated fatty acids in pregnant women and early fetal weight. *Eur J Clin Nutr.* 2013;67(9):978-83.

Carlson SE, Colombo J, Gajewski BJ, Gustafson KM, Mundy D, Yeast J, Georgieff MK, Markley LA, Kerling EH, Shaddy DJ. DHA supplementation and pregnancy outcomes. *Am J Clin Nutr.* 2013;97(4):808-15.

Chen B, Ji X, Zhang L, Hou Z, Li C, Tong Y. Fish oil supplementation improves pregnancy outcomes and size of the newborn: a meta-analysis of 21 randomized controlled trials. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2016;29(12):2017-27.

Christian LM, Blair LM, Porter K, Lower M, Cole RM, Belury MA. Polyunsaturated Fatty Acid (PUFA) Status in Pregnant Women: Associations with Sleep Quality, Inflammation, and Length of Gestation. *PLoS One*. 2016;11(2):e0148752.

Cormier H, Rudkowska I, Paradis AM, Thifault E, Garneau V, Lemieux S, Couture P, Vohl MC. Association between polymorphisms in the fatty acid desaturase gene cluster and the plasma triacylglycerol response to an n-3 PUFA supplementation. *Nutrients*. 2012;4(8):1026-41.

Della Corte C, Mosca A, Ionata A, Nobili V. Docosahexaenoic Acid and Its Role in G-Protein-Coupled Receptor 120 Activation in Children Affected by Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Endocr Dev*. 2016;30:29-36.

Ding Z, Liu GL, Li X, Chen XY, Wu YX, Cui CC, Zhang X, Yang G, Xie L. Association of polyunsaturated fatty acids in breast milk with fatty acid desaturase gene polymorphisms among Chinese lactating mothers. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2016;109:66-71.

Feeney E, O'Brien S, Scannell A, Markey A, Gibney ER. Genetic variation in taste perception: does it have a role in healthy eating? *Proc Nutr Soc*. 2011;70(1):135-43.

Gillingham LG, Harding SV, Rideout TC, Yurkova N, Cunnane SC, Eck PK, Jones PJ. Dietary oils and FADS1-FADS2 genetic variants modulate [¹³C]α-linolenic acid metabolism and plasma fatty acid composition. *Am J Clin Nutr*. 2013;97(1):195-207.

Glaser C, Lattka E, Rzehak P, Steer C, Koletzko B. Genetic variation in polyunsaturated fatty acid metabolism and its potential relevance for human development and health. *Matern Child Nutr*. 2011;7 Suppl 2:27-40.

Gonzalez-Casanova I, Rzehak P, Stein AD, Garcia Feregrino R, Dommarco JA, Barraza-Villarreal A, Demmelmair H, Romieu I, Villalpando S, Martorell R, Koletzko B, Ramakrishnan U. Maternal single nucleotide polymorphisms in the fatty acid desaturase 1 and 2 coding regions modify the impact of prenatal supplementation with DHA on birth weight. *Am J Clin Nutr*. 2016;103(4):1171-8.

Gould JF, Anderson AJ, Yelland LN, Gibson RA, Makrides M. Maternal characteristics influence response to DHA during pregnancy. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2016;108:5-12.

Gunaratne AW, Makrides M, Collins CT. Maternal prenatal and/or postnatal n-3 long chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) supplementation for preventing allergies in early childhood. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015;(7):CD010085.

Hanebutt FL, Demmelmair H, Schiessl B, Larqué E, Koletzko B. Long-chain polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA) transfer across the placenta. *Clin Nutr.* 2008;27(5):685-93.

Harsløf LB, Larsen LH, Ritz C, Hellgren LI, Michaelsen KF, Vogel U, Lauritzen L. FADS genotype and diet are important determinants of DHA status: a cross-sectional study in Danish infants. *Am J Clin Nutr.* 2013;97(6):1403-10.

Harris WS, Baack ML. Beyond building better brains: bridging the docosahexaenoic acid (DHA) gap of prematurity. *J Perinatol.* 2015;35(1):1-7.

Harris MA, Reece MS, McGregor JA, Wilson JW, Burke SM, Wheeler M, Anderson JE, Auld GW, French JI, Allen KG. The Effect of Omega-3 Docosahexaenoic Acid Supplementation on Gestational Length: Randomized Trial of Supplementation Compared to Nutrition Education for Increasing n-3 Intake from Foods. *Biomed Res Int.* 2015;2015:123078.

Helland IB, Saugstad OD, Smith L, Saarem K, Solvoll K, Ganes T, Drevon CA. Similar effects on infants of n-3 and n-6 fatty acids supplementation to pregnant and lactating women. *Pediatrics.* 2001;108(5):E82.

Hellstrand S, Ericson U, Gullberg B, Hedblad B, Orho-Melander M, Sonestedt E. Genetic variation in FADS1 has little effect on the association between dietary PUFA intake and cardiovascular disease. *J Nutr.* 2014;144(9):1356-63.

Hellstrand S, Sonestedt E, Ericson U, Gullberg B, Wirfält E, Hedblad B, Orho-Melander M. Intake levels of dietary long-chain PUFAs modify the association between genetic variation in FADS and LDL-C. *J Lipid Res.* 2012;53(6):1183-9.

Heppe DHM, Steegers EAP, Timmermans S, Breeijen Hd, Tiemeier H, Hofman A, Jaddoe VWV. Maternal fish consumption, fetal growth and the risks of neonatal complications: the Generation R Study. *Br J Nutr* 2011;105:938–49.

Hester AG, Murphy RC, Uhelson CJ, Ivester P, Lee TC, Sergeant S, Miller LR, Howard TD, Mathias RA, Chilton FH. Relationship between a common variant in the

fatty acid desaturase (FADS) cluster and eicosanoid generation in humans. *J Biol Chem.* 2014;289(32):22482-9.

Hong SH, Kwak JH, Paik JK, Chae JS, Lee JH. Association of polymorphisms in FADS gene with age-related changes in serum phospholipid polyunsaturated fatty acids and oxidative stress markers in middle-aged nonobese men. *Clin Interv Aging.* 2013;8:585-96.

Innis SM. Dietary (n-3) fatty acids and brain development. *J Nutr.* 2007;137(4):855-9.

Innis SM. Impact of maternal diet on human milk composition and neurological development of infants. *Am J Clin Nutr.* 2014;99(3):734S-41S.

Jelliffe, DB. Evaluación del estado de nutrición de la comunidad. Ginebra: Organización Mundial de La Salud; 1968.

Kar S, Wong M, Rogozinska E, Thangaratinam S. Effects of omega-3 fatty acids in prevention of early preterm delivery: a systematic review and meta-analysis of randomized studies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2016;198:40-6.

Koletzko B, Lattka E, Zeilinger S, Illig T, Steer C. Genetic variants of the fatty acid desaturase gene cluster predict amounts of red blood cell docosahexaenoic and other polyunsaturated fatty acids in pregnant women: findings from the Avon Longitudinal Study of Parents and Children. *Am J Clin Nutr.* 2011;93(1):211-9.

Lattka E, Eggers S, Moeller G, Heim K, Weber M, Mehta D, Prokisch H, Illig T, Adamski J. A common FADS2 promoter polymorphism increases promoter activity and facilitates binding of transcription factor ELK1. *J Lipid Res.* 2010a;51(1):182-91.

Lattka E, Illig T, Heinrich J, Koletzko B. Do FADS genotypes enhance our knowledge about fatty acid related phenotypes? *Clin Nutr.* 2010b;29(3):277-87.

Lattka E, Koletzko B, Zeilinger S, Hibbeln JR, Klopp N, Ring SM, Steer CD. Umbilical cord PUFA are determined by maternal and child fatty acid desaturase (FADS) genetic variants in the Avon Longitudinal Study of Parents and Children (ALSPAC). *Br J Nutr.* 2013;109(7):1196-210.

Loper HB, La Sala M, Dotson C, Steinle N. Taste perception, associated hormonal modulation, and nutrient intake. *Nutr Rev.* 2015;73(2):83-91.

Los DA, Murata N. Structure and expression of fatty acid desaturases. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1394(1):3-15.

Lu Y, Feskens EJ, Dollé ME, Imholz S, Verschuren WM, Müller M, Boer JM. Dietary n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acid intake interacts with FADS1 genetic variation to affect total and HDL-cholesterol concentrations in the Doetinchem Cohort Study. *Am J Clin Nutr*. 2010;92(1):258-65.

Meher A, Randhir K, Mehendale S, Wagh G, Joshi S. Maternal Fatty Acids and Their Association with Birth Outcome: A Prospective Study. *PLoS One*. 2016;11(1):e0147359.

Minihane AM. Impact of Genotype on EPA and DHA Status and Responsiveness to Increased Intakes. *Nutrients*. 2016;8(3):123.

Mirmiran P, Esfahani FH, Mehrabi Y, Hedayati M, Azizi F. Reliability and relative validity of an FFQ for nutrients in the Tehran lipid and glucose study. *Public Health Nutr*. 2010;13(5):654-62.

Moltó-Puigmartí C, Jansen E, Heinrich J, Standl M, Mensink RP, Plat J, Penders J, Mommers M, Koppelman GH, Postma DS, Thijs C. Genetic variation in FADS genes and plasma cholesterol levels in 2-year-old infants: KOALA Birth Cohort Study. *PLoS One*. 2013;8(5):e61671.

Moltó-Puigmartí C, Plat J, Mensink RP, Müller A, Jansen E, Zeegers MP, Thijs C. FADS1 FADS2 gene variants modify the association between fish intake and the docosahexaenoic acid proportions in human milk. *Am J Clin Nutr*. 2010;91(5):1368-76.

Moltó-Puigmartí C, van Dongen MC, Dagnelie PC, Plat J, Mensink RP, Tan FE, Heinrich J, Thijs C. Maternal but not fetal FADS gene variants modify the association between maternal long-chain PUFA intake in pregnancy and birth weight. *J Nutr*. 2014;144(9):1430-7.

Nakamura MT, Nara TY. Essential fatty acid synthesis and its regulation in mammals. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2003;68(2):145-50.

Nepa – Unicamp. Tabela brasileira de composição de alimentos / NEPA – UNICAMP - 4. ed. rev. e ampl. Campinas: NEPAUNICAMP; 2011.

Nwankwo JO, Spector AA, Domann FE. A nucleotide insertion in the transcriptional regulatory region of FADS2 gives rise to human fatty acid delta-6-desaturase deficiency. *J Lipid Res.* 2003;44(12):2311-9.

Olsen SF, Hansen HS, Sommer S, Jensen B, Sørensen TI, Secher NJ, Zachariassen P. Gestational age in relation to marine n-3 fatty acids in maternal erythrocytes: a study of women in the Faroe Islands and Denmark. *Am J Obstet Gynecol.* 1991;164(5 Pt 1):1203-9.

Olsen SF, Hansen HS, Sørensen TI, Jensen B, Secher NJ, Sommer S, Knudsen LB. Intake of marine fat, rich in (n-3)-polyunsaturated fatty acids, may increase birthweight by prolonging gestation. *Lancet.* 1986;2(8503):367-9.

Park HG, Kothapalli KS, Park WJ, DeAllie C, Liu L, Liang A, Lawrence P, Brenna JT. Palmitic acid (16:0) competes with omega-6 linoleic and omega-3 α -linolenic acids for FADS2 mediated Δ 6-desaturation. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1861(2):91-7

Reed DR, Xia MB. Recent advances in fatty acid perception and genetics. *Adv Nutr.* 2015;6(3):353S-60S.

Rzehak P, Thijs C, Standl M, Mommers M, Glaser C, Jansen E, Klopp N, Koppelman GH, Singmann P, Postma DS, Sausenthaler S, Dagnelie PC, van den Brandt PA, Koletzko B, Heinrich J; KOALA study group; LISA study group. Variants of the FADS1 FADS2 gene cluster, blood levels of polyunsaturated fatty acids and eczema in children within the first 2 years of life. *PLoS One.* 2010;5(10):e13261.

Scholtz SA, Kerling EH, Shaddy DJ, Li S, Thodosoff JM, Colombo J, Carlson SE. Docosahexaenoic acid (DHA) supplementation in pregnancy differentially modulates arachidonic acid and DHA status across FADS genotypes in pregnancy. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2015;94:29-33.

Schuchardt JP, Köbe T, Witte V, Willers J, Gingrich A, Tesky V, Pantel J, Rujescu D, Illig T, Flöel A, Hahn A. Genetic Variants of the FADS Gene Cluster Are Associated with Erythrocyte Membrane LC PUFA Levels in Patients with Mild Cognitive Impairment. *J Nutr Health Aging.* 2016;20(6):611-20.

Standl M, Lattka E, Stach B, Koletzko S, Bauer CP, von Berg A, Berdel D, Krämer U, Schaaf B, Röder S, Herbarth O, Buyken A, Drogies T, Thiery J, Koletzko B, Heinrich J; GINIplus Study Group; LISApplus Study Group. FADS1 FADS2 gene cluster, PUFA

intake and blood lipids in children: results from the GINIplus and LISAplus studies. *PLoS One*. 2012;7(5):e37780.

Steer CD, Lattka E, Koletzko B, Golding J, Hibbeln JR. Maternal fatty acids in pregnancy, FADS polymorphisms, and child intelligence quotient at 8 y of age. *Am J Clin Nutr*. 2013;98(6):1575-82.

Tintle NL, Pottala JV, Lacey S, Ramachandran V, Westra J, Rogers A, Clark J, Olthoff B, Larson M, Harris W, Shearer GC. A genome-wide association study of saturated, mono- and polyunsaturated red blood cell fatty acids in the Framingham Heart Offspring Study. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2015;94:65-72.

USDA. U.S. Department of Agriculture; Agricultural Research Service. 2014. USDA National Nutrient Database for Standard Reference; Release 27. Nutrient Data Laboratory Home Page; <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl> [acessado em 08 jul 2014].

van Eijsden M, Hornstra G, van der Wal MF, Vrijkotte TG, Bonse GJ. Maternal n-3, n-6, and trans fatty acid profile early in pregnancy and term birth weight: a prospective cohort study. *Am J Clin Nutr*. 2008;87(4):887-95.

Van Wijngaarden E, Harrington D, Kobrosly R, Thurston SW, O'hara T, McSorley EM, Myers GJ, Watson GE, Shamlaye CF, Strain JJ, Davidson PW. Prenatal exposure to methylmercury and LCPUFA in relation to birth weight. *Ann Epidemiol*, 2014;24(4):273-8.

Vidakovic AJ, Gishti O, Steenweg-de Graaff J, Williams MA, Duijts L, Felix JF, Hofman A, Tiemeier H, Jaddoe VW, Gaillard R. Higher Maternal Plasma n-3 PUFA and Lower n-6 PUFA Concentrations in Pregnancy Are Associated with Lower Childhood Systolic Blood Pressure. *J Nutr*. 2015;145(10):2362-8.

Xie L, Innis SM. Genetic variants of the FADS1 FADS2 gene cluster are associated with altered (n-6) and (n-3) essential fatty acids in plasma and erythrocyte phospholipids in women during pregnancy and in breast milk during lactation. *J Nutr*. 2008;138(11):2222-8.

Yeates AJ, Love TM, Engström K, Mulhern MS, McSorley EM, Grzesik K, Alhamdow A, Wahlberg K, Thurston SW, Davidson PW, van Wijngaarden E, Watson GE, Shamlaye CF, Myers GJ, Strain JJ, Broberg K. Genetic variation in FADS genes is

associated with maternal long-chain PUFA status but not with cognitive development of infants in a high fish-eating observational study. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2015;102-103:13-20.

Wang L, Athinarayanan S, Jiang G, Chalasani N, Zhang M, Liu W. Fatty acid desaturase 1 gene polymorphisms control human hepatic lipid composition. *Hepatology*. 2015;61(1):119-28.

Zeng P, Zhao Y, Qian C, Zhang L, Zhang R, Gou J, Liu J, Liu L, Chen F. Statistical analysis for genome-wide association study. *J Biomed Res*. 2015;29(4):285-97.

Zhao JP, Levy E, Fraser WD, Julien P, Delvin E, Montoudis A, Spahis S, Garofalo C, Nuyt AM, Luo ZC. Circulating docosahexaenoic acid levels are associated with fetal insulin sensitivity. *PLoS One*. 2014;9(1):e85054.

Ziegler A, König IR, Thompson JR. Biostatistical aspects of genome-wide association studies. *Biom J*. 2008;50(1):8-28.

TABELAS

Tabela 1 – Características das gestantes e dos recém-nascidos da amostra (n = 250), Bahia, Brasil, 2016

Variável	Valor
Características Maternas	
Idade (anos)	27,24 ± 6,01
Cor	
- Negras	105 (42%)
- Pardas	105 (42%)
- Brancas	25 (10%)
- Outros	15 (6%)
Escolaridade (anos)	4,62 ± 1,53
-Ensino médio	208 (83,2%)
-Ensino fundamental	42 (16,8%)
Classe socioeconômica (n=244)	
-A	2 (0,8%)
-B	39 (15,6%)
-C	155 (62%)
-D	46 (18,4%)
-E	2 (0,8%)
Tabagismo, sim:não	18 (7,2%) : 232 (92,8%)
Consumo de álcool, sim:não	21 (8,4%) : 229 (91,6%)
Peso (Kg)	67,17 ± 12,82
Estatura (m)	1,61 ± 0,06
IMC (kg/m ²)	26,07 ± 5,01

Continua...

...continuação.

IMC pré-gestacional (kg/m ²)	24,17±4,90
Primigesta (n=249)	106 (42,4%)
Número de gestações	0,96 ± 1,14
Idade gestacional (semanas) (n=243)	19,79 ± 7,18
Ingestão de n-3 PUFA	
- ALA (g/dia)	1,87 ± 0,87
- EPA (mg/dia)	65,58 ± 73,12
- DHA (mg/dia)	209,88 ± 211,72
Ingestão de n-6 PUFA	
- LA (g/dia)	18,21 ± 8,77
- AA (mg/dia)	186,23 ± 283,09

Características da criança ao nascer

Sexo, fem:masc	134 (53,6%) : 116 (46,4%)
Idade Gestacional (semanas)	38,60 ± 1,96
Peso (g)	3324,06 ± 494,60

IMC = Índice de Massa Corporal. n-3 PUFA = Ácidos graxos poli-insaturados da série ômega 3. ALA = Ácido α -linolênico (18:3; n-3). EPA = Ácido Eicosapentaenoico (20:5; n-3). DHA = Ácido docosa-hexaenoico (22:6; n-3). n-6 PUFA = Ácidos graxos poli-insaturados da série n-6. LA = Ácido linoleico (18:2; n-6). AA = Ácido araquidônico (20:4 n-6). Fem = feminino. Masc = masculino.

Tabela 2 – Características dos três polimorfismos dos genes das dessaturases (*FADS*) da amostra de gestantes (n = 250)

Gene/SNP	Genótipo (%)			MAF	HWE
	MM	Mm	mm	%	p ¹
<i>FADS2</i>					
rs174575	CC (49,6)	CG (43,2)	GG (7,2)	28,8	0,44490
<i>FADS1</i>					
rs174561	TT (61,6)	TC (32,8)	CC (5,6)	22,0	0,46273
Intergênico (<i>FADS2</i>)					
rs3834458	TT (58,8)	TDel (34,8)	DelDel (6,4)	23,8	0,72693

SNP = Polimorfismo de nucleotídeo único. MM = Homozigoto de maior frequência. Mm = Heterozigoto. mm = homozigoto de menor frequência. MAF = Menor Frequência Alélica. HWE = Equilíbrio de Hardy-Weingberg. Del = Deleção.

¹ Derivado do Teste Qui-quadrado do Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Tabela 3 – Ingestão materna de ácidos graxos poli-insaturados segundo polimorfismos dos genes das dessaturases (*FADS*) na amostra de gestantes (n = 250)

Genótipo		LA (g)	AA (mg)	ALA (g)	EPA (mg)	DHA (mg)
<i>FADS2</i> rs174575	MM	19,88	187,41	2,03	48,63	230,08
	Mm	17,58	186,76	1,81	33,66	195,98
	mm	15,80	174,94	1,63	30,12	154,11
	P Value	0,135	0,985	0,175	0,065	0,242
<i>FADS1</i> rs174561	MM	20,05 ^a	184,51	1,99	45,02	227,28
	Mm	16,17 ^b	182,20	1,78	34,22	185,20
	mm	16,67 ^{a,b}	228,79	1,80	31,17	163,07
	P Value	0,022	0,845	0,341	0,188	0,243
<i>FADS2</i> ¹ rs3834458	MM	20,14 ^a	188,60	2,02	45,95	228,18
	Mm	16,66 ^b	177,43	1,76	34,25	184,36
	mm	16,66 ^{a,b}	212,38	1,72	32,07	180,5
	P Value	0,023	0,892	0,191	0,223	0,264

MM = Homozigoto de maior frequência. Mm = Heterozigoto. mm = homozigoto de menor frequência.
 LA: Ácido linoleico (18:2; n-6). AA = Ácido araquidônico (20:4; n-6). ALA = Ácido α -linolênico (18:3; n-3). EPA = Ácido Eicosapentaenoico (20:5; n-3); DHA = Ácido docosa-hexaenoico – (22:6; n-3).

¹ Intergênico *FADS2-FADS1*

* ANOVA One Way. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 4 – Análise de regressão linear múltipla da associação entre ingestão materna de ácidos graxos poli-insaturados e peso ao nascer¹ (n = 250)

	Peso ao nascer	
	Coefficiente B (95% IC)	P Value
Ingestão de ALA (g/dia)	19,48 (-81,41; 120,37)	0,704
Ingestão de EPA (mg/dia)	-0,26 (-1,23; 0,71)	0,598
Ingestão de DHA (mg/dia)	0,01 (-0,37; 0,39)	0,967
Ingestão de LA (g/dia)	-0,22 (-11,52; 11,08)	0,970
Ingestão de AA (mg/dia)	-0,03 (-0,27; 0,20)	0,794

¹Ajustado para variáveis maternas (idade, escolaridade, cor, IMC pré-gestacional, número de gestações, ingestão de bebida alcoólica e tabagismo durante a gestação), duração da gestação e sexo da criança.

ALA = Ácido α -linolênico (18:3; n-3). EPA = Ácido Eicosapentaenoico (20:5; n-3); DHA = Ácido docosa-hexaenoico – (22:6; n-3). LA: Ácido linoleico (18:2; n-6). AA = Ácido araquidônico (20:4; n-6).

Tabela 5 – Análise de regressão linear múltipla da associação entre polimorfismos dos genes das dessaturases (*FADS*) em gestantes e peso ao nascer¹ (n = 250)

	Peso ao nascer	
	Coeficiente B (95% IC)	P Value
rs174575 (C/G) – <i>FADS2</i>		
GG vs CC	-200,92 (-434,48; 32,63)	0,091
CG vs CC	69,40 (-51,77; 190,57)	0,260
rs174561 (T/C) – <i>FADS1</i>		
CC vs TT	-73,86 (-338,64; 190,92)	0,583
TC vs TT	47,67 (-81,27; 176,61)	0,467
rs3834458 (T/Del) – <i>FADS2</i>		
DelDel vs TT	14,91 (-234,52; 264,34)	0,906
TDel vs TT	-7,15 (-134,23; 119,94)	0,912

¹ Ajustado para variáveis maternas (ingestão de ALA, ingestão de EPA, ingestão de DHA, escolaridade, número de gestações, ingestão de bebida alcoólica na gestação, idade, tabagismo durante a gestação, cor, IMC pré-gestacional), duração da gestação e sexo da criança.

FIGURAS

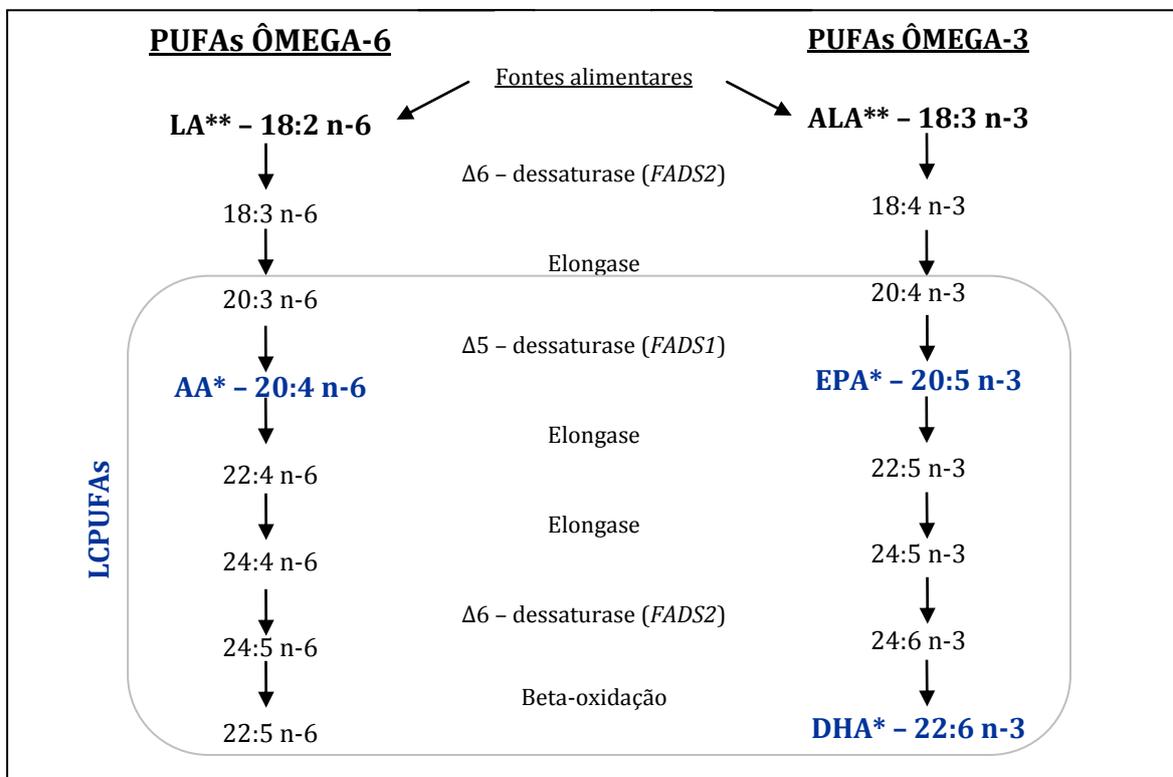


Figura 1. Representação esquemática da rota metabólica dos ácidos graxos poli-insaturados das séries ômega-3 e ômega-6 em humanos

* Forma ativa. ** Forma dietética.

PUFAs = Ácidos graxos poli-insaturados. LCPUFAs = Ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa. LA = Ácido Linoleico. ALA = Ácido α -Linolênico. AA = Ácido Araquidônico. EPA = Ácido Eicosapentaenoico. DHA = Ácido Docosa-hexaenoico.

Fonte: Lattka et al. (2010b); Gonzalez-Casanova et al. (2016) – adaptado.

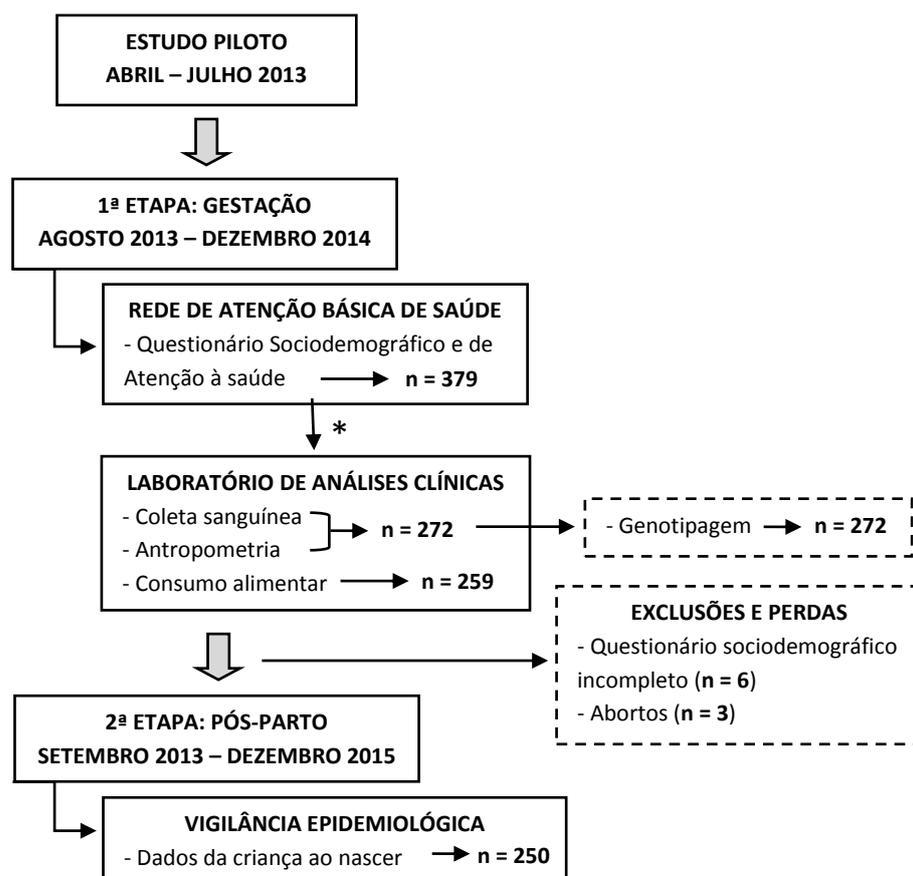


Figura 2: Fluxograma do desenho do estudo e da adesão na pesquisa conduzida com gestantes adultas atendidas no serviço público de saúde pré-natal de Santo Antônio de Jesus, Bahia, Brasil, 2016

* Perdas: Desistiu de participar; não compareceu à coleta sanguínea; atingiu mais de 34SG no momento da coleta sanguínea; mudou de cidade; aborto; gestação múltipla (confirmado em Ultrassonografia).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O baixo peso ao nascer e a prematuridade podem afetar de modo desfavorável o crescimento e o desenvolvimento da criança, e repercutir na sua saúde em longo prazo, na vida adulta. Assim, o conhecimento de marcadores genéticos do baixo peso ao nascer e da prematuridade favorece a identificação de grupos de risco na gestação, e permite a adequada adoção de medidas preventivas ou que minimizem os desfechos desfavoráveis. Estudos de interação gene-nutriente são particularmente importantes nesse sentido, já que possibilitam compreender o padrão de consumo mais adequado em função do genótipo apresentado.

Na atualidade, várias são as discussões sobre a necessidade de se adotar padrões de ingestão alimentar individuais, considerando a variabilidade genética. Apesar de ainda apresentarem alto custo, a acessibilidade às análises genéticas vem aumentando nos últimos anos. O conhecimento de alguns SNPs que influenciam no metabolismo energético e de nutrientes já tem permitido a elaboração de planos alimentares específicos à necessidade individual, na redução do risco de doenças e no aumento do rendimento físico.

Os polimorfismos dos genes das dessaturases (*FADS*) foram relacionados, na literatura, com alterações nas concentrações de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) ômega 3 e ômega 6 em gestantes, e parecem afetar os desfechos gestacionais. No entanto, algumas variantes genéticas podem não resultar em diferenças expressivas no perfil de ácidos graxos, e não seriam de real interesse. Não foram encontrados estudos que avaliaram a interação gene-nutriente nos desfechos gestacionais em gestantes com os SNPs rs174575, rs174561 e rs3834458, sendo esse um ponto forte do estudo.

Em relação às concentrações plasmáticas de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) da série ômega 3 nas gestantes do presente estudo, foi observada interação gene-nutriente dos polimorfismos rs174561 (*FADS1*) e rs3834458 (*FADS2*). Para esses polimorfismos, nas gestantes homocigotas para o alelo de menor frequência, geralmente caracterizadas por menor atividade das dessaturases, o aumento do consumo de ácido α -linolênico (ALA, 18:3 n-3) parece não favorecer a

conversão dos ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosa-hexaenoico (DHA) e promove acúmulo plasmático de ALA. Provavelmente, em gestantes com esse genótipo, o maior consumo de alimentos fontes de DHA seja mais recomendado. A maior ingestão da relação ácido α -linolênico/ácido linoleico (LA/ALA) também resultou em acúmulo de ALA nas gestantes homozigotas para o alelo de menor frequência dos polimorfismos rs174561 e rs3834455 e, adicionalmente, promoveu redução do EPA plasmático no segundo tercil de ingestão de gestantes que carregavam o alelo de menor frequência do polimorfismo rs174575. É possível que a maior ingestão de ALA e a menor ingestão de LA sejam benéficos para gestantes que carregam o alelo de menor frequência, homozigotas ou heterozigotas, dos polimorfismos rs174575, rs174561 e rs3834455.

No presente estudo, foi identificado que o SNP rs174575 (*FADS2*) interage com o consumo de PUFAS na modulação da duração da gestação. Mulheres heterozigotas do SNP rs174575 com baixa ingestão de ALA e alta de ácido linoleico (LA, 18:2 n-6) podem ser consideradas de risco, já que a duração da gestação foi menor. O aumento da ingestão materna de ALA e a redução da ingestão de LA pode prolongar a gestação em mulheres com esse genótipo. É possível que as alterações nos mecanismos de transcrição gênica e conversão enzimática nesse genótipo seja compensada pelo aumento da ingestão de ALA.

A ausência de resultados significativos na maioria das análises de interação gene-nutriente no presente estudo pode ser resultado da insuficiente ingestão de PUFAS pelas gestantes que carregavam o alelo de menor frequência, que, em decorrência da limitada conversão de LCPUFAs, provavelmente necessitariam ingerir maiores quantidades. Nessa perspectiva, os estudos com suplementação são importantes para determinação de causalidade, mas não consideram os efeitos do nutriente em sua ingestão habitual. É importante que se investigue a viabilidade de se obter os benefícios do nutriente estudado pela alimentação habitual, por meio de mudanças no hábito alimentar, ou determinar se apenas níveis muito elevados do nutriente, obtidos por meio de suplementação, seriam capazes de mostrar os efeitos desejáveis.

Esse foi o primeiro estudo a sugerir uma provável influência dos polimorfismos dos genes *FADS* na aceitação de alimentos fontes de PUFAS. Já se sabe que determinadas variantes genéticas podem interferir na quantidade e na atividade de receptores nas papilas gustativas. É possível que baixas concentrações de LCPUFAs da série ômega 3, característico de indivíduos carreadores do alelo de menor frequência dos SNPs dos genes *FADS*, possam reduzir a quantidade de receptores de lipídeos nas papilas gustativas e alterar a aceitação desses alimentos. Sugere-se que novos estudos sejam conduzidos para conhecimento dos determinantes da percepção gustativa e da preferência de alimentos fontes de PUFAs em indivíduos carreadores do alelo de menor frequência dos polimorfismos dos genes das dessaturases.

Considerando seu uso limitado atualmente, espera-se que as análises genéticas sejam ampliadas e que os marcadores moleculares sejam utilizados com maior frequência na detecção precoce de riscos obstétricos em gestantes, visando a saúde ótima da mãe e da criança e a tomada de decisões em saúde pública. Na nutrição, o panorama atual conduz à ideia de que será possível a prescrição rotineira de dietas individualizadas, segundo variantes genéticas. Espera-se, assim, que as aplicações que envolvam nutrição e genética possam melhorar a saúde materno-infantil e o resultado obstétrico.

ANEXO 1

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RECÔNCAVO DA BAHIA -
UFRB

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Influência dos polimorfismos dos genes FADS no perfil materno de ácidos graxos de cadeia longa e no resultado obstétrico

Pesquisador: Gisele Queiroz Carvalho

Área Temática: Área 1. Genética Humana.
(Trata-se de pesquisa envolvendo genética humana não contemplada acima.);

Versão: 2

CAAE: 11499413.6.0000.0056

Instituição Proponente: Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB

Patrocinador Principal: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico ((CNPq))

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 241.225

Data da Relatoria: 09/04/2013

Apresentação do Projeto:

"Introdução: O status materno de ácidos graxos de cadeia longa das séries ômega 3 e 6, além de afetar a saúde da mulher, pode trazer implicações no crescimento e no desenvolvimento fetal e infantil. O perfil plasmático de ácidos graxos pode ser influenciado pela alimentação ou por fatores genéticos e metabólicos. Apesar de poucos estudos desenvolvidos com gestantes, estudos sugerem que as variações genéticas nos genes FADS1 e FADS2 influenciam os níveis de ácidos graxos da família ômega 3 e 6 no plasma materno e no leite materno.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Avaliar o impacto do perfil de ácidos graxos de cadeia longa e dos polimorfismos do grupo FADS na ocorrência de prematuridade e baixo peso ao nascer.

Objetivos secundários: Avaliar a incidência de inadequação do perfil de ácidos graxos de cadeia longa do plasma entre as gestantes; Avaliar a associação entre o perfil de ácidos graxos de cadeia longa do plasma materno, baixo peso ao nascer e duração da gestação; Avaliar a influência dos polimorfismos de núcleo único (SNP) dos genes dos grupos FADS no perfil plasmático de ácidos graxos de cadeia longa de gestantes, bem como sua

Endereço: S/N

Bairro: S/N

CEP: 44.380-000

UF: BA

Município: CRUZ DAS ALMAS

Telefone: (75)3621-1293

Fax: (75)3621-9767

E-mail: secgab@ufrb.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RECÔNCAVO DA BAHIA -
UFRB



relação com o resultado obstétrico

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos para as participantes são mínimos, estando relacionados apenas à coleta de sangue. Todas as medidas serão tomadas para garantir a segurança e a saúde das participantes. A coleta será realizada por um técnico laboratorista treinado, sendo utilizados apenas materiais descartáveis para tal procedimento.

Fatores ambientais e genéticos, nos períodos pré-gestacional e durante a gestação, podem ser determinantes na saúde da criança e da mãe. As alterações na nutrição materna podem influenciar o resultado obstétrico, no que diz respeito à duração da gestação e ao crescimento fetal. Dentre os fatores nutricionais relevantes para o crescimento fetal está o status materno de ácidos graxos de cadeia longa das séries ômega 3 e 6. A literatura

tem demonstrado que a o perfil inadequado de ácidos graxos de cadeia longa (ômega 3 e ômega 6) se relacionam com o resultado obstétrico desfavorável. Esse é um campo de pesquisa interessante e pouco explorado no Brasil, particularmente, no Recôncavo Bahiano. O estudo também pretende avaliar a relação entre os diferentes alelos dos genes das dessaturases no perfil plasmático de ácidos graxos de cadeia longa em gestantes, bem como sua influência no resultado obstétrico. Isso porque, o estado de saúde de um indivíduo é resultado de interações entre o genoma e fatores ambientais, que modulam e afetam a expressão de proteínas diversas e a liberação celular de diferentes neurotransmissores, hormônios, prostaglandinas e interleucinas. Esta linguagem celular atua alterando a expressão gênica em diversos locais, modificando a síntese proteica e a função de muitos órgãos e sistemas (Vaquero, 2008). Um marco no estudo das variáveis genéticas foi o desenvolvimento do projeto Genoma. A partir de então, foi possível avaliar a presença de polimorfismos de uma série de genes e sua relação com as alterações metabólicas e

fisiológicas individuais. Os estudos com polimorfismos permitem o diagnóstico precoce de fatores de risco para o desenvolvimento de doenças. Os fatores ambientais, dentre eles a alimentação, podem ser considerados fatores protetores ou de risco, dependendo do tipo de polimorfismo presente.

Assim, espera-se que, em gestantes, a utilização de marcadores moleculares seja útil na prevenção do desenvolvimento de complicações durante a gestação, parto e puerpério, além de auxiliar na garantia de condições favoráveis para a sugerem que as variações genéticas nos genes FADS1 e FADS2 influenciam os níveis de ácidos graxos da família ômega 3 e 6 no plasma materno e no leite materno. Os estudos são importantes, tendo em vista que as variações genéticas podem influenciar na transferência materna de ácidos graxos essenciais durante a gestação e o aleitamento materno (Xie e Innis, 2008). Parece claro que, após análise dos resultados desses

Endereço: S/N

Bairro: S/N

CEP: 44.380-000

UF: BA

Município: CRUZ DAS ALMAS

Telefone: (75)3621-1293

Fax: (75)3621-9767

E-mail: secgab@ufrb.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RECÔNCAVO DA BAHIA -
UFRB



estudos, a combinação entre o genótipo FADS da mãe e da criança, associado com as características da dieta materna, pode ser um ponto chave no desenvolvimento e na saúde da criança (Moltó-Puigmartí et al., 2010). Koletzko et al. (2011) também discutiram sobre a necessidade de mais estudos que avaliem a associação entre os genótipos FADS, níveis de DHA, e desenvolvimento infantil, a fim de se verificar a relevância biológica dos níveis de ácidos graxos gene-dependentes. Outros fatores ainda precisam ser estudados à luz dos novos conhecimentos relacionados com o campo da genética no perfil materno e infantil de ácidos graxos de cadeia longa, dentre eles a duração da gestação e a correlação com a perda fetal/número de abortos. Espera-se que novos estudos sejam conduzidos de modo a permitir melhor conhecimento nesse campo, considerando, ainda, os fatores relacionados com o perfil genético de populações específicas. Ainda são escassos os estudos genéticos com a população brasileira, em especial, a população gestante do Recôncavo da Bahia.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo se mostra relevante, pois busca *“Avaliar o impacto do perfil de ácidos graxos de cadeia longa e dos polimorfismos do grupo FADS na ocorrência de prematuridade e baixo peso ao nascer.”*, temática importante e que suscita discussões.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O projeto encontra-se em acordo com a Res. 196/96 CNS2012.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto encontra-se em acordo com a Res. 196/96 CNS2012.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: S/N

Bairro: S/N

CEP: 44.380-000

UF: BA

Município: CRUZ DAS ALMAS

Telefone: (75)3621-1293

Fax: (75)3621-9767

E-mail: secgab@ufrb.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RECÔNCAVO DA BAHIA -
UFRB



CRUZ DAS ALMAS, 09 de Abril de 2013

Assinador por:
Cintia Mota Cardeal
(Coordenador)

Endereço: S/N

Bairro: S/N

CEP: 44.380-000

UF: BA

Município: CRUZ DAS ALMAS

Telefone: (75)3621-1293

Fax: (75)3621-9767

E-mail: secgab@ufrb.edu.br

APÊNDICE A

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Questionário sobre fatores maternos de risco e desfechos gestacionais

Nº do Questionário

--	--	--	--

Meu nome é _____. Estamos fazendo um acompanhamento de todas as mulheres grávidas até o 1º ano de vida do neném. Isso é feito para saber melhor como a Sra. e seu neném estão durante a gravidez. Convide-a para participar da pesquisa e responder o questionário. Em caso afirmativo, apresente o termo de consentimento livre e esclarecido, e se necessário leia para a gestante e colete assinatura ou impressão digital. Se a gestante não aceitar participar, agradeça a atenção e encerre. Se a gestante aceitar participar, apresente o TCLE e pegue a assinatura (em duas vias, uma fica com ela)/digital. LEMBRE-SE, se a gestante estiver no 1º trimestre de gestação agendar a visita domiciliar.

Horário de Início: _____ :

PRONTUÁRIO Nº _____ SIS-PRÉNATAL Nº _____

Gostaríamos de preencher um cadastro com seu endereço, pois será necessário entrar em contato novamente.

Nome: _____
 Endereço completo: _____
 Bairro: _____
 Como se chega lá? _____

 Telefone de contato: _____ Apelido: _____

Qual é o nome de sua mãe?

Nome: _____
 Endereço completo: _____
 Bairro: _____
 Como se chega lá? _____

 Telefone de contato: _____ Apelido: _____

Se tiver companheiro, por favor informe:

Nome: _____
 Endereço completo: _____
 Bairro: _____
 Como se chega lá? _____

 Telefone de contato: _____ Apelido: _____

O nome completo de outro parente ou amigo (a) sua? Alguém que, no caso da Sra. se mudar, possa nos dar informações e notícias suas?

Nome: _____
 Endereço completo: _____
 Bairro: _____
 Como se chega lá? _____

 Telefone de contato: _____ Apelido: _____

CONTROLE DE VISITAS

UNIDADE BÁSICA DE SAÚDE			ENTREVISTADOR
VISITAS	DATA	HORA	
1	___ / ___ / 201		
2	___ / ___ / 201		
3	___ / ___ / 201		

Características sócio-demográficas

1. A SENHORA ESTÁ COM QUANTAS SEMANAS GESTACIONAIS: _____ **semanas**
(TRIMESTRE DA ATUAL GESTAÇÃO: 1º 2º 3º)

DUM: ___ / ___ / ___ (verificar e confirmar com o cartão da gestante) NSA (99)

ENTREVISTADOR: Lembre-se, se a gestante estiver no 1º trimestre de gestação agendar a visita domiciliar. Por favor, retorne ao controle de visitas e agende!

2. QUAL A SUA DATA DE NASCIMENTO? ___ / ___ / ___ (se a gestante não souber, precisa verificar algum documento)
Dia Mês Ano

3. QUAL É SUA IDADE? _____ Anos 4. QUAL A IDADE DO PAI DO BEBÊ? _____ Anos Não Sabe (88)

5. A SENHORA PLANEJOU ESTA GRAVIDEZ? Sim (1) Não (2)

6. A SENHORA ESTAVA USANDO ALGUM MÉTODO ANTICONCEPCIONAL? Sim (1) Não (2)

7. SE SIM, QUAL? (ler as alternativas) Pílula/comprimido (1) Injeção hormonal (2) Pílula do dia seguinte (3)
 DIU (4) Diafragma (5) Coito Interrompido (6) Laqueadura (7) Vasectomia (8) Tabela (9) Preservativo (10)
 NSA (99)

8. A SENHORA ESTUDOU/ESTUDA? Sim (1) Não (2) **(pule para questão 10)**

9. ATÉ QUE ANO DA ESCOLA A SENHORA COMPLETOU? Total de anos de estudo: _____ NSA (99)
 -1. Não sabe ler nem escrever -2. Ensino fundamental incompleto -3. Ensino fundamental completo
 -4. Ensino médio incompleto -5. Ensino médio completo -6. Superior incompleto
 -7. Superior completo -8. Pós-graduação -9. Não sabe NSA (99)

10. A SENHORA É (ler as alternativas)
 solteira (1) casada (2) **(pule para o item 12)** mora com companheiro (3) **(pule para o item 12)** divorciada (4) viúva (5)
 separada (6)

11. TEM COMPANHEIRO: sim (1) não (2) NSA (99)

13. OCUPAÇÃO/PROFISSÃO DO COMPANHEIRO: _____ NSA (99)

14. SITUAÇÃO EMPREGO: ativa (1) desempregada (2) do lar (3) estudante (4) aposentada (5)
 licença maternidade/tratamento (6) NSA (99)

15. ÚLTIMA PROFISSÃO EXERCIDA: _____ NSA (99)

16. COMO A SENHORA SE DESLOCA/DESLOCAVA PARA O TRABALHO?
 a pé (1) bicicleta (2) veículo (3) outro (4) Especificar: _____

17. NO MÊS PASSADO, QUANTO GANHARAM* TODAS AS PESSOAS QUE MORAM NA SUA CASA? _____ NSA (99)

18. RENDA FAMILIAR (ler as alternativas) ≤ 1SM (1) 1-2 SM (2) 2-4 SM (3) 5-7 SM (4) ≥ 8 SM (5) NSA (99)

19. QUANTAS PESSOAS MORAM NA SUA CASA, INCLUINDO A SENHORA? _____

Salário Mínimo: R\$ 724,00

20. QUAL É A RELIGIÃO DA SENHORA?

- Católica (1) Protestante (2) Espírita (3) Religiões de matrizes africanas/brasileiras (4) Sem religião (5) Outras (6)
 Não Sabe (88)

ENTREVISTADOR: MARQUE A COLUNA CORRESPONDENTE À QUANTIDADE DE ITENS QUE TEM NO DOMICÍLIO.

POSSE DE ITENS	QUANTIDADE DE ITENS				
	0	1	2	3	4 ou +
1. Televisão a cores	0	1	2	3	4
2. Rádio	0	1	2	3	4
3. Banheiro (com vaso sanitário e descarga)	0	4	5	6	7
4. Automóvel (não considerar se for para uso profissional/meio de renda)	0	4	7	9	9
5. Empregada mensalista (que trabalham pelo menos cinco dias por semana)	0	3	4	4	4
6. Máquina de lavar (não considerar tanquinho, se responder assim)	0	2	2	2	2
7. DVD	0	2	2	2	2
8. Geladeira	0	4	4	4	4
9. Freezer (aparelho independente ou parte da geladeira)	0	2	2	2	2

Grau de instrução da pessoa com maior renda

Analfabeto/primário incompleto/Até 3ª série do ensino fundamental	0
Primário completo/Ginasial incompleto/Até 4ª série do ensino fundamental	1
Ginasial completo/Colegial incompleto/Fundamental completo	2
Colegial completo/Superior incompleto/Médio completo	4
Superior completo	8

Deve ser preenchido pelo digitador:

Total de pontos: () Classe A () Classe B () Classe C () Classe D () Classe E ()

Obs: Classe A 35-45 Classe B 23-34 Classe C 14-22 Classe 8 -13 Classe E 0-7

21. EM SUA OPINIÃO COMO É QUE A SENHORA DEFINIRIA A COR DA SUA PELE? **(ler as alternativas)**

- 1 Amarela -2 Branca -3 Parda -4 Preta -5 Indígena Não sabe (88)

22. A SENHORA FUMA OU JÁ FUMOU?

- Sim (1) **(ler alternativas)** Sim, mas parei (2) **(pula p/ questão 23)** Não, nunca fumou (3) **(pule p/ questão 24)**

Situação da fumante	
<input type="checkbox"/> A Sra. fumava antes da gravidez e continua fumando (1) Fuma a quanto tempo? _____ <input type="checkbox"/> NSA (99)	Quantos cigarros por dia? <input type="checkbox"/> NSA (99)
<input type="checkbox"/> A Sra. não fumava antes da gravidez e passou a fumar na gestação (2) (Pule p/ questão 24) <input type="checkbox"/> NSA (99)	Quantos cigarros por dia? <input type="checkbox"/> NSA (99)

23. A SENHORA FUMAVA ANTES DA GRAVIDEZ E PAROU? sim (1) não (2) NSA (99)

Por quanto tempo fumou? _____ NSA (99)

A quanto tempo deixou de fumar? _____ NSA (99)

24. A SENHORA TOMA OU TOMOU ALGUMA VEZ BEBIDA ALCOÓLICA? **(ler as alternativas)**

- sim (1) não (2) sim, mas parei (3)

25. SE SIM, MAS PAREI QUANDO PAROU? **(ler as alternativas)**

- Parou há mais de 6 meses (1) Parou há 6 meses ou menos (2) NSA (99)

26. SE SIM: NO ÚLTIMO MÊS, QUANTAS VEZES A SENHORA BEBEU? **(ler as alternativas)**

- nenhuma vez (1) menos de uma vez/sem (2) uma vez/sem (3) mais de uma vez/sem (4) todos os dias (4) NSA (99)

27. OUTRAS DROGAS? Sim (1) Não (2) NSA (99) Se sim, especificar o tipo: _____ NSA (99)

(se não pular p/ questão 30)

28. Você usou durante a gestação? sim (1) não (2) NSA (99)
29. Quanto tempo, durante a gestação? Raramente (0) 2 a 3 dias /sem. (2) 1 dia/sem. (1) todo dia ou quase todo dia (3) NSA (99)
30. A SENHORA RECEBE ALGUM BENEFÍCIO/AUXÍLIO DO GOVERNO? Sim (1) Não (2) **(se não pular p/ questão 34)**
31. SE SIM, QUAL? _____ NSA (99) 32. HÁ QUANTO TEMPO? _____ Não sabe(88) NSA (99)
33. DATA DO INÍCIO DO RECEBIMENTO: ____ / ____ / ____ Não sabe (88) NSA (99)

INFORMAÇÕES NUTRICIONAIS

Agora vou fazer algumas perguntas sobre seu peso e alimentação – VERIFIQUE O CARTÃO DA GESTANTE

34. QUAL ERA O SEU PESO ANTES DE FICAR GRÁVIDA? (anotar em Kg) |__||__||__|,|__| Não sabe (88)
35. A SENHORA FOI PESADA HOJE? Sim (1) Não (2) **(se não pular p/ questão 41)**
36. SE SIM, QUAL O PESO? (anotar em kg) |__||__||__|,|__| NSA (99)
37. A SENHORA FOI PESADA EM TODAS AS CONSULTAS ANTERIORES? sim (1) não (2) NSA (99)
38. NAS CONSULTAS DE PRÉ-NATAL, FALARAM PARA SENHORA COMO ESTAVA O SEU GANHO DE PESO?
 não falaram nada (1) disseram que estava com baixo peso (2) disseram que estava com peso adequado (3)
 disseram que estava com sobrepeso (4) disseram que estava com obesidade (5)
39. QUAL É A SUA ALTURA? (anotar em metros) |__|,|__||__| (verificar o cartão da gestante) Não sabe (88)

ENTREVISTADOR: PARA AS QUESTÕES 44 E 45 PODEM TER RESPOSTAS MÚLTIPLAS

40. NESTA USF A SENHORA RECEBEU ALGUMA ORIENTAÇÃO ALIMENTAR E NUTRICIONAL? (ler as alternativas)
 sim (1) não (2). SE SIM, QUEM? Nutricionista (1) Enfermeiro (2) Médico (3) Outro (5) _____ NSA (99)
41. NESTA USF A SENHORA RECEBEU ALGUMA ORIENTAÇÃO SOBRE ALEITAMENTO MATERNO?
 sim (1) não (2). SE SIM, QUEM? Nutricionista (1) Enfermeiro (2) Médico (3) Outro (5) _____ NSA (99)

INFORMAÇÕES GINECOLOGICO-OBSTETRICA

Agora vou fazer algumas perguntas sobre sua HISTÓRIA OBSTÉTRICA ANTERIOR

42. QUANDO FOI A SUA PRIMEIRA MENSTRUÇÃO? MENARCA: _____ ANOS Não sabe (88)
43. SEM CONTAR COM ESTA GRAVIDEZ, QUANTAS VEZES A SENHORA FICOU GRÁVIDA? |__||__|
44. A SENHORA JÁ TEVE ALGUM ABORTO OU PERDEU O NENEM ANTES DE NASCER? sim (1) não (2) **(pular para questão 49)** NSA (99)
45. SE SIM, QUANTOS? |__||__| NSA (99) 46. A SRA. TIROU OU FOI NATURAL? |__||__| TIROU NSA (99)
|__||__| NATURAL NSA (99)
47. TEVE HEMORRAGIA NO ÚLTIMO ABORTO? sim (1) não (2) NSA (99)
48. TOMOU TRANSFUSÃO DE SANGUE NO ÚLTIMO ABORTO? sim (1) não (2) NSA (99)
49. QUANTOS FILHOS NASCERAM? vivos _____ mortos _____ NSA (99)
50. NÚMERO DE PARTOS: _____ VAGINAIS _____ CESARIANAS NSA (99)

51. A DATA DO NASCIMENTO DO ÚLTIMO FILHO ____ / ____ / ____ menos de dois anos (1) mais de dois anos (2) NSA (99)
52. A SRA. AMAMENTOU NO PEITO O ÚLTIMO BEBÊ? sim (1) não (2) NSA (99) 53. SE SIM, ATÉ QUE MÊS
|__||__| meses NSA (99)
54. ALGUM DE SEUS FILHOS TEVE PROBLEMAS RESPIRATÓRIOS? sim (1) não (2) NSA (99) **(se não pular p/ questão 56)**
55. SE SIM, QUANTOS? |__||__| NSA (99)

56. ALGUM RECÉM-NASCIDO NASCEU COM MENOS DE 2.500G? sim (1) não (2) NSA (99)
57. ALGUM FILHO NASCEU PREMATURO? sim (1) não (2) NSA (99)
58. A SENHORA TEVE ALGUMA GRAVIDEZ DE GEMELAR? sim (1) não (2) NSA (99)
59. ONDE A SENHORA TEVE SEU ÚLTIMO BEBÊ (local do último parto)? _____ NSA (99)

60. A SENHORA FEZ AS CONSULTAS DEPOIS DO PARTO? sim (1) não (2) NSA (99)
61. A SENHORA TEVE ALGUMA HEMORRAGIA NO ÚLTIMO PARTO? sim (1) não (2) NSA (99)
62. A SENHORA RECEBEU ALGUM SANGUE NO ÚLTIMO PARTO? (transusão de sangue) sim (1) não (2) NSA (99)
63. A SENHORA TEVE ANEMIA NA ÚLTIMA GRAVIDEZ? sim (1) não (2) NSA (99) (se não pular p/ questão 65)
64. SE SIM, FEZ TRATAMENTO? sim (1) não (2) NSA (99)

INFORMAÇÕES GINECOLOGICO-OBSTETRICA

Agora vou fazer algumas perguntas sobre sua **HISTÓRIA OBSTÉTRICA DA ATUAL GRAVIDEZ**

65. IDADE GESTACIONAL (DUM): ___ / ___ / ___ (verificar e confirmar com o cartão da gestante) NSA (99)
66. VOCÊ TEM FEITO PRÉ-NATAL NESSA GRAVIDEZ (ATUAL)? sim (1) não (2)
67. COM QUANTOS MESES DE GRAVIDEZ FEZ A 1ª CONSULTA ? _____ NSA (99)
68. QUANTAS CONSULTAS DE PRÉ-NATAL A SENHORA JÁ REALIZOU NESTA GESTAÇÃO? _____ consultas
69. A SENHORA REALIZOU ALGUMA USG sim (1) não (2)
70. SE SIM, QUANTAS? _____ NSA (99)
71. IDADE GESTACIONAL DA USG, DE PRIMEIRO TRIMESTRE: _____ SEMANAS _____ DIAS NSA (99)
72. A DATA DA PRIMEIRA USG ___ / ___ / ___ (1º 2º 3º) NSA (99)

72. A SENHORA TEM ALGUM DESSES PROBLEMAS? (ler as alternativas)

- ANEMIA sim (1) não (2) ASMA sim (1) não (2) TUBERCULOSE sim (1) não (2)
- PNEUMONIA sim (1) não (2) DIABETES sim (1) não (2) HIPERTENSÃO sim (1) não (2)
- DOENÇA RENAL sim (1) não (2) DIFICULDADE DE ADAPTAR VISÃO À NOITE sim (1) não (2)
- INFECÇÃO NA URINA sim (1) não (2) HEMORRAGIA/SANGRAMENTO sim (1) não (2)
- ALTERAÇÃO GLICÊMICA sim (1) não (2) OUTROS sim (1) não (2) _____

73. A SENHORA PRECISOU FICAR INTERNADA POR ALGUM DOS MOTIVOS CITADOS? sim (1) não (2)

74. NESTA GESTAÇÃO, A SENHORA ESTÁ COM ALGUM SINTOMA/QUEIXA? sim (1) (ler as alternativas) não (2)

- náuseas/enjôo (1) vômitos (2) dor (3) febre (4) gases (5) azia (6) inflamação (7)
- prisão de ventre (8) dor de cabeça (9) Cólica abdominal (10) Diarreia Falta de apetite (11) outras (12)

75. SE OUTRAS, QUAIS? _____ NSA (99)

76. EM GERAL, COMO TEM SIDO A SAÚDE DA SENHORA NOS ÚLTIMOS 15 DIAS? (ler as alternativas)

- Excelente (1) Muito boa (2) Boa (3) Ruim (4) Muito ruim (5)

77. A SENHORA ESTÁ TOMANDO ALGUMA VITAMINA? sim (1) não (2)

78. A SENHORA TOMOU A VACINA ANTI-TETANICA sim (1) não (2)

79. SE SIM, QUANTAS DOSES? Primeira (1) Segunda (2) Terceira (3) Reforço (4)

EXAMES LABORATORIAIS

Agora vamos verificar algumas informações no prontuário da paciente

Exames	Data	Resultado	Data	Resultado
Hemoglobina: (mg/dL)				
Glicemia: (mg/dL)				

80. USA SUPLEMENTO ALIMENTAR? () Sim () Não SE SIM, QUAL? RESPOSTA: _____

EXPOSIÇÃO SOLAR

Agora vamos fazer algumas perguntas sobre a sua exposição solar NESTA GESTAÇÃO

81. COM QUE FREQUÊNCIA A SENHORIA TOMA SOL?

- 4-6x por semana (0) 3-4x por semana (1) 1-3x por semana (2) Pouca exposição solar (3) Outra (4)

QUESTIONÁRIO DE FREQUÊNCIA DE CONSUMO ALIMENTAR (QFCA)

Visita domiciliar: ___/___/___

Nome: _____ No _____ Data: ___/___/___

Peso: _____ Estatura: _____ Cartão do SUS: _____ Entrevistador: _____

GRUPOS DE ALIMENTOS	QTDE CONSUMIDA POR VEZ	FREQUENCIA DE CONSUMO													R/N		
		DIÁRIO				SEMANAL						MENSAL					
		1	2	3	≥ 4X	1	2	3	4	5	6	1	2	3			
LEITES E DERIVADOS																	
Leite () integral () desnatado () semi-desnatado	() copo duplo/requeijão (200mL) / 2 colheres de sopa ch (25g)																
Estrato solúvel de soja	() copo duplo/requeijão (200mL)																
iogurte () integral () desnatado () semi-desnatado	() copo duplo/requeijão (200mL)																
Queijo branco () minas () coalho	() fatia média (30g)																
Queijo amarelo () minas padrão () prato () mussarela () requeijão em barra	() fatia média (20g)																
CARNES E OVOS																	
Ovo () galinha () codorna (10g) () pato () frito () cozido () grelhado () assado	() unidade (50g)																
Carne de boi sem osso () frito () cozido () grelhado () assado	() bife M / 4 colheres de sopa moída / 2 pedaços médios (100g)																
Carne de boi com osso / mocotó / rabo () frito () cozido () grelhado () assado	() pedaço médio (60g)																
Carne de porco () frito () cozido () grelhado () assado	() bife médio / 2 pedaços médios (100g)																
Frango () com pele () sem pele () frito () cozido () grelhado () assado	() bife médio / 2 pedaços médios (100g)																
Peixes e frutos do mar																	
Salmão () cru () frito () cozido () grelhado () assado	() filé M / posta P (120g)																
Sardinha () enlatada () fresca () frito () cozido () grelhado () assado	() filé M / posta P (120g)																
Camarão () frito () cozido () grelhado () assado	() 10 unid. P (120g)																
Outros: Tipo/espécie: () frito () cozido () grelhado () assado	() filé M / posta P (120g)																
Outros: Tipo/espécie: () frito () cozido () grelhado () assado	() filé M / posta P (120g)																
Embutidos																	
() salsicha () linguiça/josefina	() unidade/gomo/ 5 fatias (50g)																
() salame () presunto () mortadela	() fatias (15g)																
Carne de hambúrguer	() unidade (55g)																

APÊNDICE C

GRUPOS DE ALIMENTOS	QTDE CONSUMIDA POR VEZ	FREQUENCIA DE CONSUMO														
		DIARIO				SEMANAL						MENSAL			R/N	
		1	2	3	≥ 4X	1	2	3	4	5	6	1	2	3		
Carne conservada no sal																
Bacalhau () frito () cozido () grelhado () assado	() pedaço P / 4 colheres de sopa ch (80g)															
Sol/sertão (carne seca, charque) () frito () cozido () grelhado () assado	() 1 pedaço médio / 2 colheres de sopa desfiada (70g)															
Bacon/toucinho	() fatia média (15g)															
Visceras () Intestino/tripa () língua () intestino () fígado/ () rim/ () coração/ () baço/ () pâncreas () frito () cozido () grelhado () assado	() unidade / fatia / bife (100g)															
OLEOS E GORDURAS																
Azeite de oliva	() colher de sopa (8mL)															
Azeite de dendê	() colher de sopa (8mL)															
Óleo vegetal () girasol () soja () milho () algodão () canola	() colher de sopa (8mL)															
Manteiga Marca:	() colher de chá / ponta de faca (8g)															
Margarina () Integral () Ligth Marca:	() colher de chá / ponta de faca (8g)															
Maionese () Integral () Ligth Marca:	() colher de sopa rasa (17g)															
Requeijão cremoso () Integral () Ligth Marca:	() colher de sopa rasa (15g)															
Creme de leite () Integral () Ligth Marca:	() colher de sopa rasa (15g)															
Frituras	Somente a frequência															
Vegetais refogados (folhas / legumes)	Somente a frequência															
Latas de óleo	() latas / mês () residentes/comensais															
PETISCOS E ENLATADOS																
Salgadinhos de pacote (ex: cheetos, batata)	() Pacote (50g)															
Salgadinhos de bar () esfiha / () coxinha / () empada / () pastel () assado / () frito	() unidade G (100g)															
Pizza Sabor:	() Fatia média (100g)															
Acarajé () completo () _____	() Unidade M (230g)															
Refrigerante () cola () guaraná () _____	() copo duplo/requeijão (200mL)															
MASSAS/CEREAIS E FEIJÃO																
Biscoito doce Tipo:	() unidade (5g)															

GRUPOS DE ALIMENTOS	QTDE CONSUMIDA POR VEZ	FREQUENCIA DE CONSUMO															
		DIARIO				SEMANAL						MENSAL			R/N		
		1	2	3	≥ 4X	1	2	3	4	5	6	1	2	3			
Pão () Francês () Doce _____	() 1 unidade (50g)																
Biscoito salgado Tipo:	() unidade (6g)																
Biscoito recheado Tipo:	() unidade (13g)																
Bolos Tipo:	() fatia média (60g)																
Cuscuz Tipo:	() fatia M / col de sopa ch (120g)																
Beiju Tipo:	() unidade M (60g)																
Mingau Tipo:	() concha média cheia / copo americano cheio (165g)																
Aipim Cozido () Frito ()	() pedaço M (60g)																
Produtos integrais																	
Arroz integral cozido	() colher de sopa cheia (20g)																
Macarrão integral cozido	() colher de sopa cheia (25g)																
Biscoito integral Tipo: () com castanhas / () sem castanhas () Normal / () Light	() unidade (6g)																
Pães integrais () Frances () Forma Tipo: () com castanhas / () sem castanhas () Normal / () Light	() 1 unidade/ 2 fatias (50g)																
LEGUMINOSAS E OLEAGINOSAS																	
Lentilha cozida	() colher de sopa cheia (18g)																
Grão de bico cozido	() colher de sopa cheia (22g)																
Soja cozida () grãos () PTN texturizada	() colher de sopa cheia (22g)																
Feijão cozido																	
Carioquinha () com carne () sem carne	() colher de sopa cheia (17g)																
Preto () com carne () sem carne	() colher de sopa cheia (17g)																
Fradinho () com carne () sem carne	() colher de sopa cheia (17g)																
Branco () com carne () sem carne	() colher de sopa cheia (17g)																
Verde () com carne () sem carne	() colher de sopa cheia (17g)																
Andu () com carne () sem carne	() colher de sopa cheia (17g)																
Feijoada	() colher de sopa cheia (17g)																
Oleaginosas / sementes																	
Castanha de caju	() ½ copo P / 26 unid. (65g)																
Castanha do Pará/Brasil	() unidade (4g)																
Nozes	() unidade (3g)																
Amêndoas	() unidade (2,5g)																
Linhaça	() colher de sopa (15g)																

GRUPOS DE ALIMENTOS	QTDE CONSUMIDA POR VEZ	FREQUENCIA DE CONSUMO														
		DIARIO				SEMANAL						MENSAL			R/N	
		1	2	3	≥ 4X	1	2	3	4	5	6	1	2	3		
Gergelim	() colher de sopa (15g)															
Chia	() colher de sopa (15g)															
Amendoim () cru () cozido () torrado	() ½ copo P descascado / copo casca (65g)															
Licuri	() unidade (3g)															
VEGETAIS																
Folhosos () cru () cozido () refogado () couve () agrião () rúcula ()	() folha M / colher de sopa rasa (20g)															
() alface	() folha M / colher de sopa rasa (10g)															
Banana da terra () cru () cozido () frita	() unidade P (200g)															
Batata-doce () cru () cozido () frita	() pedaço M / ½ unidade (60g)															
Jaca	() 4 bagos (120g)															
Fruta-pão () cru () cozido () frita	() pedaço médio / 1 xic chá (100g)															
Abacate (cru)	() colher de sopa ch picado(45g)															
TEMPEROS E CONDIMENTOS																
Mostarda	() colher de sopa rasa (11g)															
Catchup	() colher de sopa rasa (11g)															
Leite de coco	() colher de sopa rasa (10g)															
Molho para salada (industrializado)	() colher de sopa rasa (11g)															
Azeitona	() Unidades (4g)															
AÇÚCARES E DOCES																
Sorvete/ Picolé () Cremoso () Fruta	() Bola média / unidade (80g)															
Chocolate () Ao leite () Amargo () Meio Amargo () Com frutas () Com castanhas	() Barra pequena / 4 quadradinhos (30g) Bombom: qtde: _____															
BEBIDAS																
Café	() xícara de café (50mL)															
Cappuccino em pó () light () integral	() colher de sopa rasa (10g)															
() Chocolate - pó () Achocolatado - pó	() colher de sopa rasa (10g)															
COMIDAS REGIONAIS																
Caruru	() colher de sopa cheia (25g)															
Vatapá	() colher de sopa cheia (25g)															
Mariscada	() colher de sopa cheia (25g)															
Suplementos / Medicamentos	Nome / Marca	Quantidade consumida / dia						Data Inicio/Fim do consumo								
Oleo de peixe / fígado de bacalhau																
Polivitaminico / mineral																
Outro:																
Outro:																

APÊNDICE D

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Você está sendo convidada a participar como voluntária da pesquisa: **“Influência dos polimorfismos dos genes FADS no perfil materno de ácidos graxos de cadeia longa e no resultado obstétrico”**. Este estudo tem como finalidade o conhecimento de informações genéticas e do perfil de ácidos graxos no sangue materno, os quais podem influenciar no crescimento e desenvolvimento da criança ao nascer. Espera-se que este estudo auxilie no conhecimento sobre os fatores que podem influenciar no crescimento e desenvolvimento da criança ao nascer.

Os procedimentos que serão adotados na pesquisa são resumidos em: aplicação de questionários para obtenção de dados socioeconômicos e de estilo de vida; aplicação de inquérito dietético; avaliação antropométrica, por métodos não invasivos, da mãe (peso, estatura, circunferências abdominal) e da criança após o nascimento (peso, comprimento, circunferência cefálica); realização de exames laboratoriais para análise genética e do perfil de ácidos graxos de cadeia longa. Para a realização dos exames laboratoriais serão coletados aproximadamente 10 mL de sangue da veia do braço. O sangue coletado será armazenado até o término da pesquisa, para garantir a existência de amostra caso haja necessidade de repetir algumas avaliações que possam conter erros, inconsistências, ou discordâncias. Após finalizadas as atividades, o material será descartado.

As avaliações ocorrerão em dois momentos: o primeiro durante a gestação (até a 30ª semana gestacional), nas unidades de saúde ou clínicas, quando serão realizadas as avaliações antropométricas, bioquímicas e genéticas, e aplicado um questionário contendo informações socioeconômicas e demográficas, estado nutricional, consumo de medicamentos, e consumo de alimentos. O segundo momento ocorrerá após o parto, na maternidade ou em visitas domiciliares. Nessa etapa serão avaliadas as informações referentes ao recém-nascido (perinatal) e avaliação antropométrica da mãe.

Os resultados dos exames laboratoriais e os dados de saúde e nutrição da participante serão disponibilizados individualmente, em até um mês após cada uma das duas etapas, no ambulatório de nutrição materno infantil da UFRB, localizado no CENTROS AJ. A entrega dos resultados será feita após agendamento do dia e horário.

A população de estudo será constituída por mulheres clinicamente saudáveis, residentes e domiciliadas na zona urbana, com dezoito anos ou mais de idade, com idade gestacional menor ou igual a 30 semanas no momento da primeira entrevista, inscritas em serviços de pré-natal do SUS e privado. Serão excluídas as mulheres com gestação múltipla, as HIV positivas e as sem confirmação ultra-sonográfica da idade gestacional.

Não haverá nenhum tipo de intervenção que possa causar danos à saúde da criança ou da gestante. A participação é voluntária, e a gestante tem o direito de abandonar o estudo a qualquer momento sem justificativa. Em relação aos benefícios relacionados à participação, os resultados dos exames laboratoriais serão disponibilizados em via impressa e a equipe de saúde da família e as gestantes. Nos casos de deficiência nutricionais, a gestante será encaminhada para profissional médico da rede básica e nutricionista do Núcleo de Apoio a Saúde da Família e acompanhadas pela equipe de estudo.

Os riscos para as participantes podem estar relacionados à coleta de sangue, a presença de desconforto ou constrangimentos em função da aplicação do questionário, do tempo necessário para sua aplicação, a realização do exame físico, e a o entendimento sobre o resultado da informação genética. Para minimizar os riscos, todas as medidas serão tomadas para garantir a segurança e a saúde das participantes. A coleta sanguínea será realizada por um técnico laboratorista treinado, sendo utilizados apenas materiais descartáveis para tal procedimento. Para a aplicação dos questionários e a realização dos exames físicos, os alunos responsáveis por essa etapa serão treinados, a fim de que as atividades sejam mais ágeis/eficientes, e que se evitem expressões, gestos ou atitudes que causem possíveis constrangimentos às participantes. Ainda, as informações obtidas serão resguardadas, sendo informadas apenas à paciente. Além disso, os resultados das análises genéticas serão informados em linguagem simples e acessível, e explicada por profissional com ampla experiência nesse assunto em especial. Quando necessário, as participantes poderão ser encaminhadas para acompanhamento médico específico.

A realização desse estudo também propiciará benefícios às gestantes e às crianças, pois possibilitará o conhecimento, pela gestante, do seu estado de saúde geral, alimentação e nutrição durante a gravidez, bem como da criança ao nascer. Também possibilitará que a gestante identifique possíveis alterações genéticas que podem interferir na saúde da criança.

Os dados obtidos estarão disponíveis para a equipe envolvida na pesquisa e poderão ser publicados com a finalidade de divulgação das informações científicas obtidas, não sendo divulgada a identidade dos voluntários.

Informamos também que os materiais utilizados para a coleta de dados, serão guardados durante cinco anos pelas pesquisadoras-responsáveis.

Os pesquisadores envolvidos com o referido projeto são Prof^ª. Gisele Queiroz Carvalho e Djanilson Barbosa dos Santos, e com eles poderei manter contato pelo endereço e o telefone:

Endereço: Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – Centro de Ciências da Saúde

Avenida Carlos Amaral, nº 1015. Bairro: Cajueiro CEP:44570-000 Santo Antônio de Jesus - BA

Fone: (75) 3632- 4598.

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFRB

Endereço: Rua Rui Barbosa, 710, Campus Universitário, Centro, Cruz das Almas. CEP 44.380-000.

Telefone: (75) 3621-6850

E-mail: eticaempesquisa@ufrb.edu.br

De posse de todas as informações necessárias, concordo em participar do projeto, manifesto meu livre consentimento em participar, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, por minha participação.

Santo Antônio de Jesus, ____ de _____ de 20__.

Voluntário

Djanilson Barbosa dos Santos
Prof. Adjunto da UFRB

Gisele Queiroz Carvalho
Nutricionista: CRN 4168