

Instituto Oswaldo Cruz

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

ALAN CLAVELLAND OCHIONI

Análises de Polimorfismos dos genes de mediadores inflamatórios
envolvidos na obesidade.

Rio de Janeiro

2016

ALAN CLAVELLAND OCHIONI

Análises de Polimorfismos dos genes de mediadores inflamatórios
envolvidos na obesidade.

Dissertação apresentada ao corpo docente da
pós-graduação *Strictu Senso* nível de Mestrado
do Programa de Biologia Celular e Molecular
do Instituto Oswaldo Cruz como parte dos
requisitos necessários à obtenção do grau de
Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Dr. Pedro Hernan Cabello Acero

Rio De Janeiro

2016

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

O16 Ochioni, Alan Clavelland

Análise de polimorfismos dos genes de mediadores inflamatórios envolvidos na obesidade / Alan Clavelland Ochioni. – Rio de Janeiro, 2016.

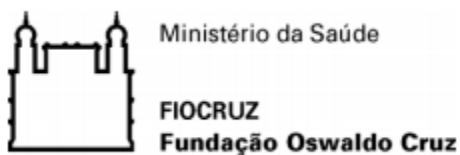
xvi, 117 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2016.

Bibliografia: f. 95-104

1. Inflamação. 2. Obesidade. 3. Polimorfismos. I. Título.

CDD 616.398



Instituto Oswaldo Cruz

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Alan Clavelland Ochioni

Análises de Polimorfismos dos genes de mediadores inflamatórios envolvidos na obesidade.

Orientador (es): Prof . Dr. Pedro Hernan Cabello Acero

Aprovado em: 20/05/2016

Examinadores:

Dr. Fernando Reglas Vargas - IOC/FIOCRUZ (Presidente)

Dr. Otacílio da Cruz Moreira - IOC/FIOCRUZ (Membro)

Dra. Christianne Bretas Vieira Scama Mello - UFF/RJ (Membro)

Dra. Fabiana Kohlrausch - UFF/RJ (Suplente)

Dr. Milton Ozório Moraes - IOC/FIOCRUZ (Suplente)

Rio de Janeiro, 20 de maio de 2016

Agradecimentos

Ao longo de minha vida, seja ela acadêmica ou não, sempre tive pessoas que ajudaram e acreditaram em mim e no meu potencial, por isso dedico a todas as pessoas importantes na minha vida, que eles sempre estejam comigo nos bons e maus momentos.

Agradeço primeiramente a Deus, por estar sempre me guiando e fazendo acreditar mesmo quando tudo está perdido, sempre colocou uma luz quando o caminho ficava difícil.

Agradeço aos meus pais Juracema Clavelland Ochioni e Antonio Ochioni Barbosa, por todo amor e carinho que me deram sempre desde a minha infância até aqui. E por sempre me ajudarem e me apoiarem em tudo o que fiz.

Agradeço a minha Irmã Aline Clavelland Ochioni e ao meu cunhado Victor Gall, por sempre me apoiarem e me ajudarem quando mais precisei.

Agradeço a minha avó que está no céu Olinda Baptista Clavelland por sempre me apoiar e amar como um filho, sei que sempre estará olhando por mim.

Agradeço ao Dr. Pedro Hernan Cabello Acero e a Dra Giselda Maria Kalil Cabello, que aceitaram me orientar e sempre me ajudaram na minha caminhada.

Agradeço aos meus amigos que são quase como irmãos para mim, que sempre estiveram comigo me ajudando nos maus momentos, em especial Rafael Gonçalo, Vinicius Rocha Miranda, Guilherme Calory, Daniel Mesquita e Pedro Henrique Sousa Fernandez, que Deus sempre ilumine o caminho deles.

Agradeço aos amigos que fiz no curso de mestrado, em especial Aline Processi, Gabrielly Sbrano, Fabrício da Mota, Natália Torres e Paula Finamore, por me ajudarem inclusive sendo minhas cobaias, sem vocês esse projeto não seria possível.

Agradeço a equipe do Laboratório de Genética Humana, que sempre tiveram toda a paciência do mundo para me ensinar e me aturar nesses anos todos em especial, Tatiane Duarte Cozendey, Laiza Cabral e Ana Carolina Proença, sem vocês jamais teria aprendido tanto.

Agradeço à toda a equipe da Graco em Especial, Marcos e a Rose que sempre me ajudaram com o recebimento dos pacientes e em qualquer ajuda durante as coletas.

Agradeço a equipe do Laboratório de Lipídeos da UERJ, pela análises bioquímicas e a colaboração feita ao longo do projeto.

E a todos que são importantes na minha vida e que me ajudaram na caminhada até aqui, mesmo que não tenham sido citados aqui, contribuíram para a pessoa que sou hoje.

RESUMO

Hoje em dia, a obesidade constitui-se num sério problema mundial de saúde e tem sido a maior causa de morbidade e mortalidade associada ao aumento do risco para algumas doenças comuns, como diabetes *mellitus* tipo 2, doenças cardiovasculares, hipertensão, certas formas de câncer e síndromes metabólicas. O aumento de peso surge através de ações conjuntas dos fatores ambientais e genéticos, em particular naqueles que já são geneticamente predispostos. Alguns estudos vêm investigando os fatores genéticos que predis põem a obesidade, porém os resultados ainda não são bem compreendidos. O presente trabalho tem como objetivo analisar alguns dos polimorfismos dos genes que codificam citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, quimiocinas e adipocitocinas. O estudo desses genes pode ajudar a definir um perfil de risco associado ao desenvolvimento de processos inflamatórios na obesidade e trazer expectativas de um desenvolvimento mais efetivo de prevenção e intervenção terapêutica. O estudo está sendo realizado a partir de 190 obesos e 180 eutróficos. As análises dos polimorfismos foram realizadas utilizando técnicas de biologia molecular tais como: PCR convencional, PCR-RFLP e PCR em tempo real. O sequenciamento foi realizado para a validação dos resultados encontrados por PCR convencional e RFLP. Resultados preliminares mostraram que no polimorfismo rs7799039, localizado na região promotora do gene *LEP*, o alelo G (selvagem) é um fator de risco para os obesos ($\chi^2=19,19$, $p<0,001$; OR=1,974). Outro polimorfismo (rs2167270) do mesmo gene apresentou o alelo mutado A como um fator de risco para a obesidade ($\chi^2=8,24$; $p=0,04$). Entretanto foram observados resultados significativos para a associação de outros polimorfismos nos genes *IL-6* (rs1800795) e *IL-10* (rs1800872), com comorbidades em obesos. Contudo, nossas análises revelaram que o polimorfismo rs1800795 do gene *IL-6* está influenciando a variável bioquímica LDL nos obesos ($p=0,02$) e este pode ser um fator de risco para a SM. A deleção de 14pb no polimorfismo rs3917887 do gene *MCP-1* apresenta efeitos significantes em variáveis como o IMC, HDL e LDL ($p=0,03$, $p=0,04$ e $p=0,05$, respectivamente) e da Proteína C Reativa (PCR) nos obesos. Além disso, análises baseadas na concentração da Proteína C-Reativa revelaram que os polimorfismos estudados podem estar associados ao risco de inflamação visto em obesos.

Palavras Chaves: Inflamação, Obesidade e Polimorfismos

ABSTRACT

Nowadays, obesity constitutes a serious global health problem and has been a major cause of morbidity and mortality associated with an increased risk for some common diseases such as type 2 diabetes, cardiovascular disease, hypertension, certain forms of cancer and metabolic syndrome (MS). Weight gain comes through joint actions of environmental and genetic factors, particularly to whom are already genetically predisposed. Some studies have investigated the genetic factors that predispose to obesity, but the results are not yet well understood. This study aims to analyze some of the polymorphisms of genes encoding proinflammatory cytokines, anti-inflammatory cytokines, chemokines and adipocytokines. The study of these genes can help define a risk profile associated with the development of inflammation in obesity and bring expectations of a more effective development of preventive and therapeutic intervention. The study is being conducted from 190 obese and 180 normal weight. The analyzes of the polymorphisms were carried out using molecular biology techniques such as conventional PCR, PCR-RFLP and PCR in real time. Preliminary results showed that in the polymorphism rs7799039, located in the promoter region of the LEP gene, the allele G (wild) is a risk factor for obesity ($\chi^2 = 19.19$, $p < 0.001$; OR = 1,974), another polymorphism (rs2167270) also in the same gene show the mutated allele as a risk factor for obesity ($\chi^2 = 8.24$; $p = 0.04$). However we did not show significant results for an association of polymorphisms in other genes such as IL-6 (rs1800797), IL-10 (rs1800872), TNF- α (rs180629) and MCP-1 (rs3917887) for the development of other co-morbidities in obese. However our analyzes revealed that the rs1800795 polymorphism of the IL-6 gene is influencing LDL in obese patients ($p = 0.02$) and this can be a risk factor for MS. On the other hand, deletion of 14pb in rs3917887 polymorphism of *MCP-1* gene show significant effects on variables such as BMI, HDL and LDL ($p = 0.03$, $p = 0.04$ and $p = 0.05$ respectively) and Protein C-reactive (PCR) in obese. Furthermore, analysis based on the concentration of the PCR revealed that the studied polymorphisms may be associated with the risk of inflammation in obese subjects.

Keywords: Inflammation, Obesity and Polymorphism

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 Valores de IMC e a faixa de peso que cada um representa	5
Tabela 3.1. Identificação e quantificação das principais variáveis bioquímicas, utilizadas.....	25
Tabela 3.2 Níveis de inflamação baseados na concentração de PCR.....	26
Tabela 3.3: Valores correspondentes para os critérios de diagnóstico de Síndrome Metabólica.....	27
Tabela 3.4. Informações sobre os primers utilizados nos experimentos.....	29
Tabela 3.5 Protocolos utilizados para a amplificação dos polimorfismos do gene <i>LEP</i>	30
Tabela 3.6. Protocolo de digestão enzimática para os polimorfismos do gene <i>LEP</i>	31
Tabela 3.7 Protocolo de amplificação da região onde ocorre a deleção no gene <i>MCP-1</i>	32
Tabela 3.8 Dados sobre as sondas usadas no estudo.....	33
Tabela 4.1 Variáveis Bioquímicas, antropométricas e pressóricas.....	36
Tabela 4.2 Perfil clínico em nossas amostras.....	37
Tabela 4.3 Variáveis bioquímicas antropométricas e pressóricas para eutróficos.	41
Tabela 4.4 Variáveis bioquímicas antropométricas e pressóricas para os obesos.	42
Tabela 4.5 Associação do polimorfismo com variáveis, antropométricas, bioquímicas e pressóricas em eutróficos.....	47
Tabela 4.6 Associação do polimorfismo com variáveis, antropométricas, bioquímicas e pressóricas em obesos.....	48
Tabela 4.7 Associação do polimorfismo com variáveis, antropométricas, bioquímicas e pressóricas em eutróficos.....	53
Tabela 4.8 Associação do polimorfismo com variáveis, antropométricas, bioquímicas e pressóricas em obesos.....	54
Tabela 4.9 Associação do rs1800795 da Interleucina 6 em relação ao Diabetes, SM e Hipertensão, na amostra de obesos totais.....	55
Tabela 4.10 Correlação do rs1800795 em relação ao Diabetes, SM e Hipertensão, na amostra de obesos de grau 2 e 3.....	55
Tabela 4.11 Análise de associação do rs1800795 em relação ao Diabetes, SM e Hipertensão, na amostra de obesos mórbidos.....	56

Tabela 4.12 Associação do polimorfismo com variáveis, antropométricas, bioquímicas e pressóricas em eutróficos.....	60
Tabela 4.13 Associação do polimorfismo com variáveis, antropométricas, bioquímicas e pressóricas em obesos.....	61
Tabela 4.14 Análise de associação do rs1800872 em relação ao Diabetes, SM e Hipertensão, na amostra total dos obesos.....	62
Tabela 4.15 Associação do polimorfismo com variáveis, antropométricas, bioquímicas e pressóricas em eutróficos.....	66
Tabela 4.16 Associação do polimorfismo com variáveis, antropométricas, bioquímicas e pressóricas em obesos.....	67
Tabela 4.17 Associação do polimorfismo com variáveis, antropométricas, bioquímicas e pressóricas em eutróficos.....	72
Tabela 4.18 Associação do polimorfismo com variáveis, antropométricas, bioquímicas e pressóricas em obesos.....	73
Tabela 4.19 Associação do polimorfismo com variáveis, antropométricas, bioquímicas e pressóricas em eutróficos... ..	77
Tabela 4.20 Associação do polimorfismo com variáveis, antropométricas, bioquímicas e pressóricas em obesos.....	78
Tabela 4.21 Análise de associação com os diferentes parâmetros de inflamação entre os grupos.....	80
Tabela 4.22 Análise de associação com os diferentes parâmetros de inflamação entre graus de obesidade.....	80
Tabela 4.23. Resultado para a regressão feita correlacionando a soma dos alelos de risco com a concentração de PCR.....	82

LISTA DE FIGURAS

Fig 1.1 Contribuição de fatores genéticos e ambientais no ganho de peso.....	6
Fig 1.2. Adipocinas e inflamação metabólica no tecido adiposo.....	12
Fig.1.3 – Estrutura cristalográfica depositada no PDB da leptina.....	15
Fig 1.4. Efeitos da liberação de mediadores inflamatórios sobre os efeitos da insulina.....	17
Fig.4.1 Gráfico de amplificação multicomponente.....	39
Fig.4.2 Distribuição das Frequências Genotípicas entre os grupos do polimorfismo rs1800629 do gene <i>TNF</i>	40
Fig.4.3 Gráfico de Frequências Alélicas entre os grupos para o polimorfismo rs1800629 do gene <i>TNF</i>	40
Fig.4.4 Gráficos Multicomponentes para o polimorfismo rs1800797 da IL-6.....	45
Fig. 4.5 Frequências genotípicas relativas ao rs1800797.....	46
Fig.4.6 Frequências Alélicas do polimorfismo rs1800797.....	46
Fig.4.7 Gráficos de amplificação do polimorfismo rs1800795	51
Fig.4.8 Frequências Genotípicas da variante rs1800795.....	52
Fig.4.9. Frequências alélicas do polimorfismo rs1800795.....	52
Fig.4.10 Ampliação do polimorfismo rs1800872	58
Fig.4.11. Frequências Genotípicas no polimorfismo rs1800872.....	58
Fig. 4.12. Distribuição das frequências alélicas entre os grupos do polimorfismo rs1800872.....	59
Fig.4.13. A amplificação da região que contém o polimorfismo rs7799039 do gene <i>LEP</i>	64
Fig.4.14. Frequências genotípicas encontradas em nosso estudo para o polimorfismo rs7799039 do gene <i>LEP</i>	65
Fig. 4.15. Frequências alélicas para o polimorfismo rs7799039 do gene <i>LEP</i>	65
Fig. 4.16. Resultado da amplificação da região contendo o polimorfismo rs2167270.....	70
Fig.4.17 Frequências genotípicas polimorfismo rs2167270 do gene <i>LEP</i>	71
Fig.4.18. Frequências alélicas do polimorfismo rs2167270 do gene <i>LEP</i>	71
Fig.4.19 Padrão de amplificação da deleção de 14pb no gene <i>MCP-1</i>	75
Fig.4.20 Frequências genotípicas para a deleção rs3917887.....	76

Fig.4.21 Frequências Alélicas para a deleção rs3917887.....	76
Fig.4.22 Digrama de dispersão da variação dos níveis inflamatórios em conjunto com a soma dos alelos de risco.....	81

LISTA DE APÊNDICES

Polimorfismos moleculares em genes associados à obesidade e síndrome metabólica	
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	105
Ficha de dados dos Pacientes.....	110
Formulário para o Paciente.....	113

LISTA DE SIGLAS

ATP	Adenosina Tri-Fosfato
AG	Ácidos Graxos
AKT	Proteína Quinase B
DCV	Doenças Cardiovasculares
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
LEP	Leptina
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral
IL-6	Interleucina – 6
IL-10	Interleucina – 10
MCP-1	Proteína Químioatraente de monócitos 1
GLUT-4	Transportador de glicose tipo 4
PCR	Proteína C Reativa
PCR- Convencional	Reação em Cadeia da Polimerase convencional
PCR-RFLP	Reação em cadeia da polimerase e Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real
TCLE	Termo de Consentimento Livre Esclarecido
UERJ	Universidade Estadual do Rio de Janeiro
LDL	Lipoproteínas de Baixa Densidade
HDL	Lipoproteínas de Alta Densidade
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
DM2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
SM	Síndrome Metabólica
NEB	Tampão de reação para enzima de restrição
OR	Odd Ratio
PKC	Proteína quinase C
mTOR	Alvo de Rampamicina
SRI	Receptor de Insulina

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
1.1. O que é a obesidade?!	1
1.1.1. Fatores ambientais conduzem ao aumento da obesidade.....	5
1.2 Epidemiologia.....	7
1.3. Tecido adiposo e comorbidades relacionadas à obesidade.....	8
1.4. Obesidade e inflamação.....	10
1.5. Fatores genéticos X Ambiente na obesidade.....	13
1.5.1 Genes Candidatos.....	13
1.5.1.1 Gene <i>LEP</i>	13
1.5.1.2 Gene <i>TNF</i>	16
1.5.1.3 Gene <i>IL6</i>	18
1.5.1.4 Gene <i>IL10</i>	19
1.5.1.5 Gene <i>CCL2</i>	20
2. Objetivos.....	22
2.1 Objetivos Gerais.....	22
2.2 Objetivos Específicos.....	22
3. Material e Métodos.....	23
3.1. Fluxograma de Trabalho.....	23
3.2. Determinação da amostra.....	23
3.2.1 Distingão das amostras.....	23
3.2.2. Coleta de Amostras.....	24
3.2.3. Obtenção das Medidas Antropométricas.....	24
3.2.3.1 Índice de Massa Corpóreo (IMC).....	24
3.2.3.2 Medidas da circunferência da cintura e quadril.....	24
3.2.4. Análises Bioquímicas.....	24
3.2.4.1. Proteína C Reativa e inflamação.....	26
3.2.5. Seleção de Comorbidades em obesos.....	26
3.2.5.1. Síndrome Metabólica.....	26
3.2.5.2. Hipertensão.....	27
3.2.5.3. Diabetes mellitus tipo 2.....	27
3.2.6. Estudo genético dos polimorfismos envolvidos.....	27
3.2.6.1 Extração de DNA.....	27

3.2.6.2 Desenho de Oligonucleotídeos.....	29
3.2.6.3 Métodos de Rastreamento de Polimorfismos.....	30
3.2.6.3.1 PCR convencional e PCR – RFLP.....	30
3.2.6.3.2 PCR em tempo real.....	32
3.2.7 Análises Bioestatísticas.....	34
4. Resultados	35
4.1. Perfil das amostras.....	35
4.2. Gene <i>TNF-α</i> Polimorfismo rs1800629.....	38
4.3. Polimorfismos no Gene <i>IL-6</i>	44
4.4.- Polimorfismo rs1800872 do Gene <i>IL-10</i>	57
4.5. Polimorfismos do gene <i>LEP</i>	63
4.6 Gene <i>CCL2</i> rs3917887.....	75
4.7. Análise de risco inflamatório com base nos parâmetros de PCR (Proteína C reativa).....	80
5. Discussão.....	83
5.1O Polimorfismo rs1800629 do gene Fator de Necrose Tumoral(<i>TNF</i>).....	83
5.2O Polimorfismo rs1800797 do gene Interleucina 6 (<i>IL6</i>).....	85
5.3O Polimorfismo rs1800795 do gene Interleucina 6 (<i>IL6</i>).....	86
5.4 O Polimorfismo rs1800872 do gene Interleucina 10 (<i>IL10</i>).....	87
5.5 A deleção rs3917887 do gene <i>CCL2</i> (<i>MCP-1</i>).....	89
5.6 Os polimorfismos rs7799039 e rs2167270 do gene da leptina (<i>LEP</i>).....	90
5.7Correlação entre os polimorfismos e o risco de inflamação.....	93
6. Conclusões.....	94
7. Referências Bibliográficas.....	95
8. Apêndices.....	105

1. Introdução

1.1. O que é a obesidade?!

A obesidade é definida como sendo o acúmulo anormal de gordura no corpo que pode prejudicar a saúde. Esta doença é geralmente o resultado de um desbalanço entre as calorias ingeridas e as calorias gastas, ou seja, se aumentarmos a ingestão de alimentos calóricos sem o aumento da atividade física teremos como consequência o aumento de peso (WHO, 2015).

Todas as células são dependentes da síntese de Adenosina Tri-Fosfato (sigla do inglês ATP) para realizar seus processos de gasto de energia. A formação de ATP pela Adenosina Di-Fosfato (Sigla do Inglês ADP) requer energia que é fornecida pelo gradual catabolismo enzimático de macronutrientes – glicose, ácidos graxos (AG) e aminoácidos. As células com mitocôndrias funcionais, que não estão privadas de oxigênio, podem gerar grandes quantidades de ATP a partir da oxidação de glicose e AGs e, em certas circunstâncias, de aminoácidos. Na ausência de mitocôndrias (por exemplo, em eritrócitos) e durante isquemia/hipóxia, pequenas quantidades de ATP são sintetizadas – através da via glicolítica e metabolismo anaeróbico. A natureza intermitente da disponibilidade de nutrientes (antes da revolução industrial) e a variação de gasto de energia de um organismo (por exemplo, no repouso ou, no caso oposto, durante exercício físico ou infecção) necessitavam de vias metabólicas de oxidação, estocagem e distribuição de substratos de energéticos específicos para cada cenário (BOTHAM, 2006). Com o aumento da concentração de glicose no plasma, seguida da ingestão de carboidratos, as células, apropriadamente, desligam as vias de catabolismos de ácidos graxos, proteína e glicogênio e ajustam a ingestão e oxidação da glicose. Quando existe estoque de glicose que excede as necessidades energéticas, as células metabolicamente ativas também respondem pela sintetização de energia armazenada, ou seja: glicogênio (pela polimerização da glicose), ácidos graxos (lipogênese de novo da glicose) e triglicérides (de ácidos graxos e glicerol). Os aminoácidos são poupados da oxidação, sendo preferencialmente utilizados na síntese de proteínas.

A insulina é o principal hormônio responsável por coordenar o ajuste pós-prandial na utilização, estocagem e priorização do substrato (RASMUSSEN *et al.*, 1990). A insulina é um hormônio polipeptídico sintetizado por um subgrupo de células pancreáticas endócrinas que residem nas ilhotas de Langerhans, denominadas células

beta. Em pessoas saudáveis, a secreção de insulina está acoplada à disponibilidade de ATP dentro das células beta. Como em outras células funcionais, a disponibilidade de substratos fornecedores de energia determina a produção de ATP, e um aumento da glicose no plasma após a ingestão de carboidratos é o mais poderoso estímulo para a secreção de insulina. A insulina circulante se liga a seus receptores associados, o qual é predominantemente expresso por órgãos altamente metabólicos/células, incluindo os tecidos musculares/miócitos, o tecido adiposo/adipócitos, e o fígado/hepatócitos. O receptor de insulina ativado traduz um sinal via cascata de substratos receptores de insulina (SRIs) e Proteína-quinases ativadas por mitógenos (sigla do inglês MAP quinase). A maioria dos efeitos metabólicos da insulina são posteriores aos SRIs. As proteínas Serina quinases (como por exemplo, as proteínas quinases atípicas: Proteína quinase B, proteína quinase DNA-dependente, Proteína quinase C, do inglês PKB, AKT, PKC, respectivamente e proteínas alvo de rapamicina – do inglês mTOR) são alvos posteriores ao SRIs, os quais modulam a atividade (através da fosforilação da enzima) e expressão (através da transcrição do fator de fosforilação) das enzimas que executam o comando da insulina para “utilizar a glicose agora, ou construir proteínas ou estocar energia para o futuro”. Com o passar do tempo, desde a última refeição (isto é, estado pós-absortivo), a concentração plasmática de glicose gradualmente diminui, devido ao consumo mediado pela insulina nos músculos e tecido adiposo. Em resposta, as células beta secretam menos insulina. Contudo, a insulina continua a regular o metabolismo em concentrações baixas, pós-absortivas, inibindo a produção de glicose pelo fígado (gluconeogênese) e a liberação de AGs livres pelo tecido adiposo (lipólise) até que as concentrações de glicose e insulina estejam muito baixas (SHAPIRO *et al.* 2011).

A resistência à insulina caracteriza-se por um decréscimo na sinalização da insulina, principalmente no eixo de substratos do receptor de insulina (SRIs) / Fosfatidil inositol-Trifosfato, do inglês PI-3-quinase / PKB, que são responsáveis pela maior parte das ações metabólicas do hormônio (TANIGUCHI *et al.*, 2006). Hoje, é reconhecido que uma inflamação sistêmica crônica e local de baixo grau, que se desenvolve durante a obesidade, pode ligar a obesidade ao desenvolvimento de resistência à insulina (GREGOR & HOTAMISLIGIL, 2011). Este estado inflamatório tem sido relatado em diferentes órgãos envolvidos no controle da homeostase metabólica, incluindo o tecido adiposo, fígado, pâncreas endócrino, hipotálamo, e possivelmente músculos

esqueléticos. A inflamação crônica é causada por um excesso de ingestão de nutrientes e foi nomeada como inflamação metabólica ou meta-inflamação, isto é, inflamação e resistência à insulina (GREGOR & HOTAMISLIGIL, 2011). Vários fatores dietéticos, incluindo os ácidos graxos saturados e glicose, assim como uma mudança na microbiota intestinal, têm sido propostos como gatilhos desta inflamação que envolve as células metabólicas, tais como adipócitos, e uma mudança na população de células imunitárias em tecidos metabólicos (LOLMEDE *et al.*, 2011; BERTOLA *et al.*, 2012; SUN *et al.*, 2012). A hipóxia que se desenvolve no tecido adiposo também poderia participar na sua inflamação e foi recentemente envolvida na resistência à insulina de adipócitos (REGAZZETTI *et al.*, 2009; WOOD *et al.*, 2009). Estes estados patológicos estão fortemente associados com a resistência à insulina e hiperinsulinemia. Com base nos esforços das pesquisas durante as últimas duas décadas, foram observados notáveis desenvolvimentos na investigação da resistência à insulina induzida pela obesidade, especialmente nos termos dos mecanismos envolvidos, alguns dos quais se acredita que podem levar ao tratamento da doença. Entre estes, a inflamação crônica de baixo grau na obesidade é um dos conceitos recém-identificados mais inovadores. A via metabólica e a via de resposta imune, que são fortemente conservadas evolutivamente entre espécies, têm mostrado estarem fortemente associadas, umas com as outras, no desenvolvimento da obesidade induzida por resistência à insulina (TATEYA *et al.*, 2013). De fato, qualquer desequilíbrio ou alteração que possa ocorrer na via metabólica, pode levar o indivíduo a desenvolver enfermidades que não somente estão relacionadas ao metabolismo como também ao sistema imune.

A obesidade, portanto, resulta de um prolongado balanço energético positivo, ou seja, uma ingestão contínua de calorias que excede significativamente o gasto energético. O ganho de peso na obesidade é principalmente uma consequência do acúmulo de AGs da dieta ou a partir de lipogênese *de novo* armazenada como triglicerídeos no tecido adiposo branco (TAB). Nos seres humanos, o TAB responde a um fornecimento excessivo de ácidos graxos através da hipertrofia - predominantemente um aumento em tamanho de gotículas de gordura em menor extensão por meio da diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos maduros, isto é hiperplasia (SPALDING *et al.*, 2008). Este acúmulo indevido de gordura em órgãos, como o coração, torna a obesidade um fator de risco para o desenvolvimento de outras doenças como: as

cardiovasculares, a hipertensão e o diabetes (CAROBBIO *et al.*, 2011; GAAL *et al.*, 2006; HAJER *et al.*, 2008).

O excesso de deposição de gordura ou adiposidade, particularmente na região abdominal do corpo, tem sido associado como um fator de risco para o desenvolvimento de resistência à insulina, que pode levar ao diabetes *mellitus* tipo 2, e dislipidemia que pode levar a doenças cardiovasculares (ARONNE, 2002). Por conta disso, é importante a utilização de métodos para avaliar a composição de gordura corpórea (PHILLIPS *et al.*, 2013).

Enquanto a quantificação absoluta de massa gorda é geralmente realizada somente no ambiente de pesquisa, o índice de massa corporal (IMC; peso em kg / altura em metros²) é um marcador útil. Usando a definição da Organização Mundial de Saúde (OMS), um IMC igual ou maior do que 30 kg / m² define a obesidade. Dados epidemiológicos mostram que 30% dos norte-americanos e 10% -20% dos europeus são classificados como obesos, sendo que esta prevalência vem aumentando em muitos países em desenvolvimento, como o Brasil (WHO, 2015). A tabela 1.1 mostra as faixas de peso com base nos valores de IMC. Ainda que muito utilizada como diagnóstico de obesidade, o IMC pode ser impreciso quando avaliamos um atleta que apresenta um valor de IMC igual ao de um obeso, pois, neste caso existe um aumento não de gordura e sim de massa muscular (SUNYER, 2000).

Existem diversos métodos para avaliar a massa corporal, sendo uma delas a utilização de medidas antropométricas. Os primeiros métodos a serem utilizados foram as medidas de dobras cutâneas pelo corpo, onde os valores eram colocados em fórmulas matemáticas e convertidos em valores de gordura corporal, mas esta ferramenta não era tão precisa quando a obesidade aumentava.

Tabela 1.1 Valores de IMC e a faixa de peso que cada um representa.

Classificação com base no IMC	
Abaixo do Peso	<18,5
Peso Normal	18,5 – 24,9
Sobrepeso	≥25,0 – 29,9
Obesidade	≥30,0
Obesidade grau 1	30,0 – 34,9
Obesidade grau 2	35,0 – 39,9
Obesidade grau 3	≥40,0

Fonte: WHO, 2014.

1.1.1. Fatores ambientais conduzem ao aumento da obesidade

Dados mostram que há um aumento da prevalência da obesidade em todo o mundo. Atualmente se sabe que há uma relação inversa entre obesidade e classe socioeconômica, bem como uma tendência secular em direção à obesidade crescente em países em desenvolvimento (OGDEN *et al.*, 2014; POPKIN, 2006). A adoção de estilos de vida relativamente sedentários, devido à reduzida atividade física no trabalho e no lazer, em conjunto com uma abundância de alimentos ricos em energia, é um dos maiores fatores de risco para a saúde em todo o mundo.

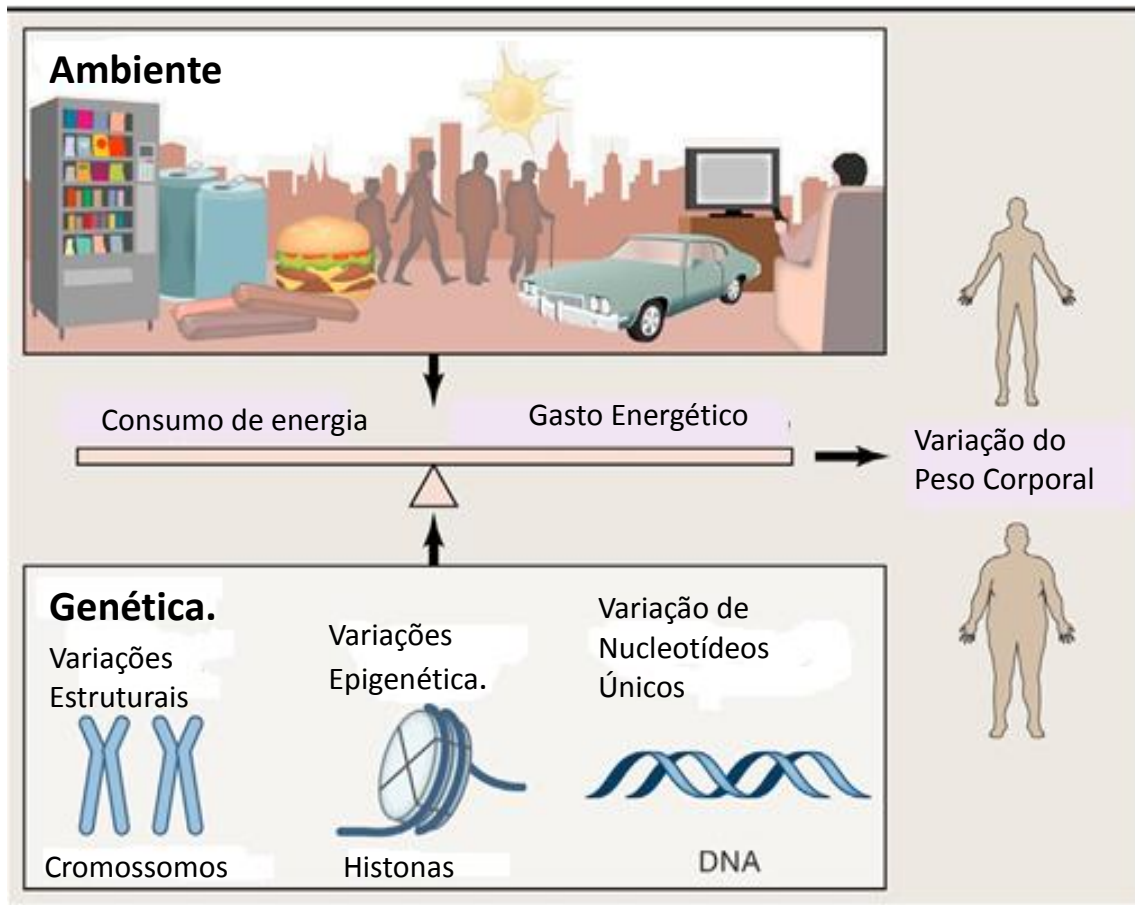


Fig 1.1 Contribuição de fatores genéticos e ambientais no ganho de peso
 Fonte: VAN DER KLAUW & FAROOQI. (2015). *The Hunger Genes: Pathways to Obesity*. Cell, 161(1): 119 – 132.

Curiosamente, algumas análises recentes de prevalência de obesidade sugeriram uma queda ou estabilização da prevalência desta doença, em crianças nos EUA e em alguns países europeus (OGDEN *et al.*, 2014; THOMAS *et al.*, 2014). No entanto, em muitos países, a prevalência tem aumentado, como, por exemplo, a China. Estudos recentes mostram que a segunda geração de migrantes para os EUA são mais pesados do que seus pais que migraram, observando-se, ainda, que alguns grupos étnicos são mais propensos a ganhar peso do que outros, em ambientes obesogênicos (SINGH & LIN, 2013), sugerindo que fatores genéticos desempenham um papel na influência da susceptibilidade à obesidade.

Apesar de muitos acharem que a obesidade é um problema de comportamento alimentar exagerado e nenhuma força de vontade por parte do obeso, há alguns estudos

importantes que demonstram que os fatores genéticos desempenham um papel relevante na determinação do peso corporal. O aumento de peso surge através de ações conjuntas dos fatores ambientais e genéticos, onde variações em genes importantes podem contribuir para o desenvolvimento da obesidade (RAHILLY & FAROOQI, 2006; SHAWKY & SADIK, 2012).

1.2. Epidemiologia

A obesidade é uma pandemia do século XX. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (2014) 1,9 bilhões (39%) de adultos acima dos 18 anos estavam acima do peso. Dentre esses, mais de 600 milhões (13%) eram obesos. Em relação à obesidade infantil (2013), 42 milhões de crianças estavam acima do peso ou com obesidade (WHO, 2014).

Embora a obesidade seja considerada um problema que acomete, principalmente, países de renda elevada, ela está também em ascensão em países de média e baixa renda, especialmente em áreas urbanas. Ainda segundo a OMS, nos países em desenvolvimento, a taxa de sobrepeso e de obesidade infantil tem sido maior do que 30%. A maioria da população vive em lugares onde a obesidade mata mais do que a subnutrição. Esse aumento do número de mortes causadas pela obesidade se deve ao fato de que, indivíduos obesos têm maiores chances de desenvolver outras doenças, tais como as cardiovasculares (DCVs) e a diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2). Em 2012, as DCVs foram uma das principais causas de morte e estima-se que pelo menos 1,5 milhões de mortes foram causadas diretamente pelo DM2 (WHO, 2012).

No Brasil, a taxa de obesidade está estável, porém o número de brasileiros que estão acima do peso é cada vez maior. Segundo uma pesquisa realizada pelo próprio Ministério da Saúde (2014), 52,5% da população brasileira está acima do peso, sendo essa taxa, em 2006, de 43%. Outro dado preocupante é o fato da obesidade ser um fator de risco para doenças como diabetes, hipertensão e cardiovasculares que correspondem a 72% dos óbitos no Brasil (MS, 2015).

De acordo com o estudo acima, os índices de excesso de peso são mais observados na população masculina com 56,5%, do que na feminina cujos índices correspondem a 49,1%. Com relação aos adultos entre os 18-24 anos, 38% estão acima

do peso; por outro lado, nos adultos entre 45 – 64 anos aproximadamente 61% estão acima do peso.

Além do excesso de peso, outros indicadores levantados pela pesquisa mostraram que estas pessoas apresentam outros fatores de risco para doenças crônicas. Do total relatado, 20% tem o diagnóstico de colesterol alto, 22,2% das mulheres apresentaram este quadro contra 17,6% dos homens. Estes dados revelam o quão preocupante é a prevalência de obesidade em nossa sociedade nos dias atuais, não somente pelo fato de trazer um incomodo pelo excesso de peso, mas também estar relacionada com fatores de risco para o desenvolvimento de outras doenças mais graves.

1.3. Tecido adiposo e comorbidades relacionadas à obesidade.

O tecido adiposo é um tipo de tecido especial de tecido conjuntivo, formado por células chamadas de adipócitos que podem ser encontradas isoladas, embora a maioria delas esteja sob a forma de agregados (NELSON & COX, 2014). Este tecido representa o maior depósito de energia na forma de triglicérides, já que os depósitos de glicogênio são menores do que estes (NELSON & COX, 2014). O tecido adiposo possui as mais diversas funções, como isolante térmico, proteção contra choque mecânico e preenchimento de espaços no corpo, mantendo os órgãos no lugar (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). Basicamente o tecido adiposo é classificado em três tipos: Branco, Marrom e Bege, cujas funções são diferentes.

O tecido adiposo branco é metabolicamente ativo no corpo, e é responsável por armazenar gordura na forma de triglicérides e secretar fatores que atuam no metabolismo (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). O tecido adiposo pardo ou marrom é um tecido muito encontrado em animais que hibernam, pois este é especializado em produzir calor; possui muitas gotículas de gordura e muitas mitocôndrias. Na espécie humana, é encontrado principalmente em recém-nascidos, para auxiliar na termorregulação; quando estimulado, este promove a oxidação de ácidos graxos que produz calor ao invés de ATP e assim mantendo a temperatura corporal estável (SIPPEL *et al.*, 2014).

O tecido adiposo é um dos mais importantes para a manutenção da homeostasia correta da massa corporal. Antigamente se achava que este tecido era apenas para armazenagem de gordura e reserva energética, porém hoje se sabe que ele atua

principalmente na regulação entre a inibição do comportamento alimentar e no aumento do gasto energético (NELSON & COX, 2014). Este mecanismo de ação do tecido adiposo é realizado através de fatores que são liberados por este tecido (GALIC *et al.*, 2010). Estudos subsequentes mostraram que esses fatores que são liberados por este tecido eram na verdade hormônios, que mais tarde seriam conhecidos como adipocinas, as quais são secretadas principalmente pelo tecido adiposo branco, sendo assim o tecido adiposo um importante órgão endócrino (NELSON & COX, 2014).

As adipocinas produzidas pelo tecido adiposo podem ter tanto ação local (autócrina e parácrina), como também ação sistêmica (endócrina), levando informações para outros tecidos como o nervoso, alertando sobre o estado nutricional do organismo (NELSON & COX, 2014). As adipocinas normalmente produzem mudanças no metabolismo energético e no comportamento alimentar, as quais restauram as reservas adequadas e mantêm a massa corporal. Quando as adipocinas são sub ou superexpressas, este descontrole pode resultar em diversas consequências e pode contribuir para o aparecimento de doenças como a obesidade e diabetes (GALIC *et al.*, 2010).

Diversas comorbidades estão relacionadas à obesidade, e muitas delas são causadas por alterações no metabolismo, que podem ser por conta de mudanças na expressão de adipocinas. Dentre elas se destacam a síndrome metabólica que é caracterizada por obesidade especialmente abdominal, hipertensão, lipídeos sanguíneos anormais (altos níveis de Triacilglicerol-TAG- e LDL, e baixo nível de HDL) e glicose sanguínea levemente elevada (MOTIE *et al.*, 2014; KROSRABI *et al.*, 2013; DESPRÉS & LEMIEUX, 2006).

O excesso de ingestão calórica em pessoas obesas faz com que os adipócitos fiquem repletos de TAG, tornando o tecido adiposo incapaz de receber uma demanda aumentada para estocar TAG. O tecido adiposo repleto de lipídeos libera fatores que atraem macrófagos, estes desencadeiam resposta inflamatória (GRANT & DIXIT, 2015), que prejudica a deposição de ácidos graxos nos adipócitos e com isso favorece sua liberação para a corrente sanguínea, contribuindo assim para o acúmulo de gordura em outros órgãos, acarretando problemas (GRANT & DIXIT, 2015; DEBOER, 2013).

De fato, a resposta inflamatória crônica, gerada por alterações na produção de citocinas e adipocinas pró-inflamatórias pelo tecido adiposo, pode causar outras doenças

como exemplo, a diabetes tipo 2, na qual muitos mediadores inflamatórios que são produzidos atuam inibindo a sinalização de insulina, ocasionando um evento chamado de resistência à insulina (HEREDIA *et al.*, 2012). Esta resistência é a incapacidade do receptor de insulina se ligar a ela, aumentando assim a concentração de glicose plasmática e levando o indivíduo a ter diabetes *mellitus* tipo 2. Uma questão bastante intrigante é que existem muitos obesos que não tem diabetes, sendo uma razão ainda pouco compreendida (BEEK *et al.*, 2014; NELSON & COX, 2014).

1.4 Obesidade e inflamação

Na imunologia clássica, a inflamação é definida como sendo uma cascata de eventos imunológicos, que são ativados em resposta a uma determinada lesão tecidual (ABBAS *et al.*, 2008). O evento inflamatório é regulado por diversas proteínas que são liberadas pelo tecido lesionado ou por células do sistema imune que atuam na reparação do tecido. Essas proteínas, chamadas de mediadores inflamatórios, atuam em diversas vias do processo inflamatório, atraindo células para o local da lesão ou infecção num processo chamado de quimiotaxia, ou então atuam na ativação de outras células do sistema imune (LEE, 2013).

Dentre os mediadores inflamatórios, se destacam principalmente as citocinas e quimiocinas, que podem ser divididas em pró e anti-inflamatórias, e são proteínas que tanto podem promover o processo inflamatório como também podem inibi-lo. Sabe-se que o balanço entre esses fatores garante a eficiência do processo inflamatório no combate a lesões ou infecções. Diversas doenças são relacionadas a processos inflamatórios intensos, muitas associadas à desregulação da produção coordenada de citocinas que podem levar a efeitos indesejados (LEE, 2013); dentre algumas doenças, se destacam o diabetes *mellitus* tipo 2, artrite reumatoide, alguns casos de câncer e obesidade.

A obesidade, como dita anteriormente, é caracterizada por uma série de desordens metabólicas que ocorrem no organismo. Com o passar dos anos diversos estudos mostraram que dentre estas desordens a obesidade também está associada a um estado de inflamação crônica (VIELMA *et al.*, 2013). Este estado é resultado da ativação duradoura do sistema imune, através do recrutamento de células imunes para o tecido adiposo (STEPIEN *et al.*, 2014). Contudo, quando falamos em obesidade temos que entender que o processo inflamatório também pode ser iniciado por desequilíbrios

no metabolismo que conseqüentemente pode provocar o aumento de mediadores pró-inflamatórios (YOUCEF *et al.*, 2013). Este processo inflamatório nos obesos foi definido por GREGOR & HOTAMISLIGIL, em 2011 como “inflamação metabólica” onde o processo inflamatório na obesidade é iniciado por células imunes e metabólicas em resposta ao consumo excessivo de nutrientes, evidenciando o papel dos adipócitos no processo de inflamação. Atualmente, sabe-se que o tecido adiposo é um órgão endócrino e é responsável pela homeostase corporal, pois secreta diversas proteínas que regulam processos metabólicos importantes. Dentre estas, as mais conhecidas são as citocinas inflamatórias, principalmente a interleucina 6 ou IL-6, o fator de necrose tumoral do inglês TNF- α e a proteína quimioatraente de monócitos 1 do inglês MCP-1, que são citocinas pró-inflamatórias. Alguns estudos mostraram que, estas citocinas estavam em níveis aumentados em obesos, contribuindo para o desenvolvimento do processo inflamatório (STEPIEN *et al.*, 2014; YOUCEF *et al.*, 2013; WIESER *et al.*, 2013). Além disso, o tecido adiposo também secreta outras citocinas que regulam o processo inflamatório, como a interleucina 10 ou IL-10, que é uma citocina anti-inflamatória. No entanto, estudos mostraram que os níveis de IL-10 estão diminuídos nos obesos.

Uma das principais características da inflamação observada em obesos é a migração de células, principalmente macrófagos, para o tecido adiposo. Esta sinalização é feita pelos mediadores inflamatórios que contribuem ainda mais para o desenvolvimento da inflamação. Em estudos realizados em humanos e camundongos, foram identificados dois subtipos bem característicos de macrófagos (M1 e M2). Nestes estudos, eles ainda observaram que a sinalização feita pelos macrófagos aumentava a produção de mediadores inflamatórios (OTA, 2013), dessa forma contribuindo para o desenvolvimento e ampliação da inflamação (Figura 1.2) como mostra a figura retirada de CAO (2014).

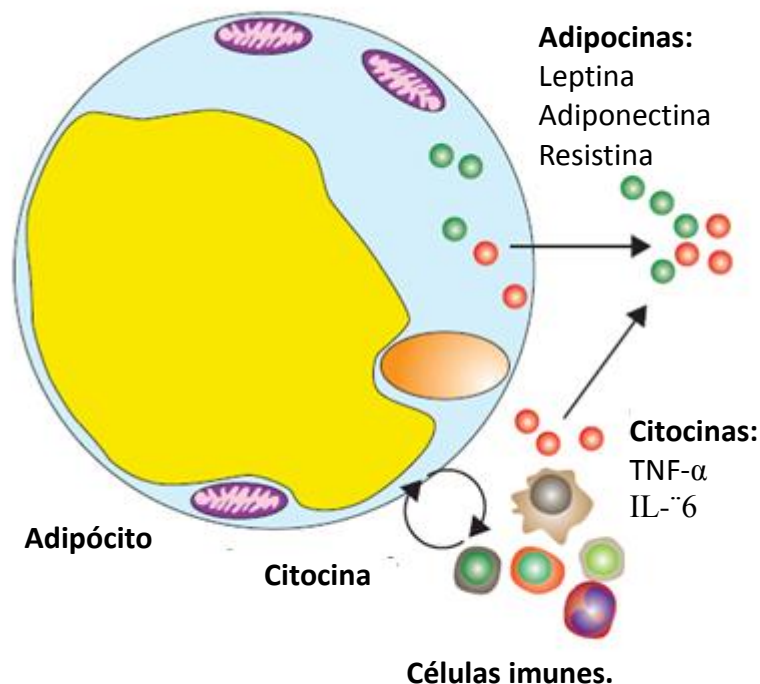


Fig 1.2 Figura adaptada de CAO (2014). Adipocinas e inflamação metabólica no tecido adiposo. Adipocinas derivadas de tecido adiposo são o resultado da interação entre adipócitos e células do sistema imunológico que infiltram o tecido adiposo.

O estado de inflamação crônica observado nos obesos pode gerar consequências graves para o paciente. O principal elo entre a obesidade e a inflamação é o quadro de resistência à insulina. A resistência à insulina é a condição com a qual as células especializadas em reconhecer a sinalização da insulina estão reduzidas. Foi observado que citocinas como TNF- α e IL-6 podem dificultar a sinalização de insulina via PI3k e SRI, que são vias principais de transporte de glicose (VAN GREEVENBROEK, *et al.*, 2013). Quando a sinalização da insulina está comprometida, pode acarretar problemas graves para o indivíduo, desta maneira indivíduos obesos que possuem um alto grau de inflamação tem maiores chances de desenvolver outras doenças como o diabetes *melittus* tipo 2, devido ao quadro de resistência à insulina.

Muitos estudos têm buscado causas para o aparecimento da inflamação em obesos, e sugerem que alterações nos genes que codificam determinadas citocinas e adipocinas, envolvidas no processo inflamatório, podem causar uma maior ou menor expressão destes mediadores contribuindo para o desenvolvimento da inflamação. Além disso, certas alterações podem não só afetar a expressão da proteína, como também a estrutura dela. Por esta razão um estudo genético sobre determinadas variações que

podem estar relacionadas com a alteração dos níveis de citocinas pode ampliar os nossos conhecimentos sobre o processo inflamatório, principalmente relacionado à obesidade.

1.5. Fatores genéticos X Ambiente na obesidade

A crescente oferta de alimentos rápidos e ricos em gordura, associada à falta de atividade física pode ser um fator para o desenvolvimento da obesidade. Contudo, um estudo realizado por BOUCHARD *et al.*, em 1990, no qual acompanharam pares de gêmeos idênticos, mostrou que, quando eram submetidos a uma dieta hipercalórica ocorria uma variação entre os diferentes pares de gêmeos com relação à deposição de gordura e ao aumento da massa corporal, quando comparado com um gêmeo e seu par, sugerindo que o componente genético também é um fator determinante para obesidade. De forma semelhante, um experimento realizado por STUNKARD *et al.*, em 1986, estudando um grupo de famílias com filhos adotivos na população da Dinamarca, mostrou que havia uma forte correlação entre o tipo de peso dos filhos adotados e os índices de massa corpórea dos pais biológicos. Estes relatos evidenciam o fato de que não somente o ambiente pode ser um fator para o desenvolvimento da obesidade, como também influências genéticas podem estar relacionadas. Com base nestes relatos, a obesidade é classificada em três categorias, baseadas na etiologia genética: obesidade monogênica, que resulta da alteração em um único gene; obesidade sindrômica, que está associada a uma determinada síndrome; e a obesidade poligênica, que corresponde a alterações em mais de um gene (ICHIHARA & YAMADA, 2008; XIA & GRANT, 2013).

A obesidade poligênica também é conhecida como obesidade comum, por afetar a maior parte da população. Atualmente, mais de 120 genes já foram associados à obesidade e existem mais de 400 genes candidatos, dentre estes o *LEP*, *TNF*, *IL-6*, *IL10*, *CCL2*, que podem não só estar envolvidos com a obesidade diretamente, mas podem estar associados ao desenvolvimento de inflamação visto em obesos.

1.5.1 Genes Candidatos

1.5.1.1 Gene *LEP*

Os adipócitos secretam uma grande variedade de hormônios e proteínas que regulam a homeostase do corpo. Dentre os principais se destacam a leptina,

adiponectina, visfatina e resistina (LEITE *et al.*, 2009). A leptina é um polipetídeo expresso principalmente nos adipócitos (PRADO *et al.*, 2009). Esta proteína apresenta 167 aminoácidos e é codificada pelo gene *LEP*, localizado no cromossomo 7q31.3, que contém 3 éxons. A leptina apresenta diversas isoformas e a sua forma circulante apresenta 16 kDa de peso molecular (AHIMA & FLIER, 2000). Diversos estudos mostraram que este hormônio promove saciedade, redução da ingestão alimentar e aumento do gasto energético (LEITE *et al.*, 2009). Além disso, atua no metabolismo de glicose e lipídeos e na imunidade (ENNS *et al.*, 2011). A estrutura cristalográfica da leptina foi descrita por ZHANG *et al.*, em 1997, cristalizada a 2.4 Å de resolução como mostrado na figura 1.3 (PROTEIN DATA BANK, 1998). Um estudo realizado por AHIMA & FLIER (2000), revelou que a leptina possui semelhanças estruturais com as citocinas, sugerindo o seu papel na ativação de células imunes, como as células T. (ENNS *et al.*, 2011).

De modo geral, a leptina sempre esteve relacionada à regulação do metabolismo corporal. Em estudos realizados com camundongos, que eram deficientes para a produção de leptina, observou-se que ocorria o desenvolvimento de obesidade mórbida nestes roedores, que era revertida quando se administrava leptina recombinante (AHIMA & OSEI, 2004). Entretanto, em outros estudos realizados com roedores obesos, notou-se que estes apresentavam níveis altos de leptina, e mesmo com o aumento do nível desta proteína, a ingestão de alimentos não era suprimida e o estímulo para o gasto energético era diminuído. Dessa forma, sugeriu-se que ocorria um quadro de resistência a leptina no hipotálamo (AHIMA & OSEI, 2004), levando a chamada hiperleptinemia.

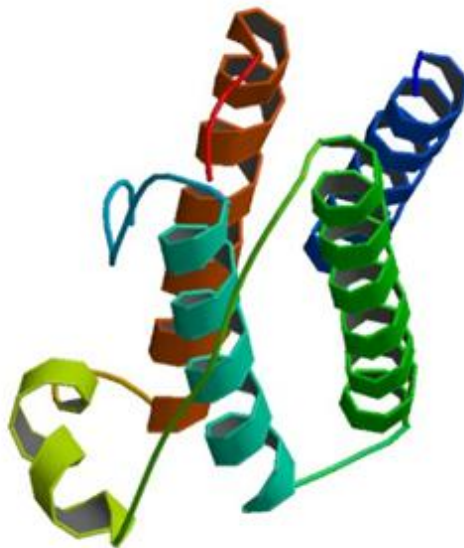


Fig.1.3 – Estrutura cristalográfica depositada no PDB da leptina, código 1AX8.

A leptina sempre esteve associada ao metabolismo energético do organismo, contudo atualmente se sabe que esta proteína desempenha um papel chave na regulação do sistema imune. Uma das principais funções desempenhadas pela leptina é a de regulação da proliferação de células T (PRADO *et al.*, 2009), gerando uma população de linfócitos T pró-inflamatórios, que estimulam a proliferação de células Th1, sendo um hormônio pró-inflamatório. Em alguns estudos, observou-se que em ratos em estado de jejum prolongado a imunossupressão foi revertida pela administração de leptina, indicando que a leptina é ótimo mediador do estado nutricional e função do sistema imunológico (DIB *et al.*, 2014; SIPPEL *et al.*, 2014; SCOTECCEL *et al.*, 2014).

Com base no papel da leptina no metabolismo, diversos estudos têm mostrado que polimorfismos no gene *LEP* estão associados ao desenvolvimento de patologias, principalmente variantes localizadas em regiões do gene que atuam na regulação da expressão da proteína. Dentre esses polimorfismos se destaca o rs7799039 cuja mudança ocorre em uma troca de base de guanina por adenina na região promotora do gene. Estudos mostraram que este polimorfismo está associado principalmente ao aumento do IMC e da expressão de leptina (FOURATI *et.al.*, 2013). Outro polimorfismo é o rs2167270 que também representa uma mudança de um nucleotídeo de uma guanina para uma adenina na região 5'UTR . As análises funcionais mostraram que este polimorfismo pode provocar um desequilíbrio na região promotora e consequentemente afetar a expressão do gene. Alguns estudos também têm relacionado este polimorfismo com alterações na estrutura da proteína, porém este dado ainda não é conclusivo (FAN &SAY, 2014).

1.5.1.2 Gene *TNF*

As citocinas são polipeptídeos liberadas por células do sistema imune que regulam diversas funções dessas células. De modo geral quando um corpo é infectado por um microrganismo, ou sofre uma lesão, diferentes tipos de citocinas são produzidas estimulando diversas células que irão atuar tanto no combate à infecção quanto no reparo tecidual (ABBAS *et al.*, 2008). Dentre os tipos de células mais comuns que produzem e secretam essas proteínas estão os macrófagos e células T (ABBAS *et al.*, 2008).

Atualmente, se sabe que as citocinas desempenham um papel importante na regulação de processos, como a imunidade e a inflamação; e o controle coordenado dessas proteínas pode garantir a eficácia desses processos. Dentre as diversas citocinas produzidas se destaca o fator de necrose tumoral (TNF- α). Esta foi uma das primeiras citocinas descobertas e desempenha papel chave, principalmente, no combate a células cancerosas, causando necrose em tumores. Esta citocina é produzida principalmente por macrófagos e é sintetizada na forma de proteína de membrana, sendo posteriormente clivada na sua forma circulante de 17 kDa, porém ambas as formas são biologicamente ativas (ABBAS *et al.*, 2008).

O TNF- α possui as mais diversas funções, principalmente relacionadas ao sistema imune, pois atua na proliferação de células T e células NK (natural killers). Adicionalmente, este é um potente mediador do processo inflamatório devido a sua ação sistêmica, ou seja, este pode atuar em locais distantes do local da infecção ou da inflamação, recrutando outras células e estimulando-as a produzirem outras citocinas (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Em 1993, HOTAMISLIGIL e colaboradores descobriram que o TNF- α também era produzido e secretado pelos adipócitos. No ano seguinte, eles descobriram num modelo de camundongos obesos que ocorria a produção crônica de TNF- α , levando a um quadro inflamatório crônico que tinha como principal consequência a resistência à insulina (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1994). De fato, em pacientes obesos é observado um aumento dos níveis de TNF- α , levando a um quadro de inflamatório crônico. Como consequência, esses pacientes apresentam resistência à insulina, devido ao aumento dos níveis de TNF- α que podem reduzir a resposta da insulina através da diminuição da expressão dos transportadores de glicose (GLUT-4) e a fosforilação específica dos

receptores de insulina (COSTA & DUARTE, 2006; VAN GREEVENBROEK, *et al*, 2013), (Figura 1.4). Esta citocina ainda possui outros efeitos no tecido adiposo, como a regulação da adipogênese e regulação do metabolismo lipídico (STRYJECKI & MUTCH, 2011), evidenciando o papel desta citocina na obesidade e na regulação do metabolismo.

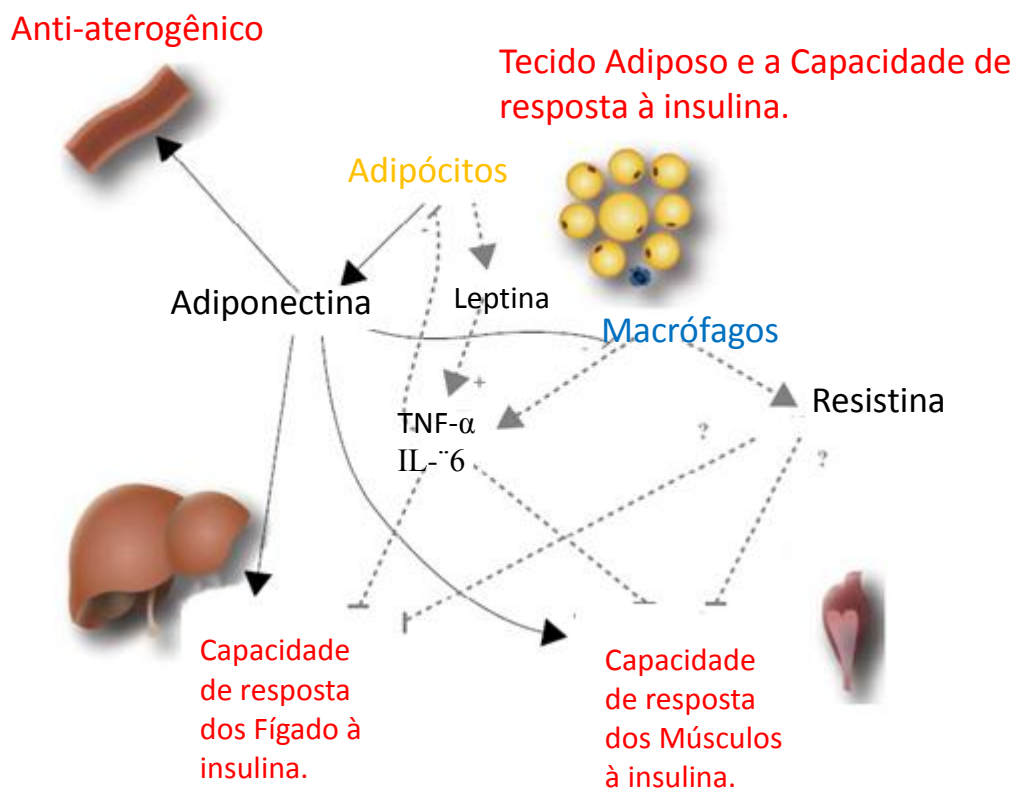


Figura 1.4 Figura adaptada de BASTARD *et al.* (2006). Efeitos da liberação de mediadores inflamatórios sobre os efeitos da insulina.

Em 1999, ABRAHAM & KROEGER observaram que a presença do polimorfismo rs1800629, que representa a troca de uma guanina por uma adenina, pode estar relacionada a alterações na expressão do gene *TNF*. Estes pesquisadores sugerem que a presença do alelo mutado A, causa um aumento na expressão de TNF- α (OLIVEIRA *et al.*, 2016). Adicionalmente, WILSON *et al.* (1992) observaram que este SNP está localizado na região promotora deste gene e com isso poderia estar afetando a expressão de TNF- α , contribuindo para o aumento desta citocina em obesos (CURTI *et al.*, 2011).

1.5.1.3 Gene *IL6*

A interleucina 6 (IL-6) é uma citocina importante na inflamação. Esta citocina recebeu esse nome, interleucina, devido a sua função. Quando é produzida por um tipo celular ela pode atuar em outros tipos celulares diferentes, estimulando a produção de outras citocinas. A IL-6 é uma glicoproteína de 22 a 27 kDa, codificada pelo gene *IL6* localizado no cromossomo 7p21 e que possui 6 éxons (NCBI, 2016).

A IL-6 possui diversas funções, sendo uma citocina pró-inflamatória ela atua principalmente na maturação de macrófagos e diferenciação de células T. Outra função desta citocina é atuar como um importante mediador para a síntese de proteínas de fase aguda da inflamação, como a Proteína C Reativa (PCR). As PCR são proteínas produzidas pelo fígado, cuja função é ativar outras proteínas, principalmente do sistema complemento e outras células do sistema imune (KLUFT & MAAT, 2003). A produção de proteínas de fase aguda está relacionada ao desenvolvimento de muitas doenças, como as cardiovasculares. Estudos observaram uma alta nos níveis de PCR em pacientes com doenças cardiovasculares e um estado de inflamação intensa, indicando ser este um dos marcadores inflamatórios mais utilizados na clínica (KAPTOGE & ANGELOTIONIO, 2012; TODENDI *et al.*, 2015).

O tecido adiposo é responsável, pela produção de uma série de hormônios envolvidos no metabolismo e em processo imunológicos, como o TNF- α e a IL-6, ambos produzidos pelos adipócitos. Altos níveis de IL-6 em pacientes obesos ocasionam um quadro de inflamação crônica (KWON & PESSIN, 2013). Assim como o TNF- α , diversos fatores podem estar envolvidos no aumento dos níveis de IL-6, tais como alterações metabólicas, regulação feita pela própria cascata de sinalização do processo inflamatório e fatores genéticos. Diversos polimorfismos estão associados com alterações na expressão do gene *IL6*, dentre estes se destaca o rs1800795 que representa uma troca de uma guanina por uma citosina; e o rs1800797 que representa a troca de uma guanina por uma adenina. Ambos os polimorfismos estão localizados na região promotora do gene, e podem estar relacionados com alterações na expressão destas citocinas (LÓPEZ *et al.*, 2013; SLATERRY *et al.*, 2008).

1.5.1.4 Gene *IL10*

A inflamação é um processo que requer um controle, principalmente, pelo fato de que podem ocorrer consequências graves para o organismo quando este processo é prolongado. Este controle deve estar relacionado à inativação de macrófagos e à inibição de produção de citocinas pró-inflamatórias (ABBAS *et al.*, 2008).

Uma das principais formas de controle da produção de citocinas pró-inflamatórias é através da produção de outras citocinas que atuam inibindo este processo (MURPHY *et al.*, 2014). Uma das citocinas que atua controlando o processo inflamatório é a interleucina 10 (IL-10), que é parte da família das citocinas diméricas e possui 18 kDa. O gene que codifica esta interleucina, o *IL10*, está localizado no cromossomo 1q31-q32 e possui 6 éxons (NCBI, 2016). A principal função atribuída a esta interleucina é de inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias sendo, portanto, um imunossupressor (MURPHY *et al.*, 2014).

Na obesidade observamos um quadro inflamatório crônico, uma vez que diversas vias de sinalização ou produção de hormônios que controlam a inflamação podem estar comprometidos e com isso prolongar a inflamação nestes pacientes. Por exemplo, pacientes obesos mostram deficiência de adiponectina que pode induzir a produção de IL-10 que, por apresentar características anti-inflamatórias, pode ser um dos fatores que contribuem para o desenvolvimento deste quadro de inflamação crônica (RADCLIFFE *et al.*, 2004).

Outros fatores podem estar atuando na diminuição da expressão desta interleucina, como a presença de polimorfismos associados a menor expressão de IL-10 e que poderiam estar comprometendo o controle do processo inflamatório em obesos. Dentre estes, temos a presença do polimorfismo rs1800872, que corresponde à troca de uma citosina por uma adenina na região promotora podendo estar relacionado com a menor expressão do IL-10. Esses dados sugerem que este polimorfismo seria um fator de risco, não só para pacientes obesos, como também para indivíduos que apresentam outras doenças que necessitam de um controle rígido do processo inflamatório. Neste caso, foi observado em ensaios *in vitro* que a presença do alelo mutado A no polimorfismo estudado contribui para a diminuição da expressão de IL-10 (ZHANG *et al.*, 2012; TSILLIDIS *et al.*, 2009).

1.5.1.5 Gene *CCL2*

As quimiocinas representam uma classe de citocinas, que são as chamadas quimioatraentes. Elas são assim chamadas, pois induzem a quimiotaxia, que direciona as células de defesa para o local da fonte da quimiocina. Quando elas sinalizam em células imunes causam alterações no citoesqueleto e na adesão celular direcionando-as para o local de fonte da infecção ou lesão (MURPHY *et al.*, 2014; OTA, 2013).

No sistema imune, as quimiocinas funcionam como quimioatraentes de leucócitos, monócitos, bem como atuam no desenvolvimento de linfócitos e na angiogênese. Existe uma grande diversidade de quimiocinas, devido ao fato de levarem uma grande diversidade de tipos celulares para o local correto da inflamação ou infecção (MURPHY *et al.*, 2014). Elas podem ser divididas em dois grupos principais, as chamadas CC que possuem dois resíduos de cisteína próximos, e as CXC em que os dois resíduos de cisteína estão separados por um aminoácido. Dentre a quimiocinas, destaca-se a CCL-2, também conhecida como proteína quimioatraente de monócitos 1 (MCP-1). O gene *CCL2* está localizado no cromossomo 17q11-2q12 (NCBI, 2016) e sua função é atrair monócitos para a corrente sanguínea tornando-os macrófagos teciduais (MURPHY *et al.*, 2014).

A obesidade é caracterizada por um aumento nos níveis de diversos tipos de mediadores inflamatórios, neste contexto, os adipócitos são a principal fonte de MCP-1, contribuindo para que macrófagos sejam encaminhados para o tecido adiposo agravando ainda mais o processo inflamatório (SAMAAN *et al.*, 2013). Em um estudo realizado por BRESLIN e colaboradores (2012) foi observado que níveis de MCP-1 plasmático eram maiores em indivíduos obesos quando comparado ao grupo controle, sugerindo que esta quimiocina também desempenha um papel importante no aparecimento do quadro inflamatório em obesos. Uma vez que esta quimiocina atua no recrutamento de células, como monócitos, estes podem produzir outros mediadores pró-inflamatórios, aumentando assim a estado inflamatório desses pacientes (OTA, 2013).

Diversos polimorfismos já foram associados ao quadro inflamatório dos obesos, dentre estes uma deleção de 14 pb no gene *CCL2*. Apesar desta deleção estar localizada na região intrônica do gene, ela pode estar relacionada com alterações na transcrição e consequentemente pode alterar o seu padrão de expressão. No entanto os resultados

dessa deleção ainda são inconclusivos e um estudo desta variante pode ajudar a traçar um perfil de risco para os obesos.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral:

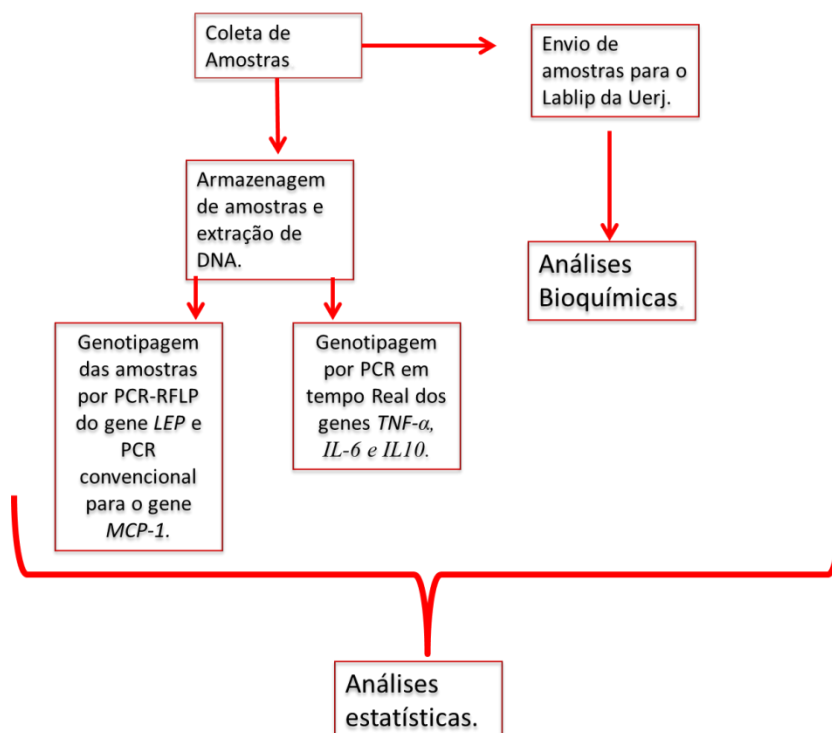
O presente trabalho tem como objetivo analisar os efeitos de variantes polimórficas nos genes *TNF*, *IL6*, *IL10*, *CCL2* e *LEP* sobre o risco para a obesidade e características fenotípicas relacionadas, suas comorbidades, e sobre os níveis inflamatórios.

2.2. Objetivos específicos:

1. Investigar diferenças nos parâmetros antropométricos, pressóricos e bioquímicos entre os eutróficos e obesos.
2. Realizar a genotipagem dos polimorfismos dos genes propostos por reação de PCR convencional, PCR-RFLP e PCR em tempo real no grupo de obesos e eutróficos.
3. Descrever a distribuição das frequências alélicas e genotípicas de polimorfismos dos genes em ambos os grupos.
4. Determinar uma possível associação dos polimorfismos estudados com o potencial de risco de obesidade.
5. Estabelecer a relação entre os polimorfismos do estudo e o perfil inflamatório (baseado nas concentrações da PCR).
6. Investigar a relação entre os polimorfismos e a variabilidade dos parâmetros antropométricos, bioquímicos e pressóricos nos grupos.
7. Avaliar se a presença dos polimorfismos está associada ao risco de desenvolver outras doenças como diabetes *mellitus* tipo 2, síndrome metabólica e hipertensão.

3. Material e Métodos.

3.1. Fluxograma de Trabalho



3.2. Determinação da amostra.

3.2.1 Distinção das amostras

A seleção das amostras para o estudo foi feita com base no Índice de Massa Corpórea (IMC). O estudo é composto por 196 obesos com o $IMC \geq 30$, indivíduos esses atendidos na ONG conhecida pelo nome de Grupo de Resgate à Autoestima e à Cidadania do Obeso (GRACO). Além disso, as amostras do estudo são constituídas por um grupo controle de 181 voluntários eutróficos com os valores de IMC entre 18,5 e 24,9. Foram excluídas das amostras mulheres grávidas, pacientes com problemas na tireoide, pacientes que faziam uso de medicação, principalmente anti-inflamatórios e pacientes que faziam uso de medicação para controle de peso. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da Fiocruz (CAAE: 09225113.0.0000 / nº do parecer: 346.634). Todos os grupos receberam as informações a respeito dos objetivos da pesquisa e dos possíveis riscos. Em seguida, todos que preencheram os critérios de inclusão e concordaram em participar da pesquisa, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) de acordo com as leis de Pesquisa em Seres Humanos (resolução 196/96 do Ministério da Saúde).

3.2.2. Coleta de Amostras

Para a realização das análises bioquímicas e genéticas foram coletadas 10 ml de sangue periférico, em um tubo de EDTA, um tubo de soro e um tubo de fluoreto de sódio. O material que foi coletado nos tubos de EDTA foi transferido para tubos de criopreservação e estocados a temperatura de -22°C para que em seguida fosse realizada a extração do DNA. Os tubos de soro e fluoreto foram centrifugados para a coleta do soro a 5000 rpm por 15 minutos, posteriormente o soro e o plasma foram enviados para o Laboratório de Lipídeos da UERJ para a realização das análises bioquímicas.

3.2.3. Obtenção das Medidas Antropométricas

3.2.3.1 Índice de Massa Corpóreo (IMC)

O IMC é obtido pela equação:
$$\text{IMC} = \frac{\text{Peso (Kg)}}{\text{Altura}^2 (\text{m})}$$

3.2.3.2 Medidas da circunferência da cintura e quadril

As circunferências foram medidas com o auxílio de uma fita métrica em centímetros, com o paciente ereto, os pés eram posicionados próximos e com o abdômen relaxado. A circunferência da cintura foi medida a partir do ponto médio entre a crista ilíaca e o último arco costal. A circunferência do quadril foi medida a partir da parte mais larga das nádegas.

3.2.4. Análises Bioquímicas

As análises bioquímicas foram realizadas nas amostras coletadas em tubos de gel para obter os valores de colesterol total e frações, e triglicerídeos, e em tubos de fluoreto para a análise de glicose. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Lipídeos da UERJ. A tabela 3.1 mostra as principais análises bioquímicas realizadas.

Tabela 3.1. Identificação e quantificação das principais variáveis bioquímicas, utilizadas.

Variáveis bioquímicas	Metodologia utilizada para identificação e quantificação.
Glicose (mg/dl)	A análise da concentração de glicose no plasma foi feita pelo método glicose oxidase/peroxidase. Este método forma um complexo colorido, na presença de glicose. Como cada cor possui um comprimento de onda específico, que pode ser quantificado, a quantificação é feita por espectrofotômetro.
Colesterol Total (mg/dl)	A medição de colesterol livre presente no soro dos pacientes foi obtida através do método Oxidase/Peroxidase, que corresponde a um método colorimétrico.
HDL (mg/dl)	A quantificação da lipoproteína de alta densidade (sigla do inglês HDL) foi realizada por detergente direto; neste método um detergente presente na reação solubiliza o colesterol HDL das amostras, permitindo sua quantificação pelo equipamento espectrofotômetro.
LDL (mg/dl)	Para a determinação dos níveis LDL presentes no soro dos pacientes foi utilizado a fórmula de Friedewald conforme a equação: $\text{Colesterol LDL (mg/dL)} = \text{Colesterol Total} - \text{Colesterol HDL} - \frac{\text{Triglicerídeos}}{5}$
VLDL (mg/dl)	A quantificação do colesterol VLDL foi obtida pela equação de mostrada abaixo: $\text{Colesterol VLDL (mg/dL)} = \frac{\text{Triglicerídeos}}{5}$
Triglicerídeos (mg/dl)	Os níveis de triglicerídeos foram analisados a partir do soro através do método oxidase/peroxidase, e posteriormente os níveis foram quantificados no equipamento de espectrofotometria.
Hemoglobina Glicada (%)	A concentração de hemoglobina glicada foi adquirida através da técnica de inibição turbidimétrica (TINIA) do sangue total hemolisado.

3.2.4.1. Proteína C Reativa e inflamação

A concentração de Proteína C Reativa foi obtida através do método de turbimetria/látex de alta sensibilidade. Neste método a proteína provoca uma aglutinação de látex incorporada com um anticorpo anti-proteína C-reativa, devido a esta aglutinação das partículas de látex que é diretamente proporcional à concentração da PCR, esta pode ser quantificada posteriormente.

Com base nas concentrações de Proteína C - Reativa, foram definidas as faixas de inflamação que são comumente utilizados na clínica (Pepys & Hirschfield, 2003) como mostra na tabela 3.2 abaixo:

Tabela 3.2 Níveis de inflamação baseados na concentração de PCR.

Concentração de PCR	Tipo de Inflamação.
< 0,3 mg / dL	Sem inflamação
0,3 - 1,0 mg/dL	Moderada
1,0 – 4,0 mg/dL	Grave
Acima de 4,0 mg/dL	Extrema

Fonte: U.S.National Library Medicine: Medicine Plus. CLYNE & OLSAKER (1999); PEPYS & HIRSCHFIELD (2003).

3.2.5. Seleção de Comorbidades em obesos

3.2.5.1. Síndrome Metabólica

Segundo o *National Cholesterol Education Program*, para o diagnóstico de Síndrome Metabólica são necessários três dos cinco critérios, considerados de risco sendo eles: circunferência abdominal, níveis de HDL, Glicose e o aumento do nível de triglicerídeos. Na tabela 3.3 estão representados os valores para cada um destes critérios.

Tabela 3.3: Valores correspondentes para os critérios de diagnóstico de Síndrome Metabólica

Crítérios para diagnóstico.	Valores
Glicose	≥ 100 mg/dL
HDL – Colesterol	Homens: < 40 mg/dL Mulheres < 50 mg/dL
Triglicérides	≥ 150 mg/dL
Circunferência Abdominal	Cintura ≥ 102 cm para homens e ≥ 88 cm para mulheres
Hipertensão	$\geq 130 \times 85$ mmHg

3.2.5.2. Hipertensão

Segundo a *Organização Mundial da Saúde*, para o diagnóstico de hipertensão são considerados hipertensos todos os pacientes que apresentarem níveis de pressão arterial acima ou igual a 140 x 90 mmHg, ou utilizado medicamento hipertensivo.

3.2.5.3. Diabetes mellitus tipo 2

Os critérios utilizados para o diagnóstico de DT2 foram os parâmetros sugeridos pelo Ministério de Saúde, sendo eles os valores de glicemia (níveis de glicose sanguínea) e hemoglobina glicada. Com base nesses dados são considerados diabéticos os pacientes com glicemia ≥ 126 mg/dL e hemoglobina glicada $\geq 6,5\%$. Além disso, o uso de medicação que controla glicemia também qualifica como diabético.

3.2.6. Estudo genético dos polimorfismos envolvidos

3.2.6.1 Extração de DNA

As amostras de DNA de ambos os grupos, obesos e eutróficos, foram extraídas utilizando o kit de extração da Invitrogen PureLink® Genomic DNA; a extração

ocorreu a partir de células do sangue periférico seguindo todas as especificações do fabricante, como mostrado no protocolo abaixo:

1. Pipetar 20µl de Protease ou Proteinase K em um microtubo de 1,5ml
2. Adicionar 200 µl de sangue ao microtubo
3. Adicionar 20 µl de RNase, vortexar brevemente
4. Incubar por 2 min
5. Adicionar 200 µl de *lysis buffer* ao microtubo
6. Vortexar por 5 segundos
7. Incubar 55°C por 10 min
8. Adicionar 200 µl de etanol
9. Aplicar a mistura em uma coluna sem tocar no filtro
10. Centrifugar a 8000 rpm por 2min
11. Transferir a coluna para um tubo novo e descartar o tubo contendo o filtrado
12. Adicionar 500 µl de tampão *Wash buffer* 1 (preparado com etanol)
13. Centrifugar a 8000 rpm por 2min
14. Transferir a coluna para um novo tubo e descartar o filtrado
15. Adicionar 500 µl de tampão AW2 (Preparado com etanol)
16. Centrifugar a 15.000 rpm, por 5min
17. Descartar o filtrado e adicionar 200 µl de *elution buffer*
18. Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos, e centrifugar a 15000 rpm por 5 min
19. Descartar a coluna e estocar o microtubo em freezer.

Para observar a integridade do DNA, este foi visualizado em um gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídeo. As amostras posteriormente foram estocadas num freezer -20°C no Laboratório de Genética Humana.

3.2.6.2 Desenho de Oligonucleotídeos

Os *primers* utilizados para a genotipagem dos polimorfismos dos genes *LEP* e *MCP-1*, foram desenhados no Laboratório de Genética Humana. As sequências destes genes usadas para desenhar os oligonucleotídeos (*primers*) foram adquiridas no banco de dados do NCBI (*The National Center for Biotechnology Information*). Estes *primers* foram desenhados usando o programa Primer3Plus e as informações sobre eles encontram-se na Tabela 3.4 abaixo:

Tabela 3.4. Informações sobre os primers utilizados nos experimentos.

Genes	Polimorfismo	Sequência dos Primers	Pares de Base	Ciclos de Amplificação
<u><i>LEP</i></u>	<u>rs7799039</u>	<u>Lep 2435 – F</u> AGCCAAGGCAAAATTGAGG	<u>250pb</u>	<u>95°C – 10 min</u>
		<u>Lep 2453 – R</u> TCCAGCCGATCTCTCTGTTC		<u>94°C – 1 min</u> <u>59°C – 1 min</u> <u>72°C – 1 min</u> <u>72°C – 10 min</u>
	<u>rs2167270</u>	<u>Lep 39 – F</u> GTGATCGGGCCGCTATAAG	<u>178pb</u>	<u>95°C – 10 min</u>
		<u>Lep 39 – R</u> GCATCCCTCCTGACTCAGTT		<u>94°C – 1 min</u> <u>58°C – 1 min</u> <u>72°C – 1 min</u> <u>72°C – 10 min</u>
<u><i>MCP-1</i></u>	<u>rs3917887</u>	<u>MCP-1 – F</u> CCAGGCATAGCCTATTCAGA	<u>249pb</u>	<u>95°C – 10 min</u>
		<u>MCP-1 – R</u> AATCCCAGTGCTTCTGCCTA		<u>94°C – 1 min</u> <u>59°C – 1 min</u> <u>72°C – 1 min</u> <u>72°C – 10 min</u>

3.2.6.3 Métodos de Rastreamento de Polimorfismos

3.2.6.3.1 PCR convencional e PCR – RFLP

As amplificações das regiões do gene *LEP* contendo os polimorfismos rs7799039 e rs2167270 foram realizadas seguindo os protocolos mostrados na tabela 3.5, em seguida os produtos gerados pela reação de PCR foram submetidos a um gel de agarose à 1,5% para a visualização dos fragmentos.

Tabela 3.5 Protocolos utilizados para a amplificação dos polimorfismos do gene *LEP*.

Gene <i>LEP</i> (rs7799039)	
Reagentes	Volume/Concentrações
Primer Lep 2453 – F	1 µl/10pmoles
Primer Lep 2453 - R	1 µl/10pmoles
dNTP's	5 µl/ 2mM
MgCl ₂	2 µl/ 2mM
Tampão Biotools	5 µl / 1x
Taq Polimerase Biotools	1 µl / 1U
H ₂ O Milli-Q	35 µl
Gene <i>LEP</i> (rs2167270)	
Reagentes	Volume/Concentrações
Primer Lep 19 – F	1 µl/15pmoles
Primer Lep 19 - R	1 µl/15pmoles
dNTP's	5 µl/ 2mM
MgCl ₂	2 µl/ 2mM
Tampão Biotools	5 µl / 1x
Taq Polimerase Biotools	1 µl / 1U
H ₂ O Milli-Q	35 µl

Posteriormente, o material amplificado foi submetido a uma digestão enzimática para a identificação dos genótipos de cada polimorfismo. Com relação ao polimorfismo (rs7799039), foi utilizado a enzima HhaI, uma vez que o alelo selvagem G é identificado pela presença de um sítio de restrição para esta enzima que corta o fragmento amplificado; já o alelo mutado A é identificado pela perda do sítio de

restrição não cortando o produto amplificado. Com relação ao polimorfismo (rs2167270), foi utilizado a enzima HpyCH4III, que na presença do alelo mutado A corta o fragmento gerado pela reação de PCR, pois cria um sítio de restrição que não está presente no alelo selvagem G. Os protocolos para a digestão enzimática de cada um desses polimorfismos estão representados na tabela 3.6. Ambos os polimorfismos foram digeridos no tempo de 4 horas a 37°C, e a reação foi interrompida a 80°C.

Tabela 3.6. Protocolo de digestão enzimática para os polimorfismos do gene *LEP*.

Gene <i>LEP</i> (rs7799039)	
Reagentes	Volume/Concentrações
NEB 4	1,5µl/10x
BSA	0,25µl/2,5 µg
HhaI	0,3 µl/3U
Milli-Q	7,95 µl
Produto de PCR	10 µl
Gene <i>LEP</i> (rs2167270)	
Reagentes	Volume/Concentrações
NEB 4	2,5 µl/10x
HpyCH4III	0,4 µl /4U
Milli-Q	11,7 µl
Produto de PCR	15 µl

Para a identificação da presença da deleção de 14pb no gene *MCP-1* (rs3917887 del14), as amostras foram submetidas à reação de PCR. Os detalhes do protocolo utilizado para a amplificação do fragmento estão representados na tabela 3.7. Os fragmentos foram aplicados em um gel de poli-acrilamida a 10% para a identificação dos fragmentos não deletados e aqueles que possuem a deleção.

Tabela 3.7 Protocolo de amplificação da região onde ocorre a deleção no gene *MCP-1*.

<i>MCP-1</i> rs3917887 del14	
Reagentes	Volume/Concentrações
Primer MCP-1 del14 – F	1 µl/15pmoles
Primer MCP-1 del14 - R	1 µl/15pmoles
dNTP's	5 µl/ 2mM
MgCl ₂	3,5 µl/ 3,5mM
Tampão Biotools	5 µl / 1x
Taq Polimerase Biotools	1 µl / 1U
H ₂ O Milli-Q	35 µl

3.2.6.3.2 PCR em tempo real

Os polimorfismos dos genes *TNF*, *IL-6* e *IL-10*, foram genotipados pela técnica de qPCR em tempo real. Para a identificação de cada variante as amostras foram submetidas à reação utilizando sondas de hidrólise *TaqMan Assays* pré-desenhadas e validadas pela empresa Thermo Fisher Scientific. Na tabela 3.8 estão as especificações de cada sonda utilizada.

A reação para a identificação dos polimorfismos foi feita utilizando 5 µl de Master Mix, 0,25 µl de sonda específica para cada variante, 10 – 20 ng de DNA e água Milli-Q ultra pura, sempre atingindo um volume final de 10 µl. Em todas as reações foram incluídos um controle negativo que contém todos os reagentes exceto DNA, para garantir que não houvesse nenhuma contaminação. Além disso, também foram incluídos controles positivos para cada genótipo de cada sonda. Os equipamentos utilizados para os experimentos realizados foram 7500 Real Time PCR System ou Step One plus (Thermo Fisher Scientific).

Tabela 3.8 Dados sobre as sondas usadas no estudo

Gene	SNP's	Sequência do desenho da sonda (VIC/FAM)/Assay ID	Ciclagem de amplificação	
<i>TNF</i>	rs1800629	GAGGCAATAGGTTTTGAGGGGCATG [A/G] GGACGGGGTTCAGCCTCCAGGGTCC/ C_7514879_10	<u>60°C – 1 min</u>	} 40 Ciclos
			<u>94°C – 1 min</u>	
			<u>95°C – 15 seg</u>	
			<u>60°C – 1 min</u>	
<i>IL-6</i>	rs1800797	TGAAGTAACTGCACGAAATTTGAGG [A/G] TGGCCAGGCAGTTCTACAACAGCCG/ C_1839695_20	<u>60°C – 1 min</u>	} 40 Ciclos
			<u>94°C – 1 min</u>	
			<u>95°C – 15 seg</u>	
			<u>60°C – 1 min</u>	
	rs1800795	ACTTTTCCCCCTAGTTGTGTCTTGC [C/G] ATGCTAAAGGACGTCACATTGCACA/ C_1839697_20	<u>60°C – 1 min</u>	} 40 Ciclos
			<u>94°C – 1 min</u>	
			<u>95°C – 15 seg</u>	
			<u>60°C – 1 min</u>	
<i>IL-10</i>	rs1800872	CTTTCCAGAGACTGGCTTCTACAG [T/G] ACAGGCGGGGTCACAGGATGTGTTC/ C_1747363_10	<u>60°C – 1 min</u>	} 40 Ciclos
			<u>94°C – 1 min</u>	
			<u>95°C – 15 seg</u>	
			<u>60°C – 1 min</u>	
			<u>60°C – 1 min</u>	

3.2.7 Análises Estatísticas

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi usado para determinar a normalidade dos parâmetros antropométricos, bioquímicos e pressóricos nas nossas amostras. As variáveis que tinham distribuição Normal são apresentadas na forma de média e desvio padrão e as variáveis de distribuição Não-Normal são mostradas na forma de mediana e percentis de 25 e 75%. Em seguida, testamos as diferenças de distribuição de cada variável entre os grupos obesos e eutróficos através do teste Mann-Whitney para distribuições Não-Normais e teste t-student para variáveis de distribuição Normal.

O teste do Qui-quadrado foi utilizado para testar a homogeneidade entre os grupos e o equilíbrio de Hardy-Weinberg dentro de cada grupo, Este mesmo teste também foi utilizado para averiguar a associação entre os genótipos e alelos com a variável obesidade, DM2, hipertensão e SM.

Para avaliar uma possível relação entre o risco inflamatório e os polimorfismos estudados, primeiramente calculamos os OR (Odd Ratio), de cada polimorfismo; os alelos que apresentassem um valor de $OR > 1,00$ eram considerados como alelos de risco; posteriormente os genótipos portadores desse alelo (Homo ou heterozigoto) foram codificados com o valor 1, e aqueles com ausência desse alelo codificados com valor zero; em seguida para cada amostra criamos uma variável, composta pela soma dos valores individuais dos sete polimorfismos estudados. Finalmente, correlacionamos esta variável com as concentrações de Proteína C-Reativa de cada paciente, para verificar se os polimorfismos estão envolvidos com o risco de inflamação nos obesos.

A avaliação da influência de cada polimorfismo sobre as variáveis antropométricas, bioquímicas e pressóricas foi feita basicamente através de testes não paramétricos, primeiramente fazendo uma comparação destas entre os eutróficos e obesos (teste de Mann-Whitney), e posteriormente comparando essas variáveis entre os genótipos de cada polimorfismo (teste de Kruskal-Wallis).

Todas as análises foram feitas com o uso de planilhas Excel e o software SPSS v.22. As inferências foram feitas ao nível de 5%.

4. Resultados

4.1. Perfil das amostras

Em nosso estudo foram analisados 196 obesos, divididos em 157 (80,1%) mulheres e 39 homens (19,9%). E também analisamos 181 eutróficos compreendidos entre 95 mulheres (52,5%) e 86 homens (47,5%). As informações referente a ambas as amostras estão representadas na tabela 4.1 e a prevalência de diabetes tipo 2, SM e hipertensão estão representadas na tabela 4.2. A partir dos resultados da tabela 4.1 observamos que os obesos apresentam valores maiores para variáveis antropométricas como IMC, circunferência abdominal e circunferência do quadril; em relação às variáveis bioquímicas e pressóricas como colesterol total, LDL, VLDL, Proteína C reativa (PCR) pressão arterial sistólica e diastólica, os obesos também apresentam valores significativamente maiores.

Como era de se esperar, observa-se que os obesos apresentam níveis de hipertensão maiores do que nos eutróficos ($\chi^2=102,508$ $p<0,001$), da mesma forma que as frequências da diabetes tipo 2 ($\chi^2=29,053$ $p<0,001$) e da SM ($\chi^2=87,230$ $p<0,001$) também são maiores entre os obesos.

Tabela 4.1 Variáveis Bioquímicas, antropométricas e pressóricas.

Variável	Total		Eutróficos		Obesos		p
	N	Valores	N	Valores	N	Valores	
IMC (Kg/m ²)	376	31 (23; 45)	180	23 (21; 23)	196	45 (39; 51)	<0,01
C. Abdominal (cm)	376	103 (84; 131)	181	84 (76; 91)	195	131 (118; 144)	<0,01
C. do Quadril (cm)	376	110 (96; 140)	181	96 (85; 100)	195	138 (126; 150)	<0,01
Glicose (mg/dl)	298	92 (86; 103)	167	89 (84; 96)	131	101 (91; 110)	<0,01
Colesterol Total	329	186 (160; 216)	167	177(156; 199)	162	196 (174; 224)	<0,01
HDL (mg/dl)	330	52 (44; 63)	167	59 (47; 68)	163	48 (42; 55)	<0,01
LDL (mg/dl)	324	110 (90; 132)	166	102 (85; 124)	158	122 (98; 140)	<0,01
VLDL (mg/dl)	324	19 (14; 28)	166	15 (12; 20)	158	25 (18; 34)	<0,01
Triglicerídeos (mg/dl)	329	98 (70; 140)	167	75 (60; 102)	162	128 (94; 180)	<0,01
Hemoglobina Glicada (%)	187	5,2 (4,7; 5,8)	60	4,8 (4,5;)	127	5,5 (4,9; 5,9)	<0,01
PCR (mg/dl)	215	0,65 (0,26; 1,31)	62	0,19 (0,05; 0,31)	153	0,98 (0,54; 1,58)	<0,01
PAS (mmHg)	310	121 (110; 136)	168	118 (109; 126)	142	132 (117; 149)	<0,01
PAD (mmHg)	310	80 (70; 90)	168	76 (67; 82)	142	85 (76; 97)	<0,01

Legendas: PAS -Pressão arterial sistólica, PAD – Pressão arterial diastólica, PCR Proteína C Reativa e IMC – índice de massa corpórea. O *p*-valor representa as diferenças entre os valores das medianas para variáveis sem distribuição normal nos eutróficos e nos obesos.
Nota: Os valores representam medianas (25 percentil e 75 percentil); pois nossas amostras não apresentam distribuição normal.

Tabela 4.2 Perfil clínico em nossas amostras.

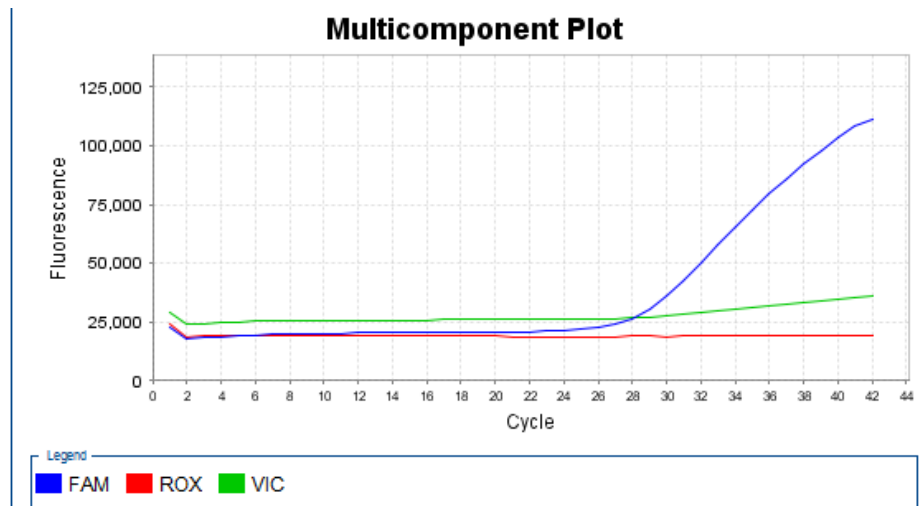
	Total			Eutróficos			Obesos			<i>p</i>
	N	Sim	Não	N	Sim	Não	N	Sim	Não	
Diabetes Tipo 2	370	52 (14,05%)	232 (62,7%)	181	0 (0%)	89 (49,4%)	196	52 (27,36%)	143 (75,26%)	<0,001
Hipertensão	370	146 (39,46%)	139 (37,56%)	181	6 (3,3%)	83 (46,11)	196	140 (73,6 %)	56 (29,5%)	<0,001
Síndrome Metabólica	370	121 (32,7%)	126 (34,05%)	181	6 (3,3%)	77 (42,7%)	196	115 (60,5%)	49 (25,8%)	<0,001

Nota: As características são apresentadas na forma de porcentagem. O *p-valor* é o teste de homogeneidade entre obesos e eutróficos.

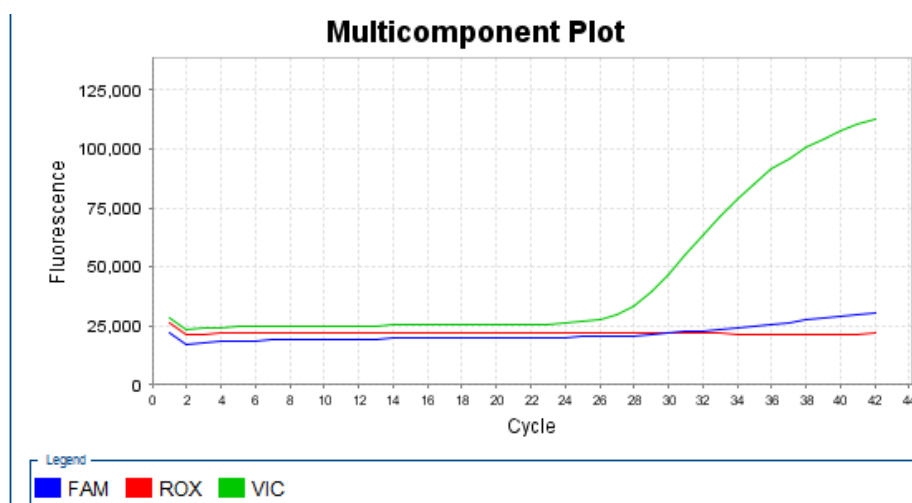
4.2. Gene *TNF- α* Polimorfismo c. -308G>A (rs1800629)

O polimorfismo no gene que codifica a citocina inflamatória *TNF- α* , foi testado em 196 obesos e 181 controles. Na figura 4.1 estão representados os padrões de amplificação utilizando a sonda Taqman específica para o polimorfismo estudado. Em seguida, a análise de equilíbrio do Hardy-Weinberg revelou que todas as amostras estão em equilíbrio como observados nos valores de qui-quadrado e *p*-valor, calculados para os obesos ($\chi^2= 1,138$, $p=0,24$) e para os eutróficos $\chi^2=0,38$, $p=0,53$.

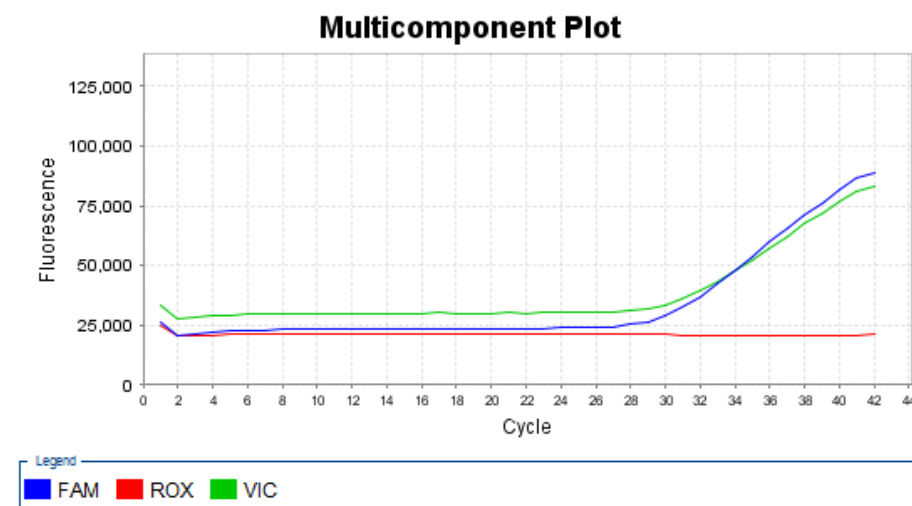
Com relação à distribuição das frequências genotípicas entre os grupos (figura 4.2), em nossas amostras não foram observadas diferenças significativas ($\chi^2= 1,73$, $p=0,18$) e também não foram observadas diferenças significativas em relação às frequências alélicas ($\chi^2= 0,5365$, $p=0,46$). A análise de risco não revelou resultados significativos para o alelo mutado A, (OR=1,167; IC95%: 0,771 – 1,765) (Figura 4.3).



A



B



C

Fig.4.1 Gráfico de amplificação multicomponente. A curva azul representa o fluoróforo FAM que se anela ao alelo selvagem G; a curva verde representa o fluoróforo VIC que se anela ao alelo A. O Gráfico A mostra a amplificação somente das amostras que contém o Alelo G, pois só observamos um aumento da fluorescência de FAM, enquanto que no Gráfico B observamos um aumento somente de VIC mostrando que estas só possuem o alelo A, No gráfico C observamos que ambos os fluoróforos aumentaram sua fluorescência indicando que as amostras possuem os dois alelos, G e A.

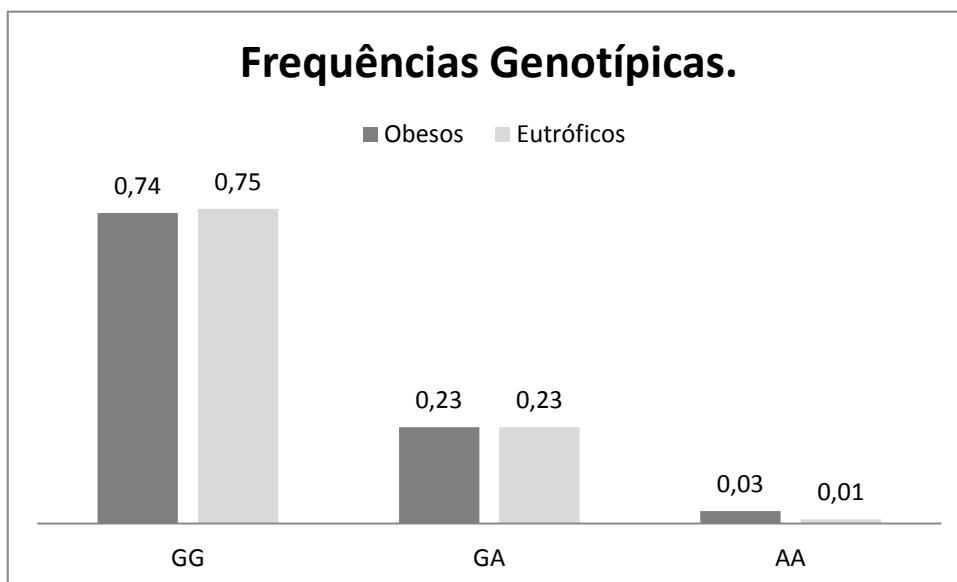


Fig.4.2 Distribuição das Frequências Genotípicas entre os grupos para o polimorfismo rs1800629 do gene *TNF*.

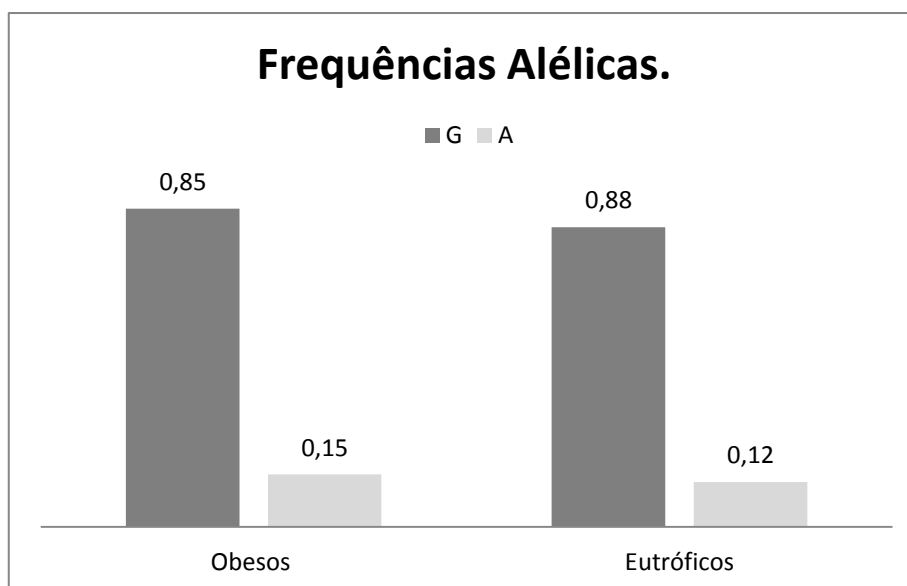


Fig.4.3 Gráfico de Frequências Alélicas entre os grupos para o polimorfismo rs1800629 do gene *TNF*.

Com relação às variáveis bioquímicas, antropométricas e pressóricas, buscamos observar uma possível associação com o polimorfismo estudado. Nas tabelas 4.3 e 4.4 estão descritas as associações de cada variável por genótipo entre os grupos. Foram observadas associações significativas entre as variáveis, colesterol total e circunferência abdominal entre os obesos totais.

Tabela 4.3 Variáveis bioquímicas, antropométricas e pressóricas para eutróficos, em relação ao polimorfismo rs1800629 do gene TNF.

Variáveis	N	GG	GA	AA	<i>p</i>
IMC (Kg/m ²)	180	22 (20; 24)	23 (21; 24)	24 (23)	0,36
Circunferência Abdominal (cm)	181	83,0 (76; 91)	86 (81; 92)	91 (84)	0,13
Circunferência do Quadril (cm)	181	96,0 (87; 100)	94,5 (83; 101)	91 (82)	0,38
Glicose (mg/dl)	167	89 (83; 96)	89 (85; 96)	95(87)	0,66
Colesterol Total	167	177(156; 200)	178 (155; 197)	150 (139)	0.36
HDL (mg/dl)	166	59,00 (48; 69)	55 (45; 64)	55,5 (52,)	0,6
LDL (mg/dl)	166	100,0 (84; 123)	108 (89; 129)	96,0 (64)	0,6
VLDL (mg/dl)	166	16,0 (12; 21)	13 (10; 18)	15,5 (15)	0,13
Triglicerídeos (mg/dl)	167	78,0 (62; 107)	68 (47; 94)	81,5 (80)	0,13
Hemoglobina Glicada (%)	60	4,8 (4,5; 5,4)	5,0 (4,5; 5,2)	4,7 (4,7)	0,24
PCR (mg/dl)	62	0,18 (0,05; 0,3)	0,21 (0,1; 0,6)	0,05(0,05; 0,05)	0,6
PAS (mmHg)	168	116 (109,; 124)	121 (110; 132)	122 (118)	0,36
PAD (mmHg)	168	75 (67; 81)	77 (69; 85)	71 (66)	0,78

PAS -Pressão arterial sistólica, PAD – Pressão arterial diastólica, PCR Proteína C Reativa e IMC – índice de massa corpórea. O *p*-valor corresponde à significância estatística do teste Kruskal Wallis.

Nota: Os valores representam medianas com os percentiles de 25 e 75 %.

Tabela 4.4 Variáveis bioquímicas, antropométricas e pressóricas para os obesos, em relação ao polimorfismo rs1800629 do gene TNF.

Variáveis	N	GG	GA	AA	P
IMC (Kg/m ²)	195	45 (38; 51)	44, (39; 52)	38 (34; 43)	0,223
Circunferência Abdominal (cm)	194	131 (118; 142)	132 (124; 150)	109 (101; 121)	0,03
Circunferência do Quadril (cm)	194	139 (125; 150)	136 (126; 151)	126 (121; 132)	0,22
Glicose (mg/dl)	130	100 (90; 109)	100 (93; 113)	98 (89; 193)	0,71
Colesterol Total	161	198 (177; 224)	180 (157; 218)	219(196; 272)	0,04
HDL (mg/dl)	162	48 (42; 54).	48 (40; 54)	60 (50; 67)	0,08
LDL (mg/dl)	157	122 (98; 141)	110 (88; 131)	133 (121; 186)	0,08
VLDL (mg/dl)	157	26 (19; 34)	25 (16; 37)	19 (18; 35)	0,62
Triglicerídeos (mg/dl)	161	132 (96; 177)	126 (79; 201).	96,5 (94; 176)	0,64
Hemoglobina Glicada (%)	126	5,5 (4,85; 5,85)	5,3 (4,9; 6,2)	5,4 (5,1; 5,75)	0,23
PCR (mg/dl)	152	1,0 (0,56; 1,73)	0,72 (0,36; 1,31)	0,9 (0,52; 1,60)	0,2
PAS (mmHg)	142	131 (115; 149)	140 (116; 159)	138 (130; 148)	0,55
PAD (mmHg)	142	84 (73; 96)	89,5 (77; 100)	92 (75; 105)	0,40

PAS -Pressão arterial sistólica, PAD – Pressão arterial diastólica, PCR Proteína C Reativa e IMC – índice de massa corpórea.

O *p*-valor corresponde à significância estatística do teste Kruskal Wallis.

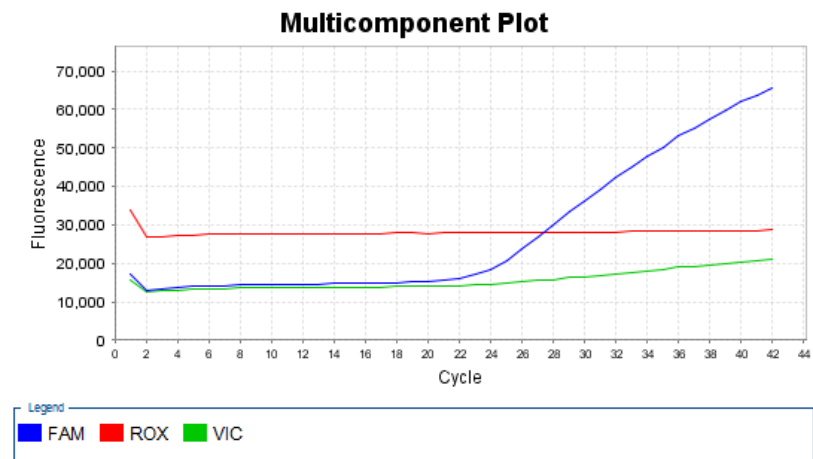
Nota: Os valores representam medianas com os percentiles de 25 e 75 %.

O polimorfismo rs1800629 também foi avaliado sobre uma possível associação com comorbidades relacionadas à obesidade, como diabetes, síndrome metabólica e hipertensão; não foram encontrados resultados significativos para obesos totais (diabetes $\chi^2= 0,70$ $p=0,7$; SM $\chi^2= 1,88$ $p=0,39$ Hipertensão $\chi^2=0,06$ $p=0,96$); obesos de grau 2 e 3 (diabetes $\chi^2= 1,38$, $p=0,5$; SM $\chi^2= 1,26$, $p=0,53$; Hipertensão $\chi^2=0,49$, $p=0,78$) e em obesos mórbidos somente (diabetes $\chi^2= 2,96$ $p=0,22$; SM $\chi^2= 0,79$ $p=0,67$ Hipertensão $\chi^2=0,5$ $p=0,77$).

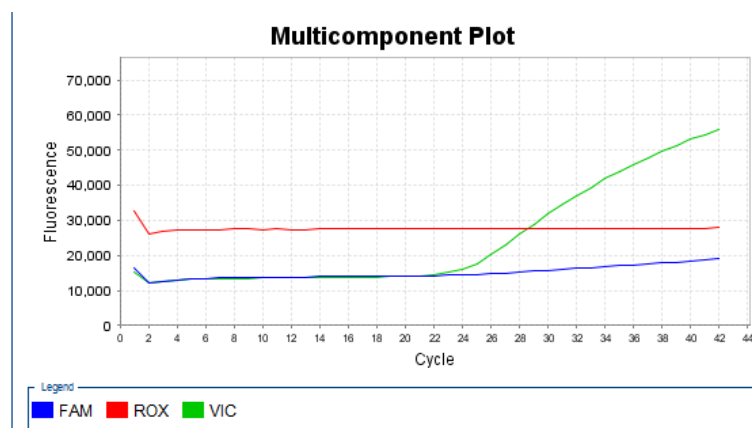
4.3. –Polimorfismos no Gene *IL-6*

No gene que codifica a citocina interleucina 6 foram testados dois polimorfismos. A figura 4.4 mostra o padrão de amplificação do primeiro polimorfismo analisado, o rs1800797, utilizando PCR em tempo real com sondas Taqman. A seguir testamos se sua distribuição seguia os padrões de equilíbrio de Hardy-Weinberg não encontrando desvios significativos, tanto na amostra de obesos ($\chi^2 = 0,44$, $p=0,50$) como entre os eutróficos ($\chi^2= 2,01$, $p=0,15$).

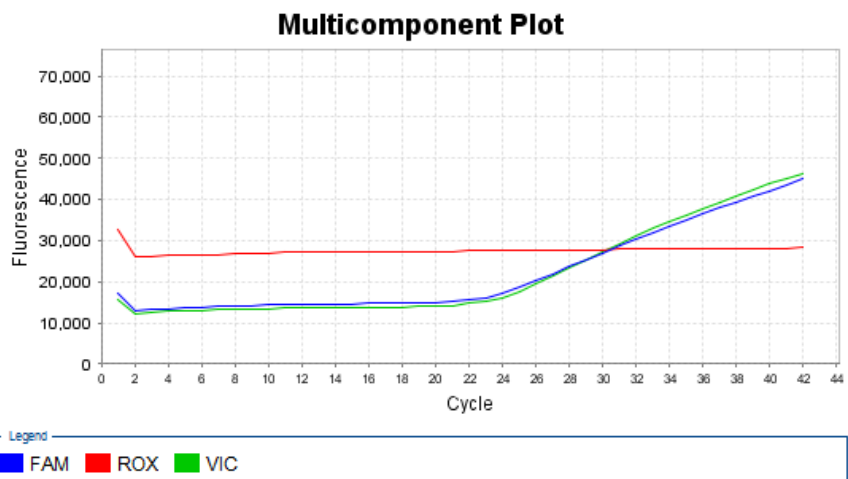
Teste de homogeneidade entre esses dois grupos (figura 4.5), não mostraram diferenças estatisticamente significantes ($\chi^2= 3,5758$, $p=0,05$). Da mesma forma não se observam diferenças nas frequências alélicas ($\chi^2= 3,1137$, $p=0,07$) como pode ser visto na Figura 4.6. Portanto, a estimativa de risco do alelo selvagem (G) não foi significativa (OR=1,345; IC-95%: 0,967 – 1,871).



A



B



C

Fig.4.4 Gráficos Multicomponentes para o polimorfismo rs1800797 da IL-6. Em A foi observado o aumento da fluorescência do Fluoróforo FAM que se anela ao alelo selvagem G. Em B vemos um aumento da fluorescência somente do VIC que se anela ao alelo mutado A e em C observamos o aumento da fluorescência dos dois fluoróforos indicando um heterozigoto.

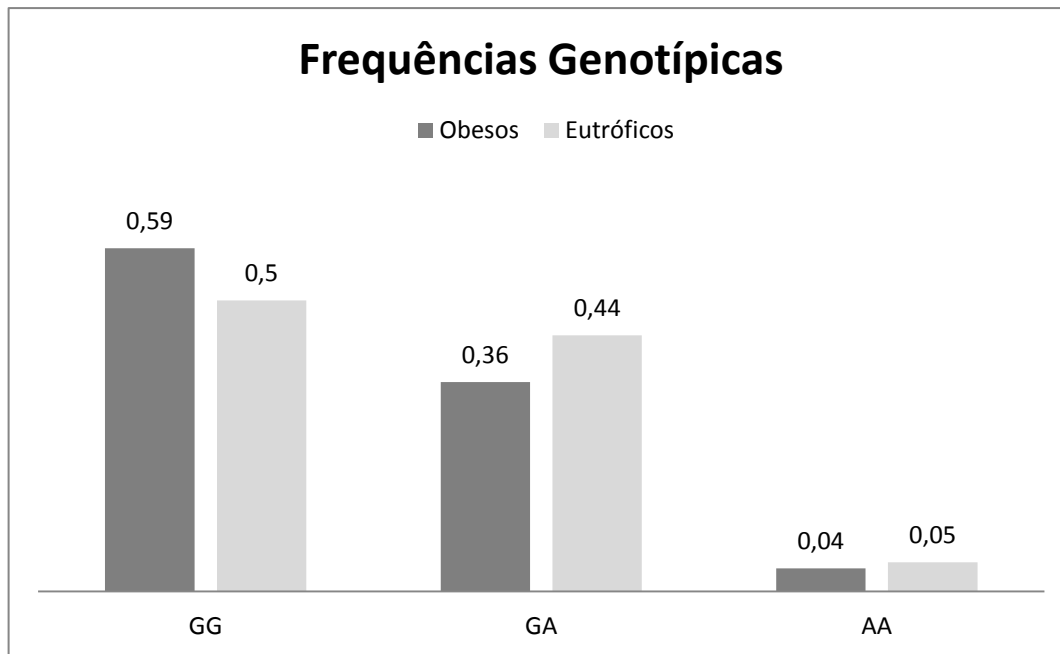


Fig. 4.5 Frequências genotípicas relativas ao rs1800797.

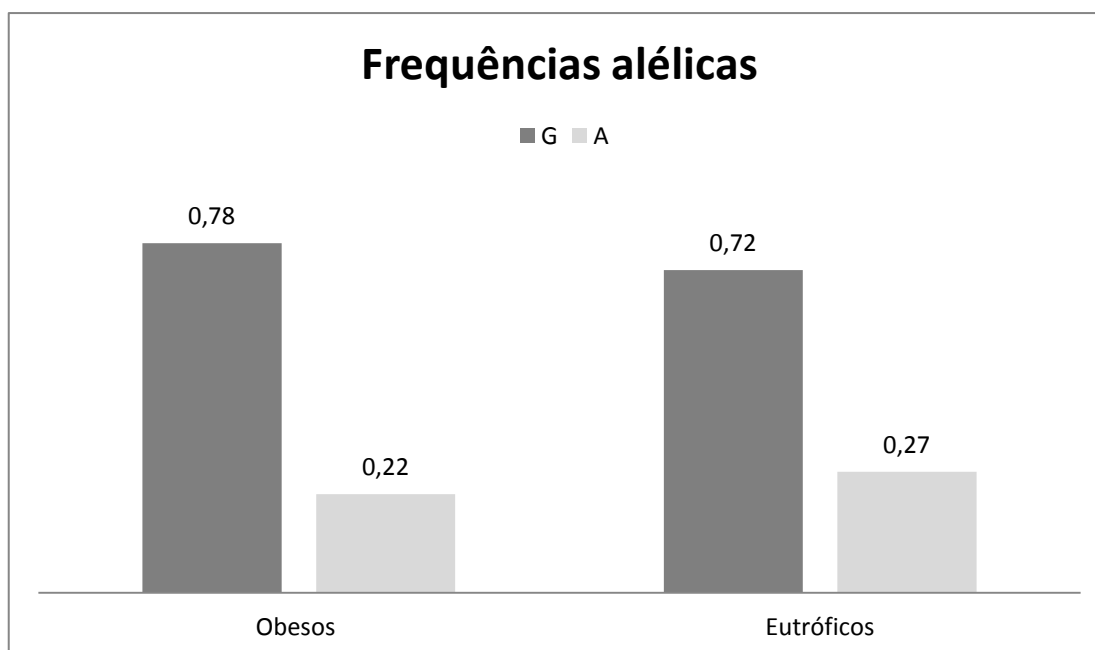


Fig.4.6 Frequências Alélicas do polimorfismo rs1800797

A possível influência do polimorfismo rs1800797 sobre as variáveis bioquímicas, antropométricas e pressóricas foram testadas e os resultados para ambos os grupos encontram-se nas tabelas 4.5 e 4.6. Observamos que esta variante influencia nos valores de LDL nos obesos, e nos eutróficos encontramos uma associação significativa com os valores de PAS.

Tabela 4.5 Associação do polimorfismo rs1800797 do gene IL6 com as variáveis antropométricas, bioquímicas e pressóricas em eutróficos.

Variáveis	N	GG	GA	AA	p
IMC (Kg/m ²)	180	23 (21; 24)	23 (21; 24)	22 (19; 23)	0,23
Circunferência Abdominal (cm)	181	85 (78; 91)	83 (75; 91)	81 (74; 87)	0,24
Circunferência do Quadril (cm)	181	96 (84; 101)	94,7 (84; 99)	98 (90; 103)	0,52
Glicose (mg/dl)	167	89 (82; 95)	89 (85; 97)	92 (86; 96)	0,41
Colesterol Total	167	180 (156; 201)	172 (152; 192)	225(177; 272)	0,07
HDL (mg/dl)	167	59 (49; 68)	57 (45; 68)	64 (57; 68)	0,5
LDL (mg/dl)	166	102 (88; 124)	101 (81; 123)	104 (82; 147)	0,6
VLDL (mg/dl)	166	15 (12; 20)	16 (12; 20)	17 (10; 22)	0,71
Triglicerídeos (mg/dl)	167	74 (60; 101)	79 (59; 102)	86 (66; 109)	0,56
Hemoglobina Glicada (%)	60	4,95 (4,6; 5,4)	4,7 (4,45; 5,45)	4,8 (4,5)	0,72
PCR (mg/dl)	62	0,165 (0,05; 0,3)	0,21 (0,05; 0,31)	0,18(0,03; 0,18)	0,94
PAS (mmHg)	168	120 (110; 126)	117 (109; 126)	105 (99; 110)	0,001
PAD (mmHg)	168	77 (68; 82)	75 (67; 84)	70 (64; 75)	0,19

PAS -Pressão arterial sistólica, PAD – Pressão arterial diastólica, PCR Proteína C Reativa e IMC – índice de massa corpórea. O *p*-valor corresponde à significância estatística do teste Kruskal Wallis.
 Nota: Os valores representam medianas (25 percentil e 75 percentil).

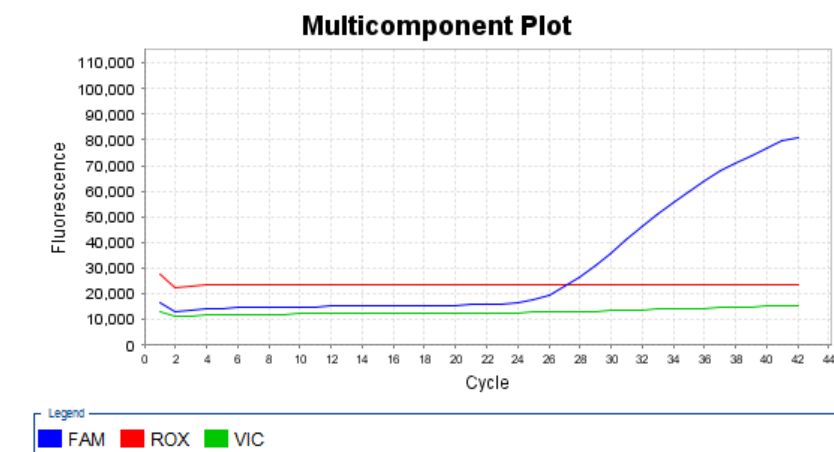
Tabela 4.6 Associação do polimorfismo rs1800797 do gene IL6 com as variáveis antropométricas, bioquímicas e pressóricas em obesos.

Variáveis	N	GG	GA	AA	p
IMC (Kg/m ²)	196	44 (38; 51)	45 (39; 52)	41 (36; 48)	0,32
Circunferência Abdominal (cm)	195	130 (117; 144)	137 (121; 145)	124 (111; 130)	0,09
Circunferência do Quadril (cm)	195	138,0 (125; 150)	141 (128; 152)	124 (107; 148)	0,10
Glicose (mg/dl)	131	100 (92; 109)	101 (91; 113)	89 (88)	0,38
Colesterol Total	162	198 (180; 228)	194 (164; 216)	180 (141; 228)	0,19
HDL (mg/dl)	163	48 (42; 54)	48 (41; 56)	46 (41; 54)	0,84
LDL (mg/dl)	158	123 (103; 143)	121,0 (92; 138)	81 (72; 112)	0,04
VLDL (mg/dl)	158	27 (19; 37)	23 (17; 32)	18 (16; 26)	0,13
Triglicerídeos (mg/dl)	162	136 (104; 192)	113 (86; 160)	124 (86; 342)	0,16
Hemoglobina Glicada (%)	127	5,5 (4,9; 6,0)	5,45 (4,9; 5,8)	4,4 (4,3)	0,06
PCR (mg/dl)	153	1,0 (0,56; 1,52)	0,975 (0,48; 1,75)	0,42 (0,07; 1,50)	0,38
PAS (mmHg)	142	136 (120; 150)	130 (115; 148)	115 (101; 132)	0,16
PAD (mmHg)	142	88 (76; 99)	83 (73; 93)	80 (70; 96)	0,52

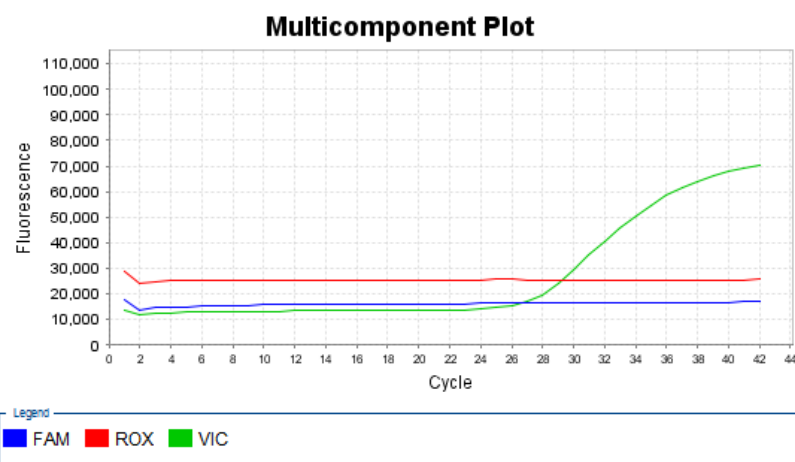
PAS -Pressão arterial sistólica, PAD – Pressão arterial diastólica, PCR Proteína C Reativa e IMC – índice de massa corpórea. O *p*-valor corresponde à significância estatística do teste Kruskal Wallis.
 Nota: Os valores representam medianas (25 percentil e 75 percentil).

Em relação a uma possível associação do polimorfismo rs1800797 com comorbidades relacionadas à obesidade, não encontramos resultados significativos, sugerindo que este polimorfismo não está associado com o aparecimento e desenvolvimento da diabetes, SM ou hipertensão. Da mesma forma analisamos primeiramente obesos totais (diabetes $\chi^2= 3,34$ $p=0,18$; SM $\chi^2= 4,81$ $p=0,09$ Hipertensão $\chi^2=0,76$ $p=0,68$), depois obesos de grau 2 e 3 (diabetes $\chi^2= 3,18$ $p=0,20$; SM $\chi^2=5,95$ $p=0,05$; Hipertensão $\chi^2=1,66$, $p=0,43$) e por fim obesos mórbidos somente (diabetes $\chi^2=4,73$, $p=0,09$; SM $\chi^2=5,168$, $p=0,07$; Hipertensão $\chi^2=1,29$, $p=0,52$).

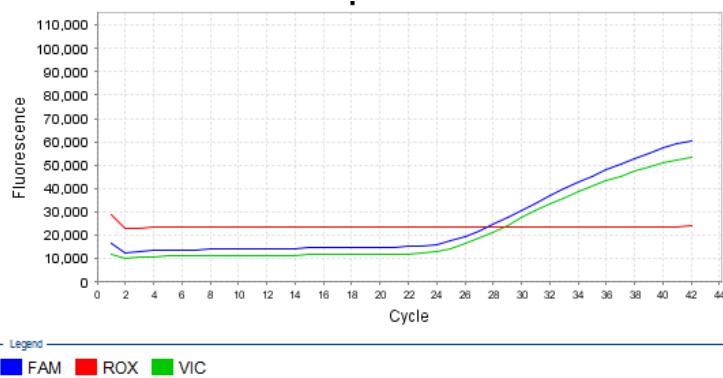
Em relação ao polimorfismo rs1800795 no gene que codifica a citocina Interleucina 6, investigamos sua possível associação com a obesidade. A figura 4.7 mostra o padrão de amplificação para este polimorfismo utilizando sondas Taqman. Em primeiro lugar, a análise de equilíbrio de Hardy-Weinberg mostrou que ambas as amostras, obesos ($\chi^2= 0,75, p=0,38$) e eutróficos ($\chi^2= 2,28, p=0,13$) estão em equilíbrio. A figura 4.8 mostra as frequências genotípicas encontradas durante o estudo, não sendo observadas diferenças significativas entre os grupos estudados ($\chi^2= 1,9341, p=0,16$), assim como, não foram observadas diferenças em relação às frequências alélicas ($\chi^2= 1,6109, p=0,20$). Em relação à análise de risco, observamos em nosso estudo que a presença do alelo selvagem G é um fator de risco entre os obesos, porém sem valor estatístico de risco para a obesidade (OR=1,234 IC - 95% 0,892 – 1,708) (Figura 4.9).



A



B



C

Fig.4.7 Gráficos de amplificação para o polimorfismo rs1800795; em A somente o fluoróforo de FAM aumenta, se anelando ao alelo selvagem G, em B somente o fluoróforo VIC aumentou, se anelando ao alelo C que é o alelo mutado, e em C observamos um aumento de fluorescência de ambos os fluoróforos.

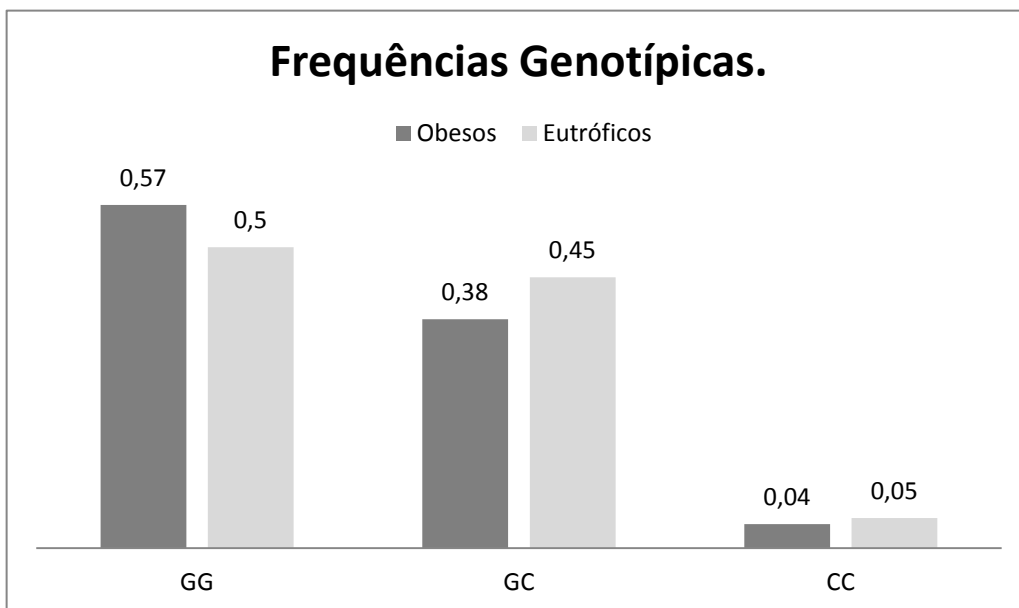


Fig.4.8 Frequências Genotípicas para a variante rs1800795.

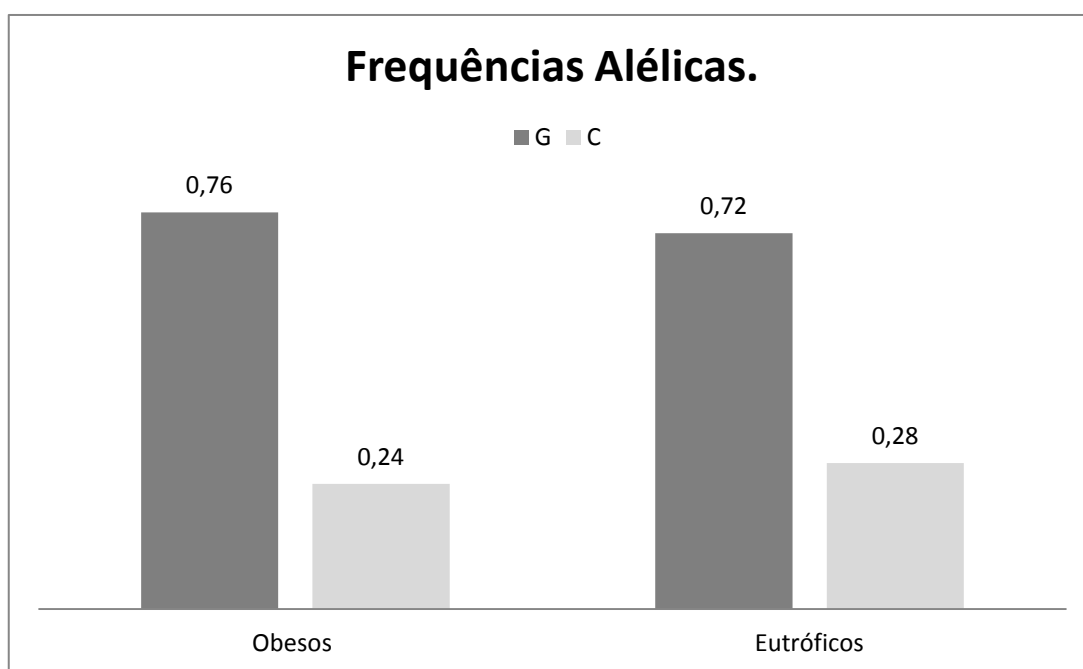


Fig.4.9. Frequências alélicas para o polimorfismo rs1800795.

Em nosso estudo, buscamos uma possível influência do polimorfismo em relação às variáveis bioquímicas, antropométricas e pressóricas. Nossas análises revelaram que o polimorfismo estava associado aos valores de LDL e Hemoglobina glicada em relação aos obesos, como mostrado na tabela 4.8. Nos eutróficos não observamos valores significativos (tabela 4.7).

Tabela 4.7 Associação do polimorfismo rs1800795 do gene IL6 com as variáveis antropométricas, bioquímicas e pressóricas em eutróficos.

Variáveis	N	GG	GC	CC	p
IMC (Kg/m ²)	180	23 (21; 24)	23 (21; 24)	22, (19; 22)	0,22
Circunferência Abdominal (cm)	181	85 (78; 91)	84 (75; 91)	81 (74; 87)	0,27
Circunferência do Quadril (cm)	181	96 (84; 101)	95,0 (86,25; 99,75)	98 (91; 104)	0,51
Glicose (mg/dl)	167	89 (82; 95)	90 (85; 97)	92,0 (86,0; 96,0)	0,18
Colesterol Total	167	181 (156; 204)	172 (152; 192)	225 (177; 272)	0,06
HDL (mg/dl)	167	59 (49; 69)	57 (45; 68)	64 (57; 68)	0,55
LDL (mg/dl)	166	102 (88; 126)	101 (81; 121)	104 (82; 147)	0,6
VLDL (mg/dl)	166	14 (12; 20)	16 (12; 20)	17 (10; 22)	0,61
Triglicérides (mg/dl)	167	74 (61; 102)	79 (58; 101)	86 (66; 109)	0,60
Hemoglobina Glicada (%)	60	4,95 (4,6; 5,425)	4,7 (4,4; 5,4)	4,8 (4,5;)	0,72
PCR (mg/dl)	62	0,17 (0,06; 0,31)	0,2 (0,04; 0,3075)	0,18 (0,03)	0,99
PAS (mmHg)	168	120 (110; 126)	117 (109; 126)	105 (99; 110)	0,02
PAD (mmHg)	168	76 (67; 81)	76 (67; 84)	70 (64; 75)	0,17

PAS -Pressão arterial sistólica, PAD – Pressão arterial diastólica, PCR Proteína C Reativa e IMC – índice de massa corpórea.

O *p*-valor corresponde à significância estatística do teste Kruskal Wallis.

Nota: Os valores representam medianas (25 percentil e 75 percentil).

Tabela 4.8 Associação do polimorfismo rs1800795 do gene IL6 com as variáveis antropométricas, bioquímicas e pressóricas em obesos.

Variáveis	N	GG	GC	CC	<i>p</i>
IMC (Kg/m ²)	196	44 (38; 51)	45 (39; 51)	39 (36; 47)	0,37
Circunferência Abdominal (cm)	195	130 (117; 144)	136 (121; 144)	126(111; 129)	0,14
Circunferência do Quadril (cm)	195	138 (125; 150)	140 (128; 152)	127 (112; 139)	0,13
Glicose (mg/dl)	131	102 (91; 111)	100 (92; 112)	89 (88)	0,5
Colesterol Total	162	197 (180; 228)	197 (161; 218)	180 (141; 228)	0,19
HDL (mg/dl)	163	48 (42; 54)	49 (41; 56)	46 (41; 54)	0,85
LDL (mg/dl)	158	123 (102; 143)	122,0 (94,0; 138,5)	81 (72; 112)	0,04
VLDL (mg/dl)	158	26 (19; 37)	23 (17; 32)	18 (16; 26)	0,09
Triglicerídeos (mg/dl)	162	134 (96; 192)	117 (89; 162)	124 (86; 342)	0,28
Hemoglobina Glicada (%)	127	5,5 (5,1; 6,0)	5,4 (4,85; 5,8)	4,4 (4,3; 4,4)	0,03
PCR (mg/dl)	153	1,0 (0,5; 1,5)	0,975 (0,54; 1,83)	0,425 (0,07; 1,5)	0,39
PAS (mmHg)	142	136 (120; 150)	130 (114; 149)	112,5 (102; 131)	0,09
PAD (mmHg)	142	89; (79; 98)	83 (73; 97)	75 (70; 96)	0,44

PAS -Pressão arterial sistólica, PAD – Pressão arterial diastólica, PCR Proteína C Reativa e IMC – índice de massa corpórea. O *p*-valor corresponde à significância estatística do teste Kruskal Wallis.
 Nota: Os valores representam medianas (25 percentil e 75 percentil).

Posteriormente, analisamos o polimorfismo rs1800795 e sua possível associação com diabetes, SM e hipertensão em obesos. Nossos resultados revelaram que o polimorfismo estava associado à SM, quando comparamos obesos totais (Tabela 4.9). Quando analisamos somente obesos mórbidos também foram encontradas associações significativas para SM (Tabela 4.11) e, ao analisarmos obesos de grau 2 e mórbidos também foram encontradas associações significativas com SM (tabela 4.10), indicando que este polimorfismo pode estar influenciando na prevalência desta comorbidade em obesos. Análises posteriores revelaram que o alelo selvagem é um fator de risco para este

Tabela 4.9 Associação do rs1800795 da Interleucina 6 com SM, na amostra de obesos totais.

Genótipos	Sim	Não	prop	<i>P</i>
GG	75	19	0,80	
GC	36	27	0,57	0,007
CC	4	3	0,57	
Total	115	49	0,70	

Tabela 4.10 Correlação do rs1800795 com SM, na amostra de obesos de grau 2 e 3.

Genótipos	Sim	Não	prop	<i>P</i>
GG	66	14	0,83	
GC	32	25	0,56	0,002
CC	3	3	0,50	
Total	101	42	0,71	

Tabela 4.11 Análise de associação do rs1800795 com SM, na amostra de obesos mórbidos.

Genótipos	Sim	Não	prop	<i>p</i>
GG	54	11	0,83	
GC	25	19	0,57	0,01
CC	2	1	0,67	
Total	81	31	0,72	

4.4.- Polimorfismo rs1800872 do Gene *IL-10*

O polimorfismo rs1800872 da interleucina 10 foi testado em ambos os grupos, eutróficos e obesos. O padrão de amplificação é mostrado na figura 4.10. Neste polimorfismo o fluoróforo FAM se anela ao alelo selvagem C, entretanto o fluoróforo VIC também aumenta sua fluorescência no homozigoto selvagem, como mostrado na figura 4.10 A, porém, quando ocorre a presença de um heterozigoto o fluorescência do VIC ultrapassa a do FAM como mostrado na figura 4.10 B. As análises preliminares mostraram que as amostras estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg tanto as amostras dos eutróficos ($\chi^2= 0,86$ $p=0,35$) quanto os obesos ($\chi^2= 1,165$, $p=0,28$). Com relação às frequências genotípicas, não observamos diferenças significativas entre os grupos ($\chi^2=5,032$, $p=0,08$) (Figura 4.11) e, nas frequências alélicas também não foram observadas diferenças entre os grupos ($\chi^2= 3,14$, $p= 0,07$). A estimativa de risco não foi significativa para este polimorfismo, porém o alelo mutado A está ligeiramente aumentado em obesos (OR= 1,372; IC95%: 1,012-1,812) (Figura 4.12).

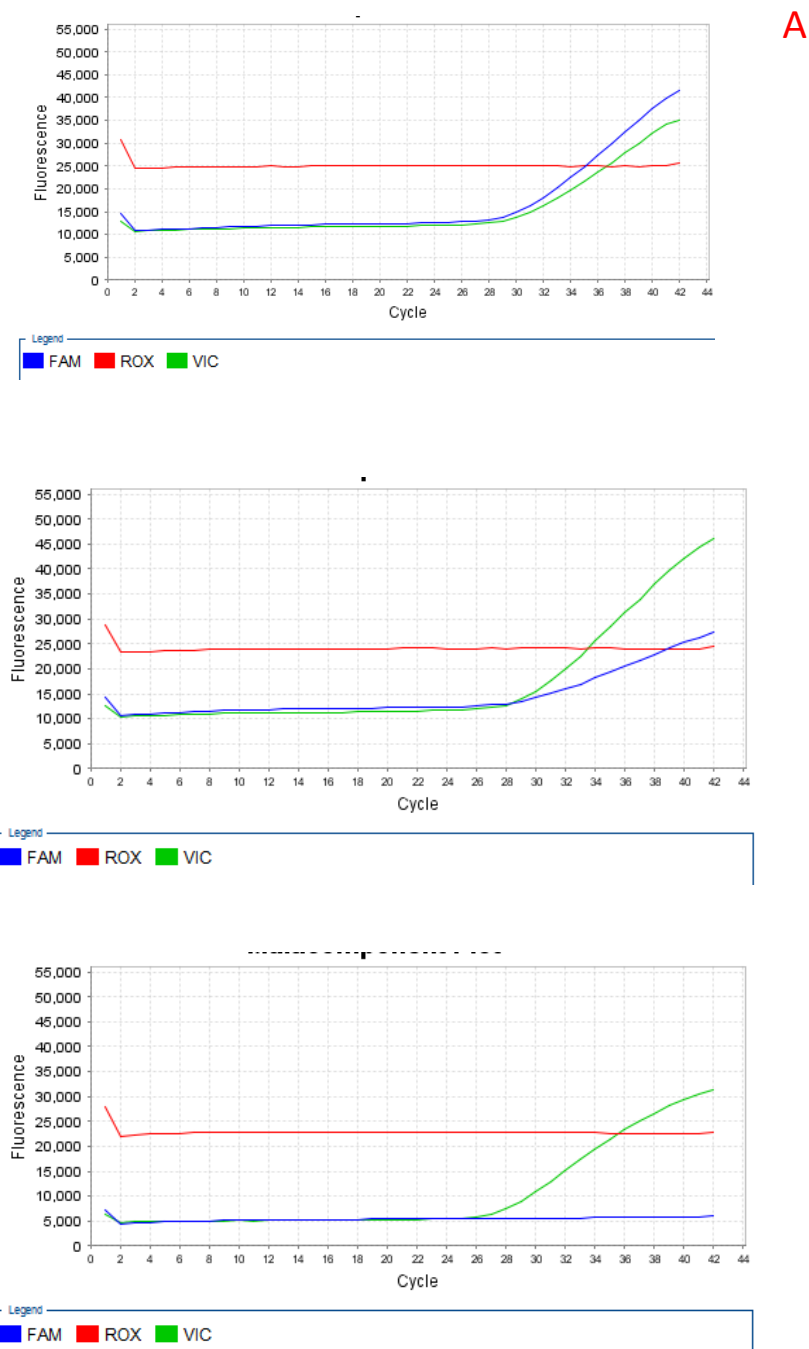


Fig.4.10 Ampliação do polimorfismo rs1800872, onde 4.10A representa o homocigoto selvagem CC, o gráfico 4.10B representa o heterocigoto CA e o gráfico 4.10C o homocigoto AA.

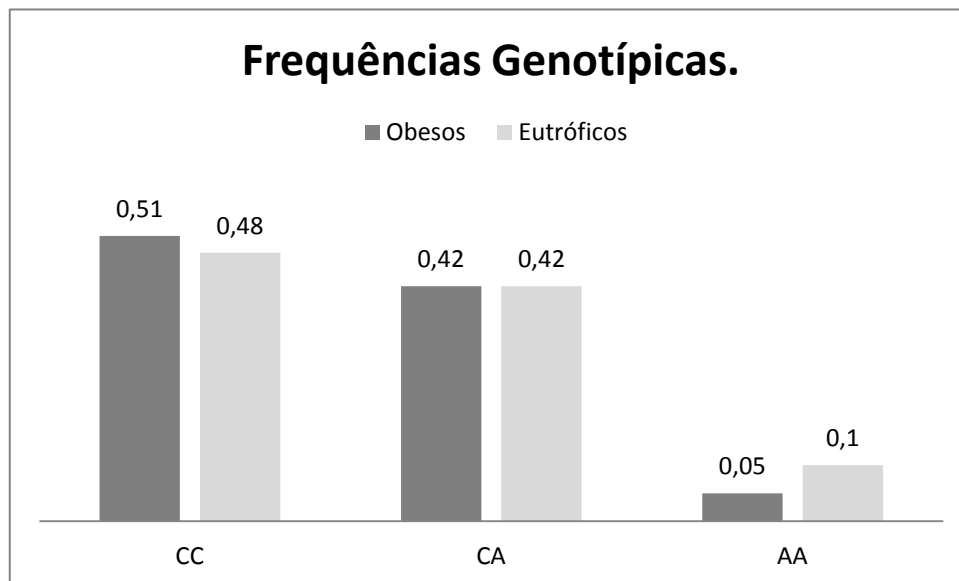


Fig.4.11. Frequências Genotípicas para o polimorfismo rs1800872.

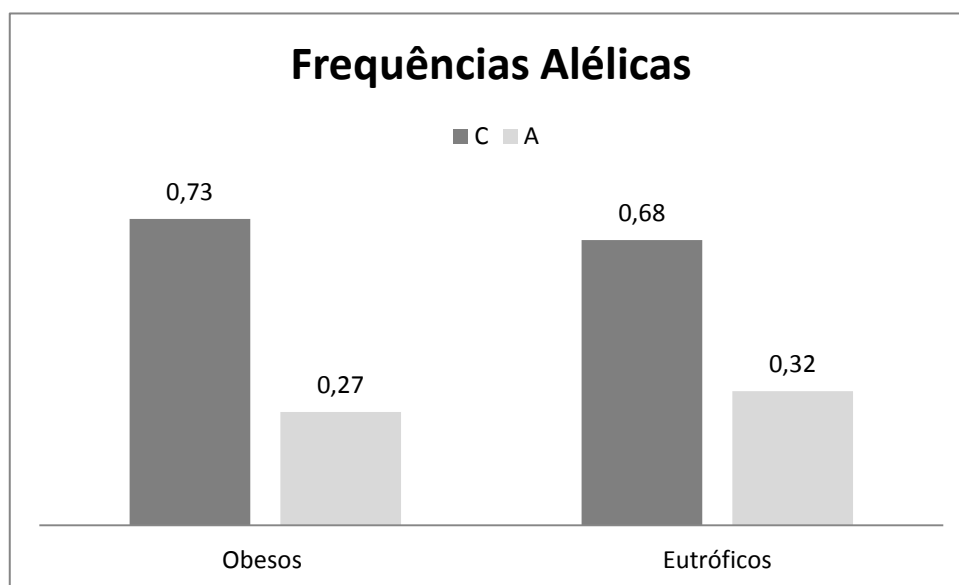


Fig. 4.12. Distribuição das frequências alélicas entre os grupos para o polimorfismo rs1800872.

Com relação a uma possível associação do polimorfismo com alguma das variáveis bioquímicas, antropométricas e pressóricas, não foram observados valores significativos para nenhuma das variáveis avaliadas no grupo dos eutróficos (tabela 4.12), porém no grupo dos obesos, encontramos valores significativos para glicose, sugerindo que o polimorfismo pode influenciar nesta variável (tabela 4.13).

Tabela 4.12 Associação do polimorfismo rs1800872 do gene IL-10 com as variáveis antropométricas, bioquímicas e pressóricas em eutróficos.

Variáveis	N	CC	CA	AA	<i>p</i>
IMC (Kg/m ²)	177	23, (21; 24)	22 (21; 24)	23 (20; 24)	0,49
Circunferência Abdominal (cm)	178	85 (76; 92)	83 (76; 90)	85 (82; 94)	0,65
Circunferência do Quadril (cm)	178	95 (84; 100)	97 (88; 101)	95 (82;102)	0,53
Glicose (mg/dl)	167	87 (84; 95)	90 (83; 98)	91 (83; 93)	0,58
Colesterol Total	167	176 (153; 193)	178 (160; 214)	173 (146; 194)	0,79
HDL (mg/dl)	167	58 (46; 67)	60 (47; 73)	54 (49; 62)	0,44
LDL (mg/dl)	166	100 (84; 121)	107 (88; 128)	95 (82; 128)	0,27
VLDL (mg/dl)	166	15 (11; 21)	16 (13; 20)	13 (10; 18)	0,16
Triglicerídeos (mg/dl)	167	74 (57; 104)	81 (68; 101)	66 (55; 102)	0,35
Hemoglobina Glicada (%)	60	4,8 (4,5; 5,4)	5,0 (4,5; 5,2)	4,7 (4,3; 5,8)	0,9
PCR (mg/dl)	62	0,21 (0,08; 0,34)	0,17 (0,01; 0,29)	0,19 (0,07; 0,30)	0,6
PAS (mmHg)	166	117 (109; 124)	120 (110; 127)	114 (102; 125)	0,22
PAD (mmHg)	166	76 (67; 81)	76 (67; 84)	74 (69; 80)	0,9

PAS -Pressão arterial sistólica, PAD – Pressão arterial diastólica, PCR Proteína C Reativa e IMC – índice de massa corpórea.

O *p*-valor corresponde à significância estatística do teste Kruskal Wallis.

Nota: Os valores representam medianas (25 percentil e 75 percentil).

Tabela 4.13 Associação do polimorfismo rs1800872 do gene IL-10 com as variáveis antropométricas, bioquímicas e pressóricas em obesos.

Variáveis	N	CC	CA	AA	<i>p</i>
IMC (Kg/m ²)	194	46 (39; 52)	44,06 (39; 50)	42,52 (38,3; 49,9)	0,20
Circunferência Abdominal (cm)	193	133 (121; 146);	130 (117; 144)	129 (116; 141)	0,31
Circunferência do Quadril (cm)	193	141 (129; 153)	134 (123; 146)	135(121; 147)	0,11
Glicose (mg/dl)	130	102 (91; 113)	103 (93; 112)	92 (89; 98)	0,01
Colesterol Total	160	200 (180; 227)	194 (171; 222)	192,0 (167,0; 236,0)	0,75
HDL (mg/dl)	161	46 (42; 53)	50 (42; 60)	47,0 (41,0; 51,0)	0,12
LDL (mg/dl)	156	124 (98; 145)	118 (97; 137)	129,5 (106,0; 145,1)	0,32
VLDL (mg/dl)	156	27 (22; 35)	24 (18; 35)	26,4 (15,75; 35,0)	0,33
Triglicéridos (mg/dl)	160	139 (110,0; 186)	123 (89; 177)	149,0 (78,0; 192,0)	0,24
Hemoglobina Glicada (%)	126	5,5 (4,9; 6,0)	5,4 (4,9; 5,8)	5,4 (4,6; 6,1)	0,86
PCR (mg/dl)	151	0,97 (0,6; 1,)	0,99 (0,49; 1,41)	1,44 (0,53; 1,94)	0,65
PAS (mmHg)	141	134 (120; 150)	131 (115; 149)	130(110; 147)	0,57
PAD (mmHg)	141	86 (78; 92)	85 (70; 97)	83 (72; 100)	0,84

PAS -Pressão arterial sistólica, PAD – Pressão arterial diastólica, PCR Proteína C Reativa e IMC – índice de massa corpórea. O *p*-valor corresponde à significância estatística do teste Kruskal Wallis.

Nota: Os valores representam medianas (25 percentil e 75 percentil).

Em relação à associação do polimorfismo com diabetes, SM e hipertensão, foram encontrados resultados significativos para diabetes, quando analisamos a amostra de obesos totais, análises posteriores revelaram que o alelo mutado A é um fator de risco (tabela 4.14); quando analisamos obesos de grau 2 e 3 (diabetes $\chi^2= 2,98$ $p=0,22$; SM $\chi^2=2,74$ $p=0,25$; Hipertensão $\chi^2=1,70$, $p=0,60$) e obesos mórbidos (diabetes $\chi^2= 1,64$, $p=0,44$; SM $\chi^2=3,542$ $p=0,0,17$; Hipertensão $\chi^2=0,23$ $p=0,89$), não encontramos resultados significativos.

Tabela 4.14 Análise de associação do rs1800872 em relação ao Diabetes, SM e Hipertensão, na amostra total dos obesos.

Genótipos	Sim	Não	prop	<i>p</i>
CC	58	16	0,78	
CA	61	32	0,66	0,03
AA	23	3	0,88	
Total	142	51	0,74	

4.5. Polimorfismos do gene *LEP*.

Os polimorfismos do gene *LEP*, que codificam a adipocina conhecida como leptina, foram amplificados utilizando a técnica de PCR-RFLP; primeiramente estudamos a variante rs7799039. A figura 4.13 mostra a amplificação em gel de agarose e a digestão enzimática utilizando a enzima de restrição Hha I para identificar os genótipos do polimorfismo. Em seguida, nossas análises de equilíbrio de Hardy Weinberg mostraram que essas amostras estavam em equilíbrio para o polimorfismo investigado ($\chi^2= 0,564$; $p=0,45$) para os obesos e ($\chi^2=1,08$; $p=0,29$) para os eutróficos. A Figura 4.14 mostra as frequências genótípicas encontradas em nosso estudo, onde foram observadas diferenças significativas com relação a frequências genótípicas ($\chi^2= 19,474$ $p<0,001$). O mesmo resultado, também foi encontrado com relação às frequências alélicas ($\chi^2= 19,19$; $p<0,001$) (Figura 4.15). Com base nesses resultados, análises posteriores mostraram que o alelo G é um fator de risco para a obesidade (OR = 1,974; IC95%: 1,453 – 2,681).

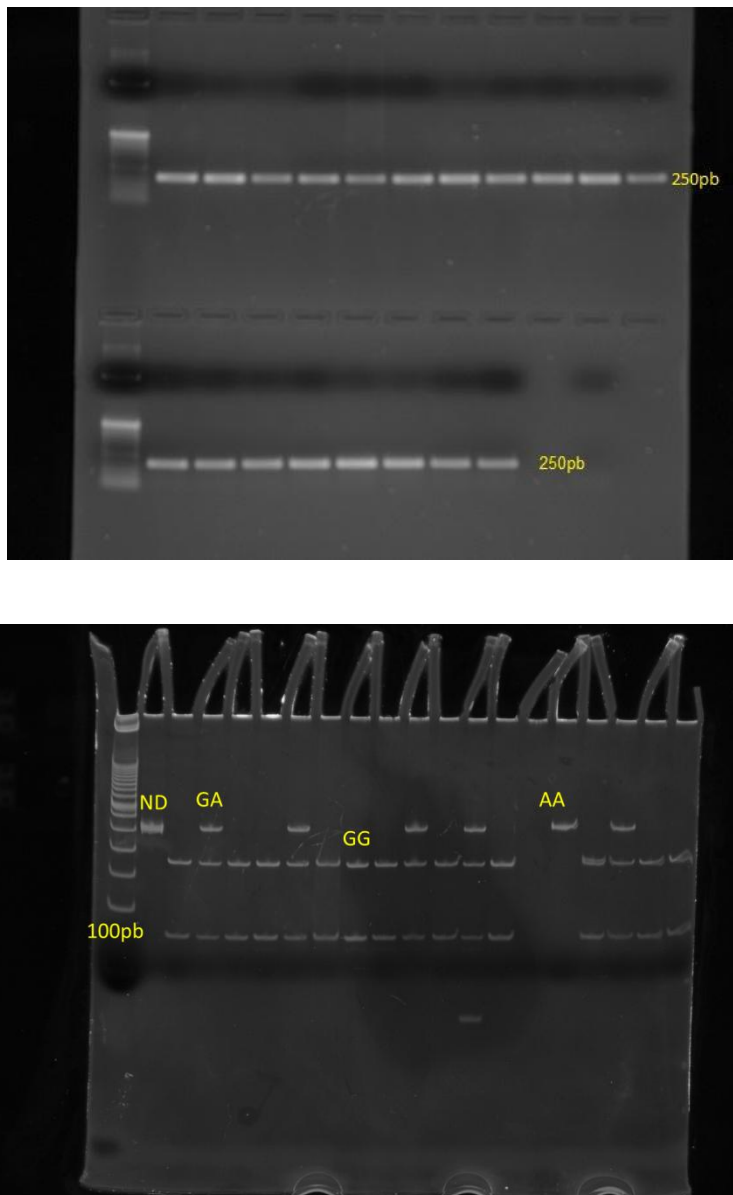


Fig.4.13. A amplificação da região que contém o polimorfismo de interesse está representada acima em um gel de agarose a 1,5%. A digestão enzimática em gel de poliacrilamida a 10% esta mostrada abaixo. Nesta foto estão representados os genótipos encontrados, onde ND representa o fragmento não digerido pela enzima.

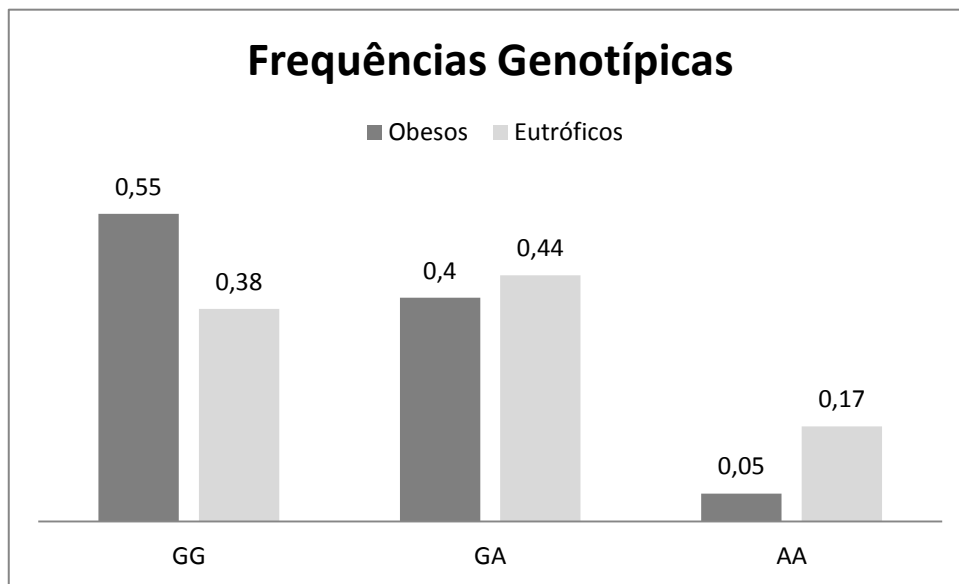


Fig.4.14. Frequências genotípicas encontradas em nosso estudo para o polimorfismo c.-2548G>A do gene *LEP*.

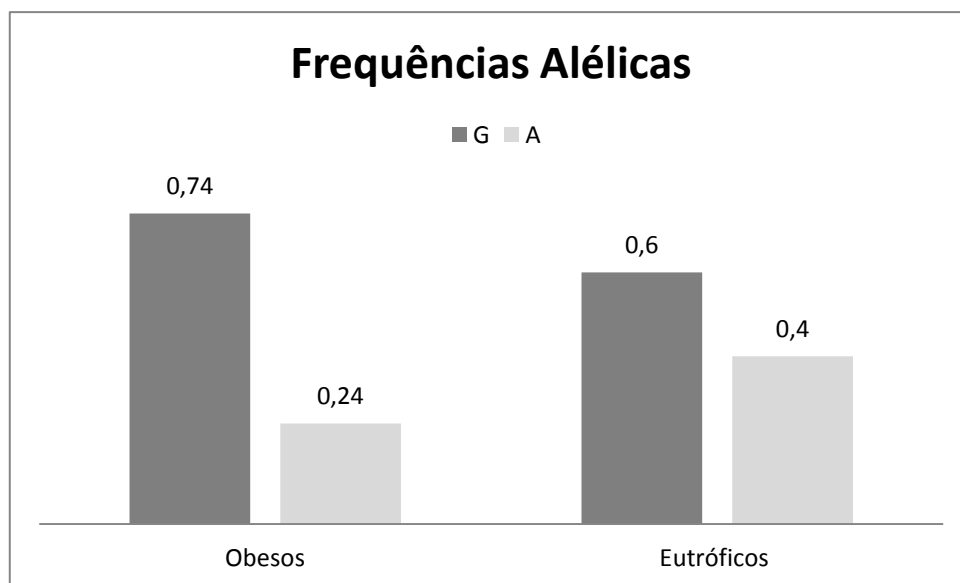


Fig. 4.15. Frequências alélicas para o polimorfismo rs7799039 do gene *LEP*.

Com relação à associação do polimorfismo com variáveis antropométricas, bioquímicas e pressóricas, não foram encontrados resultados significativos no grupo dos eutróficos (tabela 4.15), nem no grupo dos obesos (tabela 4.16).

Tabela 4.15 Associação do polimorfismo rs7799039 do gene LEP com as variáveis antropométricas, bioquímicas e pressóricas em eutróficos.

Variáveis	N	GG	GA	AA	p
IMC (Kg/m ²)	180	23 (21; 24)	23 (21; 24)	22 (20; 23)	0,49
Circunferência Abdominal (cm)	181	85 (78; 92)	83 (76; 89)	83 (75; 93)	0,35
Circunferência do Quadril (cm)	181	95 (83; 102)	97 (88; 100)	94 (82; 99)	0,46
Glicose (mg/dl)	167	87 (83; 95)	90 (85; 97)	90 (83; 94)	0,55
Colesterol Total	167	176 (156; 197)	176 (152; 199)	183 (161; 209)	0,38
HDL (mg/dl)	167	59 (49; 70)	58 (47; 68)	55 (44; 68)	0,61
LDL (mg/dl)	166	101 (83; 126)	102 (86; 122)	106 (86; 124)	0,99
VLDL (mg/dl)	166	15 (12; 23)	16 (12; 20)	14 (12; 20)	0,37
Triglicédeos (mg/dl)	167	75 (60; 106)	78 (61; 104)	68 (56; 96)	0,39
Hemoglobina Glicada (%)	60	4,9 (4,5; 5,5)	4,8 (4,5; 5,2)	4,9 (4,6; 5,5)	0,69
PCR (mg/dl)	62	0,2 (0,05; 0,3)	0,17 (0,05; 0,3)	0,20 (0,01; 0,30)	0,90
PAS (mmHg)	168	114 (107; 124)	120 (110; 126)	119 (114; 122)	0,1
PAD (mmHg)	168	73 (66; 80)	78 (70; 85)	76 (67; 80)	0,07

PAS -Pressão arterial sistólica, PAD – Pressão arterial diastólica, PCR Proteína C Reativa e IMC – índice de massa corpórea. O p-valor corresponde à significância estatística do teste Kruskal Wallis.
 Nota: Os valores representam medianas (25 percentil e 75 percentil).

Tabela 4.16 Associação do polimorfismo rs7799039 do gene LEP com as variáveis antropométricas, bioquímicas e pressóricas em obesos.

Variáveis	N	GG	GA	AA	<i>p</i>
IMC (Kg/m ²)	195	45 (39; 52)	43 (38; 51)	46 (37; 50)	0,38
Circunferência Abdominal (cm)	194	130 (119; 144)	131 (116; 142)	129(116; 149)	0,88
Circunferência do Quadril (cm)	194	139 (127,5; 151)	134 (126; 148)	133 (115; 151)	0,68
Glicose (mg/dl)	130	101 (91; 109)	98 (91; 111)	103 (88; 141)	0,97
Colesterol Total	161	197 (174; 221)	194 (173; 222)	229 (183; 234)	0,42
HDL (mg/dl)	162	47 (42; 53)	48 (42; 53)	65 (47; 71)	0,03
LDL (mg/dl)	157	120 (97; 135)	121 (99; 145)	142 (121; 158)	0,12
VLDL (mg/dl)	157	26 (19; 36)	24 (18; 35)	24 (15; 28)	0,34
Triglicerídeos (mg/dl)	161	133 (96; 185)	126 (89; 185)	121 (78; 140)	0,35
Hemoglobina Glicada (%)	126	5,5 (4,9; 6,0)	5,2 (4,8; 5,8)	5,3 (4,8; 6,4)	0,41
PCR (mg/dl)	152	1,0 (0,57; 1,45)	0,87 (0,5; 2,0)	1,3 (0,7; 1,8)	0,74
PAS (mmHg)	141	130 (115; 148)	140 (118; 150)	136 (110; 163)	0,44
PAD (mmHg)	141	84 (74; 95)	86 (77; 99)	71 (63; 101)	0,68

PAS -Pressão arterial sistólica, PAD – Pressão arterial diastólica, PCR Proteína C Reativa e IMC – índice de massa corpórea.

O *p*-valor corresponde à significância estatística do teste Kruskal Wallis.

Nota: Os valores representam medianas (25 percentil e 75 percentil).

Em relação às comorbidades associadas à obesidade, nossos resultados não mostraram associações significativas, quando analisamos obesos totais (diabetes $\chi^2=3,44$ $p=0,18$; SM $\chi^2=5,79$, $p=0,05$; Hipertensão $\chi^2=0,04$, $p=0,98$), obesos de grau 2 e mórbidos (diabetes $\chi^2=1,53$, $p=0,46$; SM $\chi^2=5,41$, $p=0,06$; Hipertensão $\chi^2=0,41$, $p=0,81$) e em obesos mórbidos (diabetes $\chi^2=0,532$, $p=0,76$; SM $\chi^2=4,19$, $p=0,12$; Hipertensão $\chi^2=1,76$, $p=0,41$).

O polimorfismo relacionado ao gene *LEP*, rs2167270, foi testado em ambos os grupos eutróficos e obesos; a figura 4.16 mostra a amplificação do fragmento que contém o polimorfismo de interesse e a digestão enzimática utilizando a enzima HpyCH4III. Em relação à análise de equilíbrio de Hardy-Weinberg, a amostra dos obesos encontra-se em equilíbrio ($\chi^2= 2,38$, $p=0,122$), entretanto a amostra dos eutróficos está fora do equilíbrio, como observado pelo valor de $\chi^2= 4,56$, $p=0,03$. Análises posteriores, também, revelaram que existem diferenças significativas com relação às frequências genotípicas em ambos os grupos ($\chi^2= 14,80$, $p<0,001$) (Figura 4.17), o mesmo resultado sendo encontrado para as frequências alélicas ($\chi^2= 8,24$, $p=0,04$), revelando que o alelo mutado A é uma fator de risco para a obesidade (OR=1,651; IC95%: 1,204 – 2,263) (Figura 4.18).

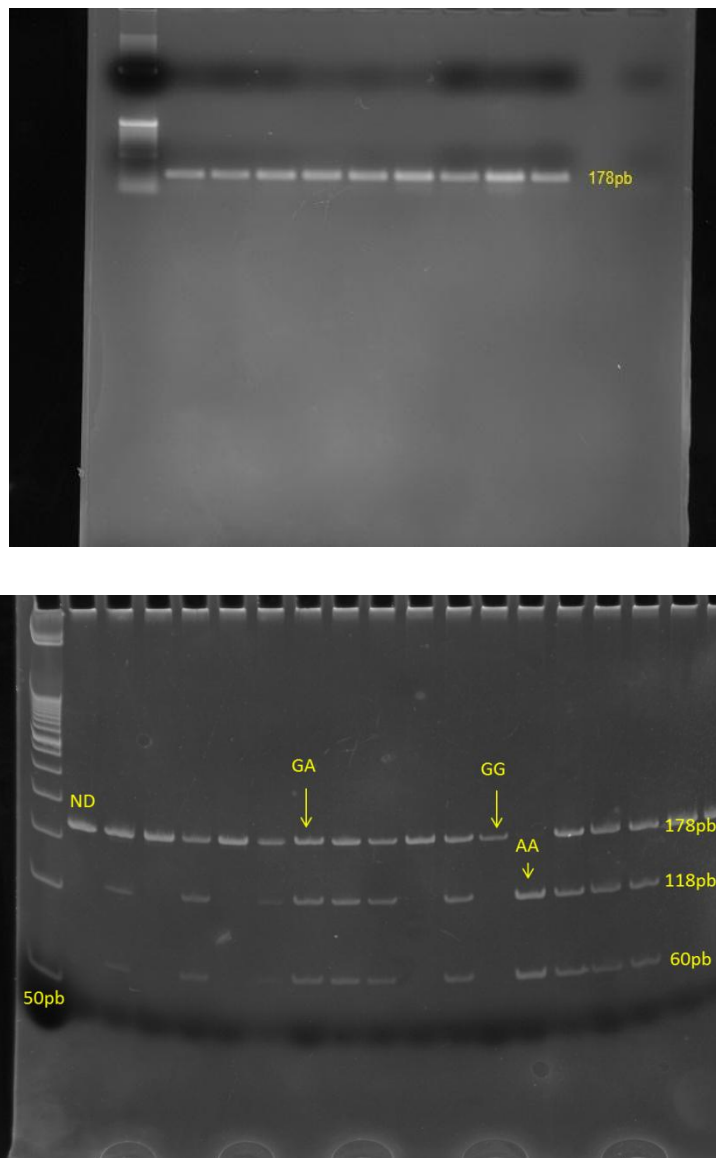


Fig. 4.16. Resultado da amplificação da região contendo o polimorfismo rs2167270. Acima em um gel de agarose a 1,5%. A digestão enzimática é mostrada abaixo, especificando os genótipos identificados em um gel de poliacrilamida a 10%, onde ND representa o fragmento não digerido pela enzima.

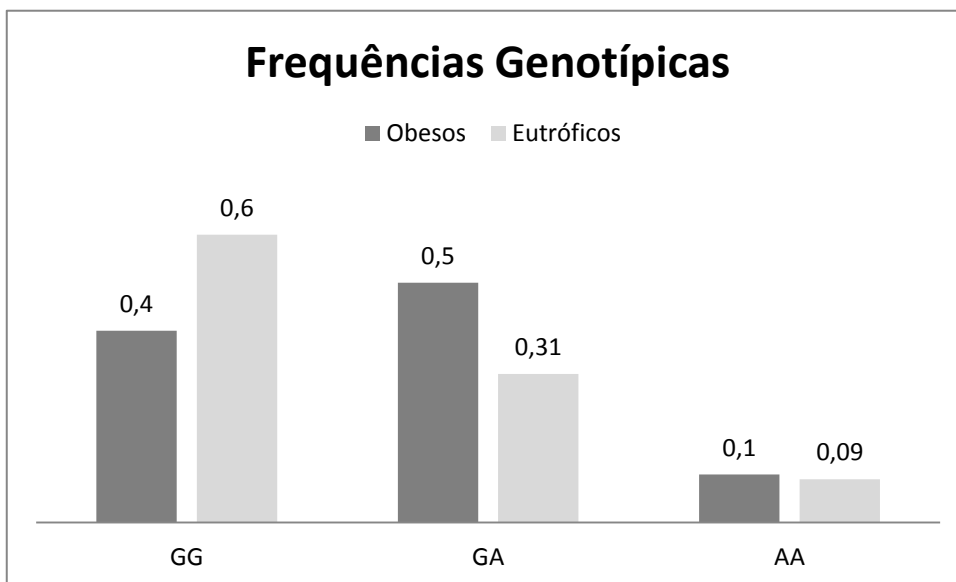


Fig.4.17 Frequências encontradas para o polimorfismo c. -19G>A do gene *LEP*

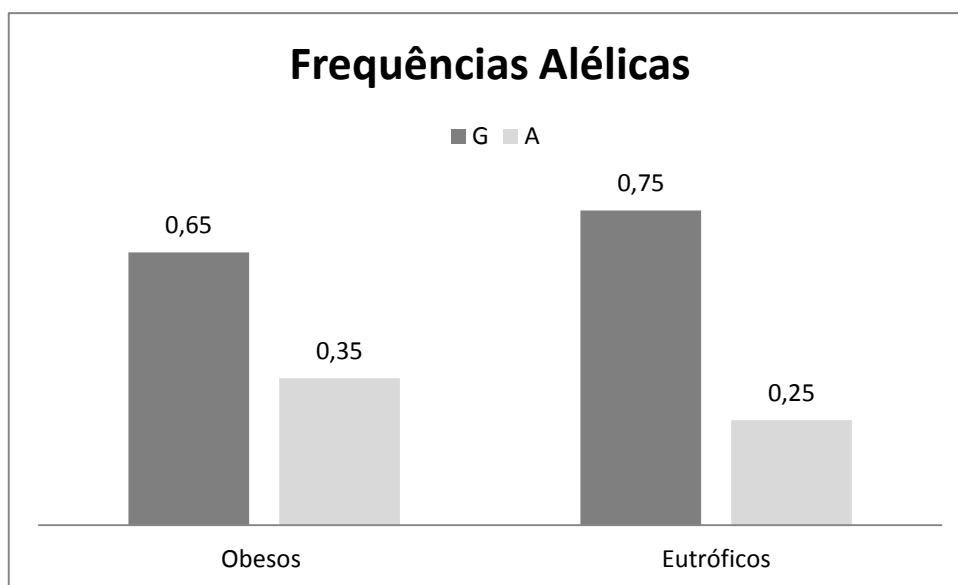


Fig.4.18. Frequências alélicas do polimorfismo rs2167270 do gene *LEP*.

A associação do polimorfismo com variáveis antropométricas, bioquímicas e pressóricas não revelou resultados significativos para o grupo dos eutróficos (tabela 4.17), nem para o grupo dos obesos (tabela 4.18).

Tabela 4.17 Associação do polimorfismo rs2167270 do gene LEP com as variáveis antropométricas, bioquímicas e pressóricas em eutróficos.

Variáveis	N	GG	GA	AA	<i>p</i>
IMC (Kg/m ²)	179	22 (21; 24)	23 (22; 24)	23 (20; 23)	0,28
Circunferência Abdominal (cm)	180	84 (77; 91)	84 (76; 94)	82 (73; 89)	0,63
Circunferência do Quadril (cm)	180	95 (83; 100)	96 (87; 102)	96 (82; 100)	0,61
Glicose (mg/dl)	166	89 (84; 97)	89 (83; 93)	93 (84; 98)	0,44
Colesterol Total	166	174 (153; 200)	179 (156; 196)	179 (157; 192)	0,67
HDL (mg/dl)	166	58 (47; 65)	60 (49; 73)	51 (44; 77)	0,19
LDL (mg/dl)	165	103 (88; 125)	100 (80; 119)	104 (86; 125)	0,53
VLDL (mg/dl)	165	15 (12; 20)	16 (12; 21)	18 (11; 20)	0,9
Triglicédeos (mg/dl)	166	74 (57; 104)	77 (63; 106)	78 (53; 100)	0,64
Hemoglobina Glicada (%)	60	4,8 (4,5; 5,4)	4,7 (4,4; 5,1)	5,0 (4,525; 6,6)	0,46
PCR (mg/dl)	62	0,16 (0,03; 0,295)	0,19 (0,07; 0,41)	0,2 (0,1; 0,3)	0,64
PAS (mmHg)	167	116 (110; 125)	119 (108; 125)	119 (109; 128)	0,9
PAD (mmHg)	167	75(69; 81)	75 (66; 82)	76 (64; 83)	0,96

PAS -Pressão arterial sistólica, PAD – Pressão arterial diastólica, PCR Proteína C Reativa e IMC – índice de massa corpórea. O *p*-valor corresponde à significância estatística do teste Kruskal Wallis.
 Nota: Os valores representam medianas (25 percentil e 75 percentil).

Tabela 4.18 Associação do polimorfismo rs2167270 do gene LEP com as variáveis antropométricas, bioquímicas e pressóricas em obesos.

Variáveis	N	GG	GA	AA	<i>p</i>
IMC (Kg/m ²)	195	44, (38; 50)	44 (38; 52)	45 (41; 49)	0,86
Circunferência Abdominal (cm)	194	130 (118; 142)	133 (118; 144)	130 (118; 147)	0,70
Circunferência do Quadril (cm)	194	136 (128; 149)	139 (125; 151)	140 (130; 148)	0,93
Glicose (mg/dl)	131	96 (89; 107)	103 (92; 114)	97 (90; 103)	0,10
Colesterol Total	161	199 (166; 232)	197 (180; 218)	186 (169; 221)	0,61
HDL (mg/dl)	162	50 (43; 58)	46 (41; 53)	47 (43; 60)	0,13
LDL (mg/dl)	157	122 (98; 144)	125 (98; 140)	114 (80; 140)	0,57
VLDL (mg/dl)	157	24 (17; 34)	26 (19; 35)	21 (13; 39)	0,36
Triglicerídeos (mg/dl)	161	121 (87; 178)	130 (98; 185)	106 (66; 195)	0,49
Hemoglobina Glicada (%)	127	5,4 (5,0; 5,8)	5,5 (4,7; 5,8)	5,3 (4,7; 6,2)	0,99
PCR (mg/dl)	152	0,8 (0,5; 1,4)	1,05 (0,55; 1,71)	0,7 (0,4; 1,3)	0,38
PAS (mmHg)	142	133 (117; 150)	135 (115; 149)	121 (110; 135)	0,31
PAD (mmHg)	142	84 (73; 97)	88 (77; 99)	85 (64; 95)	0,49

PAS -Pressão arterial sistólica, PAD – Pressão arterial diastólica, PCR Proteína C Reativa e IMC – índice de massa corpórea.

O *p*-valor corresponde à significância estatística do teste Kruskal Wallis.

Nota: Os valores representam medianas (25 percentil e 75 percentil).

Com relação a uma possível associação do polimorfismo rs2167270 com o desenvolvimento de diabetes, SM e hipertensão em obesos, não foram observados resultados significativos, quando foram analisados obesos totais (diabetes $\chi^2=0,17$, $p=0,91$; SM $\chi^2=2,35$, $p=0,30$; Hipertensão $\chi^2=4,08$, $p=0,13$), obesos grau 2 e mórbidos (diabetes $\chi^2= 0,016$, $p=0,89$; SM $\chi^2=3,337$, $p=0,18$; Hipertensão $\chi^2=3,78$, $p=0,15$) e somente obesos mórbidos (diabetes $\chi^2=0,25$, $p=0,88$; SM $\chi^2=4,89$, $p=0,08$; Hipertensão $\chi^2=4,87$, $p=0,08$), indicando que esta variante pode não estar relacionada ao surgimento destas doenças.

4.6 Gene *CCL2* rs3917887

No gene *CCL2* analisamos uma deleção de 14 pb no intron 1. O tamanho total do fragmento gerado pela PCR de indivíduos sem a deleção é de 249 pb, enquanto que os que apresentam a deleção geram um fragmento de 235 pb. A figura 4.19 mostra o padrão de amplificação e a identificação dos genótipos dos indivíduos, em gel de poli-acrilamida. Em relação á análise de equilíbrio de Hardy-Weinberg, tanto os obesos ($\chi^2=0,217$, $p=0,64$) quanto em eutróficos ($\chi^2= 0,13$, $p=0,71$), estavam em equilíbrio. Posteriormente, as frequências genotípicas também foram calculadas e não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ($\chi^2= 3,29$, $p=0,07$) como mostra a figura 4.20. As frequências alélicas foram calculadas e não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ($\chi^2= 3,41$ $p=0,06$). A análise de risco não foi significativa para a deleção (OR=1,328 IC95%: 0,982 - 1,795). (Figura 4.21).

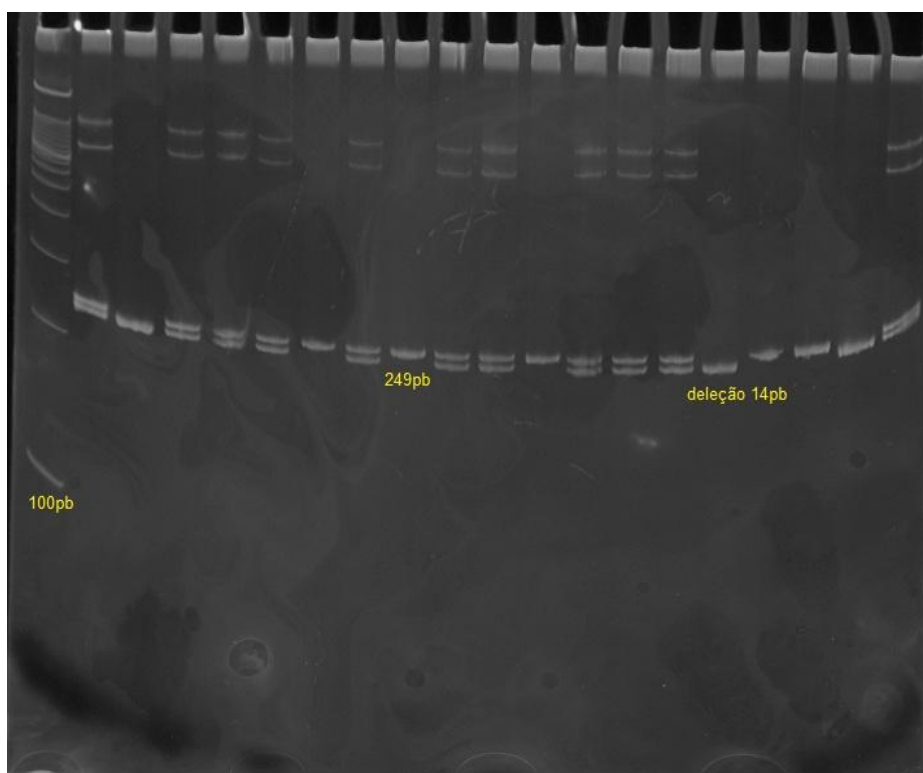


Fig.4.19 Padrão de amplificação da deleção de 14pb referente ao gene *CCL2*.

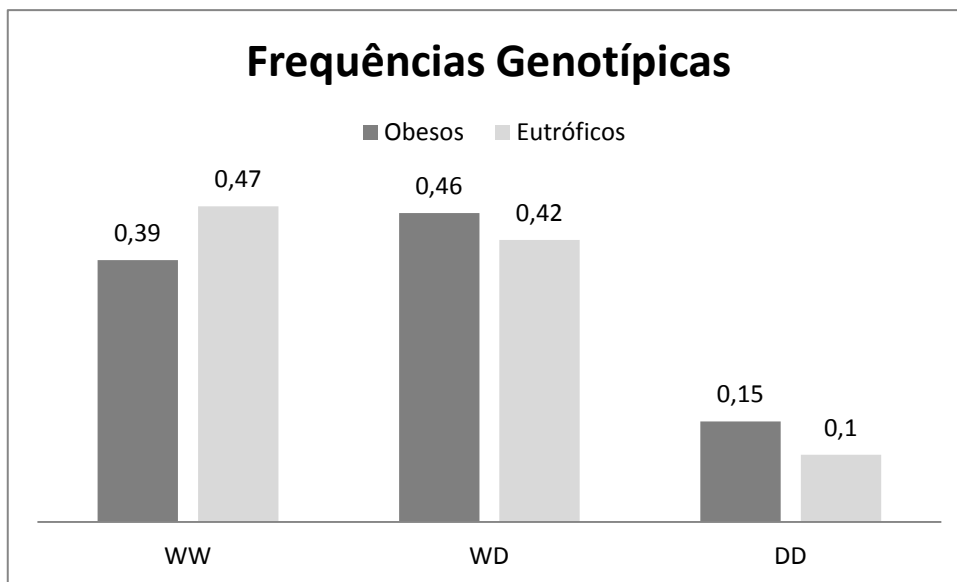


Fig.4.20 Frequências genotípicas para a deleção rs3917887.

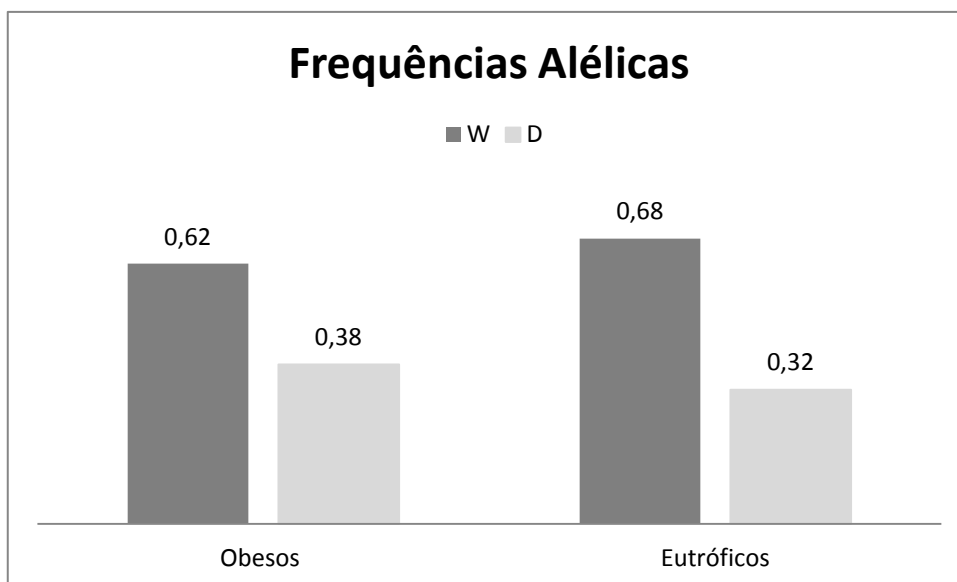


Fig.4.21 Frequências Alélicas para a deleção rs3917887.

A associação com variáveis antropométricas, bioquímicas e pressóricas também foi testada e os resultados mostrados na tabela 4.19 para os eutróficos e na tabela 4.20 para os obesos. Nos obesos foram encontradas associações para variáveis bioquímicas: como HDL, VLDL, triglicerídeos, Hemoglobina glicada, e PCR; com relação às variáveis antropométricas foram encontradas associações para IMC, circunferência abdominal.

Tabela 4.19 Associação do polimorfismo rs3917887 do gene *CCL2* com as variáveis antropométricas, bioquímicas e pressóricas em eutróficos.

Variáveis	N	WW	WD	DD	<i>p</i>
IMC (Kg/m ²)	177	23 (21; 24)	22 (21; 24)	23 (20; 24)	0,5
Circunferência Abdominal (cm)	178	83 (77; 89)	85 (76; 91)	85 (74; 91)	0,96
Circunferência do Quadril (cm)	178	96 (84; 102)	94 (85; 99)	97 (94; 100)	0,25
Glicose (mg/dl)	164	89 (85; 98)	89 (83; 95)	87 (82; 93)	0,31
Colesterol Total	164	177 (156,0; 198)	181 (153; 200)	181 (152; 202)	0,95
HDL (mg/dl)	164	59 (50; 68)	58 (47; 67)	46 (43; 69)	0,34
LDL (mg/dl)	163	97 (83; 114)	104 (83; 126)	114 (94; 127)	0,12
VLDL (mg/dl)	163	15 (12; 20)	15 (12; 20)	19 (13; 22)	0,5
Triglicerídeos (mg/dl)	164	78 (60; 100)	73 (54; 105)	90 (66; 110)	0,42
Hemoglobina Glicada (%)	60	5,1 (4,5; 5,6)	4,8 (4,5; 5,1)	4,6 (4,5; 5,0)	0,13
PCR (mg/dl)	62	0,2 (0,1; 0,3)	0,08 (0,03; 0,2)	0,3 (0,05; 0,4)	0,15
PAS (mmHg)	165	119 (110; 127)	116 (107; 123)	118 (113; 121)	0,3
PAD (mmHg)	165	77 (69; 84)	74 (66; 80)	78 (69; 83)	0,18

PAS -Pressão arterial sistólica, PAD – Pressão arterial diastólica, PCR Proteína C Reativa e IMC – índice de massa corpórea.

O *p*-valor corresponde à significância estatística do teste Kruskal Wallis.

Nota: Os valores representam medianas (25 percentil e 75 percentil).

Tabela 4.20 Associação do polimorfismo rs3917887 do gene CCL2 com as variáveis antropométricas, bioquímicas e pressóricas em obesos.

Variáveis	N	WW	WD	DD	<i>p</i>
IMC (Kg/m ²)	194	42, (36; 48)	47 (40; 53)	42 (35;52)	0,003
Circunferência Abdominal (cm)	193	125 (114; 139)	134 (125; 145)	130 (109; 147)	0,01
Circunferência do Quadril (cm)	193	134 (121; 147)	141 (129; 150)	135 (122; 151)	0,05
Glicose (mg/dl)	130	96 (88; 108)	102 (94; 112)	103 (91; 114)	0,12
Colesterol Total	161	188 (168; 214)	201 (180; 225)	215 (170; 235)	0,11
HDL (mg/dl)	162	48 (42; 56)	46 (40; 53)	52 (48; 60)	0,008
LDL (mg/dl)	157	114 (97; 133)	125 (98; 144)	132 (109; 153)	0,08
VLDL (mg/dl)	157	23 (17; 32)	28 (22; 38)	21 (15; 31)	0,008
Triglicerídeos (mg/dl)	161	117 (85; 162)	139 (112; 196)	107 (75; 157)	0,005
Hemoglobina Glicada (%)	126	5,4 (4,8; 6,0)	5,3 (4,9; 5,7)	5,8 (5,5; 6,4)	0,04
PCR (mg/dl)	152	0,78 (0,4; 1,2)	1,1 (0,6; 1,9)	0,9 (0,4; 2,1)	0,01
PAS (mmHg)	141	131 (110; 150)	140 (120; 154)	121 (115; 140)	0,05
PAD (mmHg)	141	84 (71; 91)	90 (77; 100)	81 (70; 90)	0,09

PAS -Pressão arterial sistólica, PAD – Pressão arterial diastólica, PCR Proteína C Reativa e IMC – índice de massa corpórea. O *p*-valor corresponde à significância estatística do teste Kruskal Wallis.
Nota: Os valores representam medianas (25 percentil e 75 percentil).

A análise de associação com diabetes, SM e hipertensão não revelou resultados significativos para a deleção estudada nos obesos totais (diabetes $\chi^2=1,63$ $p=0,44$; SM $\chi^2=0,31$, $p=0,85$; Hipertensão $\chi^2=3,27$ $p=0,19$), obesos de grau 2 e 3 (diabetes $\chi^2=2,40$ $p=0,3$; SM $\chi^2=0,29$, $p=0,86$; Hipertensão $\chi^2=1,76$, $p=0,41$) e nem nos obesos mórbidos (diabetes $\chi^2=2,27$, $p=0,32$; SM $\chi^2=0,66$, $p=0,71$, Hipertensão $\chi^2=01,64$, $p=0,44$).

4.7. Análise de risco inflamatório com base nos parâmetros de PCR (Proteína C reativa).

A avaliação de um perfil inflamatório, como dita anteriormente, foi vista com base nas concentrações de Proteína C reativa. Primeiramente, foi analisado o risco inflamatório nos grupos de eutróficos e obesos. A tabela 4.21 mostra a distribuição dos tipos de inflamação em eutróficos e obesos sendo observadas diferenças significativas entre os grupos ($\chi^2= 87,696$, $GL=3$, $p<0,001$).

Tabela 4.21 Análise de associação com os diferentes parâmetros de inflamação entre os grupos.

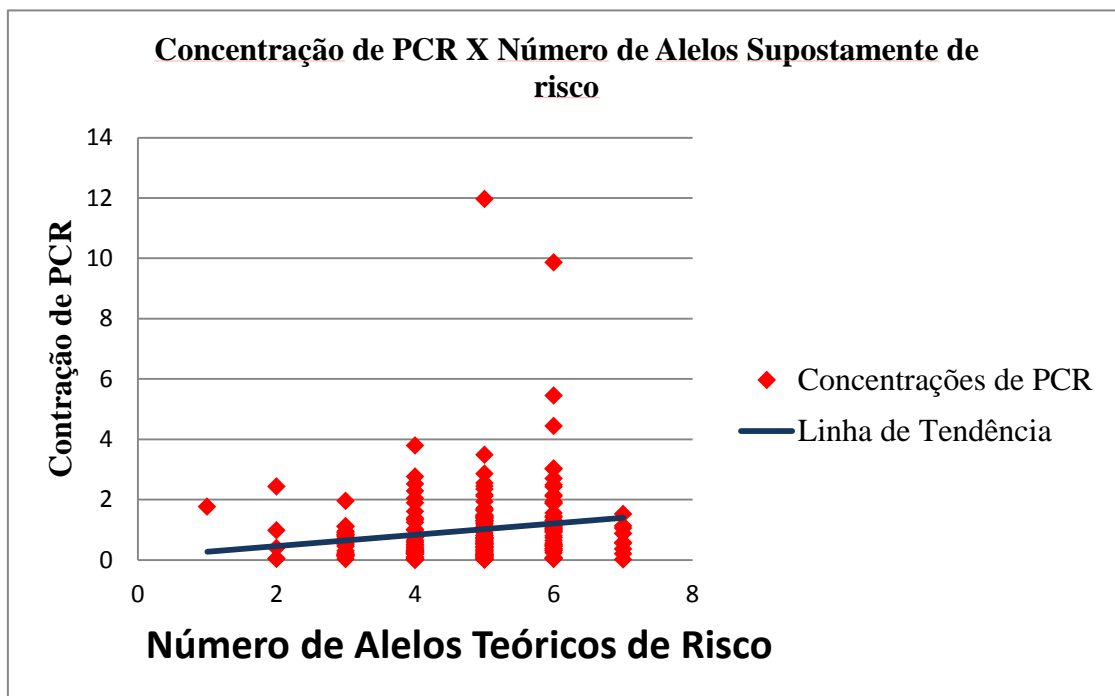
Tipos de inflamação baseada nas concentrações de PCR					
Grupos	Sem inflamação	Moderada	Grave	Extrema	Total
Eutróficos	45	15	2	0	62
Obesos	16	71	62	4	153
Total	61	86	64	4	215

Em seguida, analisamos os diferentes tipos de inflamação nos diferentes graus de obesidade. A tabela 4.22 mostra a distribuição destes dados e, não houve diferenças significativas entre os dois grupos ($\chi^2= 7,856$, $GL=6$, $p=0,24$), sugerindo que o processo inflamatório independe do grau de obesidade.

Tabela 4.22 Análise de associação com os diferentes parâmetros de inflamação entre graus de obesidade

Tipos de inflamação baseada nas concentrações de PCR					
Grau de obesidade	Sem Inflamação	Moderada	Grave	Extrema	Total
Obeso grau 1	3	8	4	0	15
Obeso grau 2	5	16	9	0	30
Obesos Mórvidos	8	47	49	4	108
Total	16	71	62	4	153

Neste estudo, alguns polimorfismos não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre os obesos e os eutróficos, mostrando que os efeitos individuais são muito pequenos ou inexistentes. Contudo, para identificar se estes polimorfismos podem estar envolvidos no risco inflamatório, foi criada uma variável artificial, denominada SOALRI (Soma de alelos teoricamente de risco), que corresponde à soma de todos os alelos cujo OR era superior a 1, mesmo não sendo significativo. A Figura 4.22 mostra a correlação entre as concentrações de Proteína C-Reativa de cada paciente, com a soma dos alelos supostamente de risco, foi aplicado o teste de correlação de Pearson onde o coeficiente de correlação de foi de 0,16 $p=0,02$. Observamos pela função linear que quanto maior o numero de alelos supostamente de risco maior o aumento



da concentração de PCR.

Fig.4.22 Digrama de dispersão da variação da concentração de Proteína C-Reativa, em função da soma dos alelos supostamente de risco.

Na tentativa de corroborar o resultado anterior, foi efetuada uma análise de regressão linear simples (Tabela 4.23).

Tabela 4.23. Resultado da regressão, correlacionando a soma dos alelos de risco com a Concentração de PCR de cada paciente.

	Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	Z	Sig.
Regressão	9,571	1	9,571	5,710	0,02
Resíduo	347,001	207	1,676		
Total	356,573	208			

5. Discussão

A obesidade está associada com o desenvolvimento de um estado inflamatório, quadro esse que é resultado da crônica ativação de células imunes e o aumento de mediadores inflamatórios. Existem diversos fatores que podem estar associados com a maior concentração de mediadores inflamatórios que contribuem para o desenvolvimento deste quadro; neste estudo procurou-se observar se variantes em genes que codificam estes mediadores podem estar relacionados tanto à obesidade quanto ao risco inflamatório; desta maneira, auxiliando na ampliação do conhecimento sobre as possíveis causas que podem estar envolvidas entre a inflamação e a obesidade.

O perfil das amostras revelou diferenças significativas entre os eutróficos e os obesos; os valores para variáveis bioquímicas, como colesterol total, LDL e hemoglobina glicada, foram maiores entre os obesos, corroborando com o fato de que a obesidade é uma série de desordens metabólicas relacionadas, principalmente, ao metabolismo lipídico. Em relação às variáveis antropométricas, como IMC, circunferência abdominal e do quadril, que são medidas utilizadas para avaliar a composição de gordura corporal de um indivíduo, também, se observaram diferenças significantes entre estes grupos; estas medidas também estavam aumentadas entre os obesos, evidenciando que a obesidade é de fato o acúmulo anormal de gordura (Ver tabela 4.1).

A Proteína C reativa é um dos marcadores inflamatórios mais utilizados para averiguar se existe ou não um evento inflamatório em curso no paciente (KLUFT & MAAT, 2003); neste contexto foram observadas diferenças entre os eutróficos e os obesos em relação aos níveis de PCR, com maiores níveis desta proteína em obesos, evidenciando o fato de que na obesidade temos um processo inflamatório baseado nas concentrações deste marcador. Com relação ao quadro clínico dos pacientes, observamos diferenças significativas entre os eutróficos e os obesos; no grupo dos obesos observa-se uma maior porcentagem de indivíduos com diabetes *mellitus* tipos 2, SM e hipertensão, sugerindo que na obesidade além de ocorrer o acúmulo anormal de gordura corporal e uma série de desordens metabólicas, também pode haver um fator de risco para desenvolvimento de outras doenças (Ver tabela 4.2).

5.1 O Polimorfismo rs1800629 do gene Fator de Necrose Tumoral α (*TNF*)

O primeiro polimorfismo estudado foi o rs1800629 do gene *TNF* que codifica o fator de necrose tumoral (TNF- α), uma importante citocina pró-inflamatória, responsável por uma série de processos imunológicos, que envolvem desde o recrutamento de células imunes, como macrófagos, até órgãos como o fígado liberando proteínas importantes para o processo inflamatório (ABBAS *et al.*, 2008). Este polimorfismo tem sido associado com uma maior expressão de TNF- α , e estes níveis aumentados de TNF- α podem ocasionar problemas graves para o paciente obeso, como alteração no metabolismo lipídico, aumento dos níveis de glicemia, por causa da resistência à insulina, assim como a possível associação com o desenvolvimento de outras doenças, como a diabetes tipo 2 (HOTAMISLIGIL, 1999; UYSAL *et al.*, 1998; WISSE, 2004).

Nas análises, aqui, apresentadas revelou-se que apesar da frequência do alelo mutado A ser maior em obesos, não foram observadas diferenças significativas quanto à distribuição genotípica e alélica nos grupos, sugerindo que o polimorfismo em questão não representa uma fator de risco para o desenvolvimento da obesidade, corroborando com os resultados de HEDAYATI *et al.* (2012); entretanto, no estudo realizado por JOFFE *et al.* (2016), foi observado que indivíduos do sexo feminino portadores do genótipo mutado AA, quando submetidos a uma alta taxa de ingestão de gordura, as chances do aumento do risco de obesidade era maior, sugerindo que este polimorfismo pode ser um modulador do metabolismo de gordura.

No resultado anterior, o polimorfismo não apresentou um resultado significativo para o risco de obesidade, porém existem diversas características fenotípicas associadas à obesidade, onde este polimorfismo pode estar relacionado; diante desta questão, procurou-se observar uma possível influência do polimorfismo rs1800629 sobre características antropométricas, bioquímicas e pressóricas. Em primeiro lugar, no grupo dos eutróficos não foram observados resultados significativos para nenhuma destas variáveis, mas quando comparamos o grupo dos obesos observamos resultados significativos para parâmetros bioquímicos, como o colesterol total e, antropométricos, como a circunferência abdominal. Em relação ao colesterol total, foi observado que a mediana dos níveis deste era maior na presença do genótipo mutado AA, sugerindo-se que TNF- α pode atuar no metabolismo lipídico, e que este polimorfismo pode influenciar na expressão desta citocina e conseqüentemente provocar alterações na concentração de colesterol do paciente. Em relação à circunferência abdominal,

observa-se uma diminuição da mediana no genótipo AA, sugerindo que este polimorfismo também estaria regulando a produção de TNF- α , que por sua vez estaria modulando o desenvolvimento da adiposidade e mobilizando a gordura da região abdominal para outros tecidos (ALANIZ *et al.*, 2006).

O aumento dos níveis de TNF- α em pacientes obesos pode levar a consequências, como a resistência à insulina, deposição de gordura em outros tecidos e acarretar o desenvolvimento de outras doenças (VIELMA *et al.*, 2013; BEEK *et al.*, 2014; BASTIEN *et al.*, 2014). Na amostra dos obesos, analisamos uma possível relação entre o polimorfismo e comorbidades relacionadas à obesidade. Com base nos resultados obtidos, não foram observadas associações significativas entre o polimorfismo e o desenvolvimento de diabetes *mellitus* tipo 2, sugerindo que este polimorfismo pode não ser um fator de risco para o aparecimento desta doença em obesos, resultado semelhante ao encontrado por SAXENA *et al.* (2013). Em relação a SM e hipertensão, também, não foram observadas nenhuma associação; entretanto em um estudo realizado por MIRHAFEZ *et al.* (2015) observou-se que pacientes com SM portadores do genótipo mutado AA apresentaram maiores níveis de triglicerídeos, mostrando que este polimorfismo poderia atuar sobre o metabolismo lipídico e contribuir indiretamente para o desenvolvimento de outras doenças.

Diante dos dados apresentados para este polimorfismo, sugere-se que este pode não ser um fator determinante para a diferenciação entre obesos e eutróficos; contudo com base na análise dos diversos parâmetros bioquímicos e antropométricos entre genótipos observam-se diferenças significantes entre os mesmos (ver tabela 4.4).

5.2 O Polimorfismo rs1800797 do gene Interleucina 6 (*IL6*)

A IL-6 também é uma importante citocina pró-inflamatória e está envolvida no balanço energético do corpo e na resistência à insulina (OANA *et al.*, 2014; PYRZAK *et al.*, 2009). Vários polimorfismos na região promotora do gene que codifica esta citocina podem ajudar a explicar as diferenças com relação à quantidade de proteína produzida e/ou à concentração sistêmica deste mediador (LÓPEZ *et al.*, 2013), assim como, também, podem ajudar a identificar se esta citocina altera parâmetros relacionados à obesidade e contribuem como um fator de risco para o desenvolvimento de outras doenças.

Primeiramente, as análises das frequências genóticas e alélicas do polimorfismo rs1800797 não revelaram diferenças entre obesos e eutróficos, contudo este polimorfismo pode estar relacionado com outras características relacionadas à obesidade.

A avaliação do impacto desse polimorfismo sobre as características fenotípicas relacionadas à obesidade (antropométricas, bioquímicas e pressóricas), revelou uma associação significativa com o LDL no grupo dos obesos. No genótipo AA foi observada uma diminuição nos níveis de LDL em relação aos genótipos selvagem GG e GA, sugerindo que este polimorfismo pode estar afetando a produção de IL-6, e esta pode estar influenciando os níveis de LDL em obesos, comprometendo o metabolismo lipídico.

A correlação entre o perfil clínico dos pacientes obesos e o polimorfismo rs1800797 não revelou associações significativa para diabetes tipo 2, SM e hipertensão e, portanto, este polimorfismo pode não ser um fator de risco para que os pacientes com obesidade também desenvolvam estas comorbidades. Estudo realizado por PHILLIPS *et al.* (2010), em uma amostra de europeus, mostrou que indivíduos com o genótipo selvagem GG, em conjunto com outros polimorfismos do mesmo gene, aumentavam as chances do desenvolvimento de SM. Da mesma forma, estudo realizado por SAXENA *et al.* (2014), numa população do norte da Índia, revelou que este polimorfismo em conjunto com outros do mesmo gene, pode estar relacionado com o risco de diabetes tipo 2.

Os diferentes resultados, em relação ao rs1800797, sugerem que os efeitos individuais destes polimorfismos são muito baixos ou inexistentes, porém em conjunto com outros polimorfismos pode ser um fator de risco para o desenvolvimento destas doenças. Este efeito pode estar relacionado ao tamanho amostral obtido no presente estudo.

5.3 O Polimorfismo rs1800795 do gene Interleucina 6 (*IL6*)

O segundo polimorfismo do gene *IL6* (rs1800795), também localizado na região promotora do gene, sugere que o mesmo pode estar relacionado com alterações na taxa de transcrição de IL-6 (HUANG *et al.*, 2013). Análises iniciais apresentadas neste estudo não revelaram diferenças significativas nas frequências genóticas e alélicas

(ver figuras 4.8 e 4.9) entre eutróficos e obesos, mostrando que esta variante não é um fator de risco para a obesidade, resultado semelhante ao encontrado por LÓPEZ *et al.* (2013) numa análise feita com adolescentes mexicanos, onde observaram que não havia diferenças na distribuição do polimorfismo entre o grupo controle e os obesos; entretanto, num estudo realizado por PYRZAK *et al.* (2009), foi observado que em crianças obesas, o genótipo mutado CC era estatisticamente mais frequente, mostrando que o polimorfismo pode ter alguma relação com a obesidade.

Diante do relato anterior, investigamos se esta variante pode estar relacionada com variáveis antropométricas, bioquímicas e pressóricas associadas à obesidade; no grupo dos eutróficos não foram observados resultados significativos, porém no grupo dos obesos observou-se associações com as variáveis bioquímicas LDL e Hemoglobina glicada; os níveis de LDL são menores no genótipo mutado CC em relação aos genótipos GG e GC, indicando que este polimorfismo deve estar atuando na via de regulação do metabolismo lipídico alterando a expressão de IL-6.

Em relação à influência deste polimorfismo sobre diabetes tipo 2, SM e hipertensão, não observamos resultados significativas para diabetes tipo 2 e hipertensão entre os obesos, corroborando estudo semelhante realizado por FERREIRA *et al.* (2011), onde identificaram que este polimorfismo não é uma fator de risco para alterações na glicemia, logo, não sendo também uma fator de risco para o diabetes tipo 2. No entanto, os resultados revelaram uma associação significativa com a SM em todos os graus de obesidade analisados.

Com base nos resultados encontrados para ambos os polimorfismos da IL-6, aqui estudados, observamos que estas variantes, quando analisadas separadamente, não apresentam um risco determinante para a obesidade, contudo, podem estar relacionadas com parâmetros bioquímicos associados à obesidade, e isto pode levar ao surgimento de comorbidades para o paciente obeso. Desta forma, um estudo mais detalhado sobre o conjunto de variantes polimórficas sobre a expressão de IL-6 pode ampliar o conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na produção desta citocina.

5.4 O Polimorfismo rs1800872 do gene Interleucina 10 (*IL10*)

A IL-10 é uma citocina imuno-reguladora potente que inibe a síntese de várias citocinas pró-inflamatórias, ou seja, tem atividade anti-inflamatória e imunossupressora,

incluindo a capacidade de regular negativamente a expressão da molécula coestimuladora de macrófagos (DING *et al.*, 2013; KUNINGAS *et al.*, 2009). Estudos mostraram que, principalmente, na obesidade e na síndrome metabólica são encontrados baixos níveis de IL-10 circulante, além de ter sido associado à hiperglicemia e diabetes tipo 2 (SCARPELLI *et al.*, 2006), sugerindo que, devido às suas propriedades anti-inflamatórias, o baixo nível de IL-10 pode estar contribuindo para o desenvolvimento de inflamação em obesos.

Nas análises iniciais sobre uma possível influência do polimorfismo rs1800872 na obesidade, não foram observadas diferenças significativas entre eutróficos e obesos, quanto à distribuição das frequências genóticas e alélicas; assim, este polimorfismo pode não ser um fator de risco para a obesidade. Embora este polimorfismo não esteja associado diretamente com este caráter, sua presença pode estar alterando a expressão da citocina IL-10, contribuindo, assim, para a progressão da inflamação vista em obesos, ou como vimos nos resultados antes mencionados, pode estar associado a alguma característica particular da obesidade.

Nas análises relacionadas às variáveis antropométrica, bioquímicas e pressóricas, não foram observados resultados significativos para o grupo dos eutróficos, entretanto, no grupo dos obesos observamos resultados significativos para glicemia. Quando observamos os valores dos níveis de glicose, o genótipo mutado AA apresentou um valor menor em relação aos genótipos CC e CA; partindo do fato de que a presença do alelo mutado A estaria envolvida com uma menor expressão de IL-10 (ZHANG *et al.*, 2013), então a presença do genótipo AA diminuiria a expressão de IL-10 e, conseqüentemente aumentaria outras citocinas pró-inflamatórias, gerando resistência à insulina e aumento da glicemia.

Em virtude de se ter encontrado associação significativa entre o polimorfismo rs1800872 e a glicemia no grupo dos obesos, foi investigado, aqui, se a variante poderia estar relacionada ao diabetes tipo 2 e a outras comorbidades (Ver tabela 4.14). Foi constatado resultado significativo somente para diabetes tipo 2 em obesos totais. Em outros graus de obesidade não foram encontrados resultados significativos, para diabetes e nem para outras doenças, como SM e hipertensão. Este dado corrobora com o fato de ter sido encontrada uma associação do polimorfismo rs1800872 e os níveis de glicemia, como relatado num estudo realizado por BAI *et al.* (2014) em que este

polimorfismo, em conjunto com outros do mesmo gene, apareceu como um fator de risco para diabetes. Em contrapartida, em outros estudos, o polimorfismo rs1800872 não foi um fator de risco para diabetes (YIN *et al.*, 2012; SCARPELLI *et al.*, 2006). Diante destes relatos, é importante um estudo mais detalhado sobre os efeitos desse polimorfismo sobre a expressão de IL-10, e como isto pode afetar os níveis de glicemia e as chances do paciente desenvolver diabetes tipo 2, pois os dados da literatura ainda são conflitantes sobre os efeitos deste polimorfismo.

5.5 A deleção rs3917887 do gene *CCL2* (MCP-1)

A Proteína MCP-1 foi descoberta pela primeira vez em 1989 e, é um importante componente na resposta inflamatória (PANEE, 2012). Esta quimiocina está envolvida no recrutamento de linfócitos e monócitos, assim como no controle da migração destas células para locais de lesão celular ou reação imuno-celular como a inflamação (INTEMANN *et al.*, 2011). Estudos revelaram que a expressão de quimiocinas, como a MCP-1, é maior no tecido adiposo de obesos em relação aos controles (PANEE, 2012). Assim como em outras citocinas, diversos fatores podem estar envolvidos com o aumento da expressão desta quimiocina em obesos e um deles podem estar relacionado com a presença da deleção de 14pb no intron 1 do gene que codifica a MCP-1 (rs3917887).

Em análises preliminares aqui apresentadas, não foram observadas diferenças significativas entre eutróficos e obesos, com relação às frequências genótípicas e alélicas, mostrando que esta deleção pode não ser um fator de risco para a obesidade. Porém, mesmo que a MCP-1 não seja uma fator de risco para a obesidade em si, esta variante ainda pode contribuir para a inflamação vista em obesos, uma vez que, este é um dos primeiros marcadores inflamatórios a serem liberados pelo tecido adiposo (SAMAAN *et al.*, 2013).

As análises aqui apresentadas não revelaram a presença da deleção da MCP-1 como um fator de risco direto para a obesidade. Entretanto, esta pode estar relacionada com variáveis bioquímicas, antropométricas e pressóricas que podem causar consequências graves para o obeso, como alterações no metabolismo lipídico, regulação da deposição de gordura corporal e controle de glicemia. Diante destas hipóteses, no grupo dos eutróficos não foram observados resultados significativos para nenhuma das variáveis avaliadas; contudo, no grupo dos obesos, encontramos resultados

significativos para a associação da deleção rs3917887 com variáveis bioquímicas, como triglicerídeos, onde observamos menores níveis de triglicerídeos no genótipo com a deleção DD em relação ao genótipo selvagem WW, muito provavelmente por estar relacionado com a expressão da MCP-1 alterada. Em relação a outras variáveis bioquímicas, resultados significativos, também, foram encontrados para a PCR onde os níveis desta proteína são maiores no genótipo DD do que no genótipo selvagem WW, indicando que a MCP-1 possa estar atuando na inflamação, visto que a PCR é um importante marcador inflamatório. Em relação às variáveis antropométricas, variáveis, como IMC e circunferência abdominal apresentaram resultados significativos para a deleção estudada, onde no caso da circunferência abdominal observamos um aumento da medida desta variável, sugerindo que esta quimiocina possa estar atuando na adiposidade e com isso, regulando a deposição de gordura no organismo. No entanto, a literatura ainda carece de resultados que corroborem com estes achados; portanto um estudo mais detalhado sobre os possíveis efeitos que este deleção pode ter sobre a produção de MCP-1 e seu papel na obesidade pode ajudar a traçar um perfil de risco.

Em relação à associação da deleção rs3917887 com o perfil clínico dos pacientes obesos, não foram encontrados resultados significativos entre a deleção do gene *CCL2* e comorbidades (como, diabetes, hipertensão e síndrome metabólica), quando analisamos obesos totais e os diferentes graus de obesidade, sugerindo que esta deleção no gene *CCL2* não seja um fator de risco para o desenvolvimento destas doenças. No entanto, devemos observar que esta deleção pode estar envolvida, com variáveis dislipidêmicas e, portanto, envolvida no metabolismo de lipídeos, ou seja, ela pode não ser um fator de risco para estas doenças, mas pode estar envolvida com características fenotípicas relacionadas a estas doenças, e devido às alterações na expressão desta quimiocina causadas por esta deleção, esta pode provocar alterações importantes, tanto na sinalização desta quimiocina como também no metabolismo e levar o indivíduo a desenvolver doenças graves (NASIBULLIN *et al.*, 2011; MANDAL *et al.*, 2014).

5.6 Os polimorfismos rs7799039 e rs2167270 do gene da leptina (*LEP*)

A leptina é um hormônio produzido, principalmente, no tecido adiposo branco que se liga aos receptores no SNC, informando para o cérebro sobre o estoque de energia (FAN & SAY, 2014; LEITE *et al.*, 2009). Além disso, sabe-se, atualmente, que a leptina possui receptores em células imunes, como os linfócitos T, atuando nas vias da

proliferação da resposta imune e com isso gerando a produção de citocinas pró-inflamatórias. Desta forma, a leptina apresenta um papel de mediadora do estado nutricional e na função imunológica, podendo contribuir para o quadro inflamatório visto em obesos (SIPPEL *et al.*, 2014). Devido ao aumento da concentração de leptina em pacientes obesos, este pode ser um fator de risco, pois pode gerar consequências graves, como alterações no metabolismo e resistência à insulina, provocadas pelo aumento da inflamação. Existem dois polimorfismos principais que podem estar envolvidos na expressão e produção de leptina no organismo. Dentre estes, temos o polimorfismo rs7799039, localizado na região promotora do gene e que pode influenciar na expressão da leptina.

A análise do polimorfismo rs7799039 no grupo dos obesos e eutróficos apresentaram um resultado interessante para esta variante. Embora, ambos os grupos estivessem em equilíbrio de Hardy-Weinberg, foram observadas diferenças significativas em relação à análise de frequências genotípicas e alélicas, assim como um fator de risco para a presença do alelo selvagem G nos obesos, mostrando um valor de $OR > 1,00$. Muitos estudos com relação a este polimorfismo são controversos, pois muitos relatam que a presença do genótipo selvagem GG está associada a indivíduos com sobrepeso e obesidade (MAMMÈS *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2006; CONSTANTIN *et al.*, 2010), enquanto, outros sugerem que a presença do alelo mutado A está associada com uma menor expressão de leptina podendo provocar a obesidade (BOUMAIZA *et al.*, 2012). Em outros estudos não foram encontradas associações com a obesidade (SOSKIC *et al.*, 2014; JULIO *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2013) e por fim, outro estudo realizado por FUJIWARA *et al.* (2015) relata que jovens obesas em pré-puberdade, apresentavam maiores níveis de leptina na presença do alelo mutado A. Com base nestes relatos, nossos resultados corroboram com os de WANG *et al.* (2006), pois além das amostras dos obesos apresentarem maior frequência do alelo selvagem G, este ainda foi um fator de risco para a obesidade. Diante destes dados da literatura e com base nos resultados aqui apresentados, observa-se que um estudo mais amplo envolvendo a expressão da leptina frente ao polimorfismo, pode auxiliar num melhor entendimento sobre os efeitos dessa variante na produção desta adipocina e sua relação com a obesidade.

Com relação ao outro polimorfismo, também do gene *LEP*, o rs2167270, também foram observadas diferenças significativas entre os obesos e eutróficos,

mostrando que tanto este polimorfismo quanto o anterior, são importantes para o estudo da obesidade e, que ambos apresentam-se como um fator de risco para que o desenvolvimento desta doença. Com base nos dados gerados sobre frequências genóticas e alélicas, observamos que existem diferenças significativas entre os grupos (obesos e eutróficos) e, que a presença do alelo mutado A é um fator de risco para a obesidade, apresentando um valor de $OR > 1,00$. Em um estudo realizado por TORRES *et al.* (2015) foi observado que, em mulheres obesas, o alelo mutado A estava relacionado com menores níveis de leptina. Partindo desse pressuposto, nossos resultados corroboram com este trabalho, pois a presença do alelo mutado, por ser um fator de risco relacionado com a menor produção de leptina, ocasiona um comprometimento do balanço energético e ganho de peso.

Com relação à associação destes polimorfismos com variáveis antropométricas, bioquímicas e pressóricas, para o polimorfismo rs2167270, não foram encontradas associações significativas em ambos os grupos, porém com relação ao rs7799039 foi encontrada uma associação, no grupo dos obesos, com HDL, no genótipo mutado AA, apresentando uma maior mediana nos níveis de HDL em relação ao genótipo selvagem GG, o que sugere que a leptina possa atuar em uma determinada via metabólica que regula esta variável.

Em relação à associação destes polimorfismos com o quadro clínico dos pacientes obesos, não foram encontrados resultados significativos para nenhuma das comorbidades analisadas. Tais polimorfismos podem não ser um fator de risco para o desenvolvimento destas doenças, entretanto, em um estudo realizado por ROMANOWSKI *et al.* (2015) foi observado que o rs2167270 estava associado com alterações na expressão da leptina e conseqüentemente no surgimento de diabetes pós-transplante. Em nossos resultados não foram encontradas associações com diabetes; desta forma, dependendo do tipo de amostra e de suas condições pode-se, sim, observar um resultado significativo para estes polimorfismos relacionados à diabetes, e SM, principalmente, porque as vias que regulam e que podem levar ao desenvolvimento destas doenças são muito complexas e dependem de vários fatores para que se desenvolvam. Com base nos resultados aqui apresentados e em relatos da literatura, observa-se que estes polimorfismos do gene *LEP* são fatores de risco para a obesidade, e devido ao fato de estarem localizados em regiões de regulação da expressão da

leptina, este risco pode estar associado a alterações nos níveis de leptina circulante, comprometendo a regulação do balanço energético e aumento da ingestão de gordura.

5.7. Correlação entre os polimorfismos e o risco de inflamação

Para finalizar, a análise de risco inflamatório em obesos, mostrou resultados interessantes. Primeiramente, em relação aos diferentes tipos de inflamação que revelaram diferenças significativas entre obesos e eutróficos, onde o número de indivíduos sem inflamação era maior entre os eutróficos, enquanto que, o número de indivíduos com inflamação moderada, grave e extrema era maior entre os obesos, corroborando com o fato de que em obesos observamos uma inflamação sistêmica. Posteriormente, a análise do perfil inflamatório nos diferentes graus de obesidade não revelou diferenças significativas entre eles, ou seja, este dado mostra que, independentemente do grau de obesidade, o indivíduo tem sim uma maior chance de desenvolver inflamação. Outro dado importante é que os níveis de inflamação extrema foram observados somente entre os obesos mórbidos, indicando que quando maior o grau da doença maior o risco de inflamação. Porém em nossas análises continham obesos mórbidos na faixa sem inflamação, indicando que o componente genético pode estar envolvido na maior suscetibilidade a inflamação.

Muitos dos polimorfismos analisados não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos (eutróficos e obesos), assim, seus efeitos não foram observados. Porém, quando analisamos a soma dos alelos teóricos de risco com a concentração de Proteína C-Reativa de cada indivíduo, observamos que, quanto maior o número de alelos, maior era a concentração desta proteína. Estes resultados mostram que os efeitos individuais destes polimorfismos não são evidentes, porém em combinações apresentam um efeito estatístico significativo sobre os níveis inflamatórios. Com isso, mesmo que muitos destes polimorfismos não tenham sido considerados como um fator de risco para a obesidade, diretamente, estes ainda podem estar relacionados com o desenvolvimento de inflamação nos obesos. Assim, um estudo mais amplo, correlacionando a expressão destes genes e a produção destas citocinas frente aos polimorfismos, podem auxiliar no melhor entendimento dos efeitos que eles podem ter sobre a obesidade e ajudar a traçar um perfil mais claro de risco de desenvolvimento de inflamação observado entre os obesos. Além disso um estudo estratificado por etnias também pode auxiliar e evidenciar resultados interessantes em relação as análises aqui apresentadas.

6. Conclusões

A obesidade é uma patologia que tem crescido ao longo dos anos e deve ser tratada como um caso de saúde pública, pois esta pode favorecer o aparecimento de problemas graves no indivíduo, tais como, o desenvolvimento de diabetes e hipertensão.

Em nossos resultados, quando comparamos obesos e eutróficos foram observadas diferenças significativas em relação aos polimorfismos do gene que codificam a leptina, evidenciando que esta adipocina é importante para o desenvolvimento da obesidade, muito provavelmente relacionada à expressão desta adipocina.

Com relação aos polimorfismos das principais citocinas inflamatórias, em nosso estudo não foram observadas diferenças significativas entre obesos e eutróficos. Contudo, os polimorfismos, dos genes *TNF*, *IL6*, *IL10* e *CCL2* mostraram uma associação significativa com variáveis bioquímicas e antropométricas, mostrando que essas citocinas podem atuar na via que regula estas variáveis. Isto sugere que estas citocinas não somente participam da regulação da inflamação, como também podem atuar no metabolismo e com isso contribuir para o desenvolvimento da obesidade.

Por fim, quando analisamos a soma dos alelos considerados teóricos de risco em nosso estudo e correlacionamos com a inflamação baseada na faixa de concentração de PCR, observamos que, quanto maior o número de alelos dos polimorfismos estudados maior seria a faixa de inflamação, sugerindo que estes polimorfismos podem estar envolvidos com o desenvolvimento da inflamação nos obesos.

Desta forma, concluímos que, embora, muitos dos polimorfismos aqui estudados não seja um fator determinante para a obesidade, estes podem estar relacionados com variáveis importantes, não somente para a obesidade, como também para outras doenças e com isso podem ser um fator de risco para tal. Estes também podem estar relacionados com o aumento do grau de inflamação visto em obesos e que conseqüentemente podem ocasionar o desenvolvimento de doenças graves, como diabetes tipo 2.

7. Referências

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. (2008) *Imunologia Celular e Molecular*. 6ª ed. Elsevier, Rio de Janeiro, 269-273.
- Abraham LJ, Kroeger KM. (1999), Impact of the -308 TNF promoter polymorphism on the transcriptional regulation of the TNF gene: relevance to disease. *Journal of Leukocyte Biology*, 66(4): 562-566.
- Ahima RS & Flier JS, (2000), LEPTIN, *Annu. Rev. Physiol*, 62:413–37.
- Ahima RS, Osei SY, (2004), Leptin signaling, *Physiology & Behavior*, 81 (2): 223–241.
- Alaniz MHF, Takada J, Vale MICA, Lima FB, (2006) O Tecido Adiposo Como Centro Regulador do Metabolismo *Arq Bras Endocrinol Metab* 50(2): 216-229.
- Aronne LJ, (2002) Classification of Obesity and Assessment of Obesity-Related Health Risks, *Obesity Research*, 10: 105S-115S.
- Bai H, Jing D, Guo A, Yin S, (2014) Association between interleukin 10 gene polymorphisms and risk of type 2 diabetes mellitus in a Chinese population, *Journal of International Medical Research* 42(3): 702–710.
- Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim M J, Caron M, Vidal H, Capeau J, Feve B, (2006) Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance *Eur. Cytokine Netw.* 17(1): 4-12.
- Bastien M, Poirer P, Lemieux I, Després JP, (2014), Overview of Epidemiology and Contribution of Obesity to Cardiovascular Disease, *ScienceDirect*, 56(4): 369-381.
- Beek L, Lips MA, Visser A, Pijl H, Faccinay AI, Toes R, Berends F, Dijk KW, Koning F, Harmelen V, (2014). Increased systemic and adipose tissue inflammation differentiates obese women with T2DM from obese women with normal glucose tolerance. *Metabolism*, 63(4): 492–501.
- Bertola A, Ciucci T, Rousseau D, Bourlier V, Duffaut C, Bonnafous S, (2012), Identification of adipose tissue dendritic cells correlated with obesity-associated insulin-resistance and inducing Th17 responses in mice and patients. *Diabetes*, 2012: 61(9): 2238–2247.
- Botham KM, , (2006) Bioenergetics: the role of ATP, in Harper's Illustrated Biochemistry, D. K. Granner, 29ªEd, chapter 11, , McGraw-Hill, New York, NY, USA, pp. 88–94.
- Bouchard C1, Tremblay A, Després JP, Nadeau A, Lupien PJ, Thériault G, Dussault J., Moorjani S, Pinault S, Fournier G, (1990), The response to long-term overfeeding in identical twins. *New England Journal of Medicine*, 322: 1477-1482.

- Boumaiza I, Omezzine A, Rejeb J, Rebhi L, Quedrani A, Rejeb NB, Nabli N, Abdelaziz AB, Bouslama A, (2012), Relationship Between Leptin G2548A and Leptin Receptor Q223R Gene Polymorphisms and Obesity and Metabolic Syndrome Risk in Tunisian Volunteers, *Genetic testing and molecular biomarkers*,16(7): 726–733.
- Breslin WL, Johnston CA, Strohacker K, Carpenter KC., Davidson TR, Moreno JP, Foreyt JP, McFarlin BK, (2012), Obese Mexican American Children Have Elevated MCP-1, TNF- α , Monocyte Concentration, and Dyslipidemia. *Pediatrics*, 129: 1180–1186.
- Cao H, (2014) Adipocytokines in obesity and metabolic disease, *Thematic Review*, 220(2): 47-59.
- Carobbio S, Cuenca SR, Puig AV, Origins of metabolic complications in obesity: ectopic fat accumulation. (2011), The importance of the qualitative aspect of lipotoxicity, *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 14(6): 520–526.
- Clyne B & Olsaker JS, (1999) THE C-REACTIVE PROTEIN, *The Journal of Emergency Medicine*, 17(6), 1019–1025.
- Constantin A, Costache G, Sima AV, Glayce CS, Vladica M, Popov DL, (2010), Leptin G-2548A and leptin receptor Q223R gene polymorphisms are not associated with obesity in Romanian subjects, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 391(1): 282–286.
- Costa JV & Duarte JS, Tecido adiposo e adipocinas, *Acta Med Port*, 2006; 19: 251-256.
- Curti MLR, Jacob P, Borges MC, Rogero MM, Ferreira SRG, (2011), Studies of Gene Variants Related to Inflammation, Oxidative Stress, Dyslipidemia, and Obesity: Implications for a Nutrigenetic Approach, *Journal of Obesity*, ??: 1-32.
- DeBoer MD, (2013) Obesity, systemic inflammation, and increased risk for cardiovascular disease and diabetes among adolescents: A need for screening tools to target interventions, *Nutrition*, 29(2): 379–386.
- Després JP & Lemieux I, (2006), Abdominal obesity and metabolic syndrome, *Nature* 444(14): 881-887.
- Ding Q, Shi Y, Fan B, Fan Z, Ding L, Li W, Tu W, Jin X, Wang J, (2013), The Interleukin-10 Promoter Polymorphism rs1800872 (-592C>A), Contributes to Cancer Susceptibility: Meta-Analysis of 16 785 Cases and 19 713 Controls, *PLoS ONE* 8(2): e57246.
- Enns JE, Taylor CG, Zahradka P, (2011), Variations in Adipokine Genes AdipoQ, Lep, and LepR Are Associated with Risk for Obesity-Related Metabolic Disease: The Modulatory Role of Gene-Nutrient Interactions, *Journal of Obesity*, 2011: 1-17.

- Fan SH, Say YH, (2014), Leptin and leptin receptor gene polymorphisms and their association with plasma leptin levels and obesity in a multi-ethnic Malaysian suburban population, *Journal of Physiological Anthropology*, 33(5): 1-10.
- Ferreira AP, Ferreira CB, Souza VC, Furioso TAC, Toledo JO, Moraes C.F., Córdova C., Nóbrega O.T., (2011), Risk of glycemic disorder in elderly women adjusted by anthropometric parameters and cytokine genotypes, *Elsevier*, 57(5), 553-557.
- Fourati M, Mnif M, Kharrat N, Charfi N, Mahdi K, Fendri N, Sessi S, Abid M, Rebai A, Fakhfakh F, (2013), Association between Leptin gene polymorphisms and plasma leptin level in three consanguineous families with obesity, *Gene*, 527(1): 75–81.
- Fujiwara CT,H, Melo ME, Mancini MC, (2015), Association of Leptin Gene –2548 G/A Polymorphism with Obesity: A Meta-Analysis, *Annals Nutrition Metabolism* 63(2-3): 109.
- Gaal LFV.,Mertens IL, DeBlock CE, (2006) Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease, *Nature*, 444, 875-880.
- Gallic S, Oakhill JS, Steinberg GR, (2010), Adipose tissue as an endocrine organ, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 316 (2): 129–139.
- Grant RW, Dixit VD, (2015) Adipose Tissue as an Immunological Organ, *Obesity*, 23(3), 512-518.
- Gregor MF, Hotamisligil GS, (2011) Inflammatory Mechanisms in Obesity, *Annu. Rev. Immunol*, 29: 415–445.
- Hajer GR, Haeften. TW, Visseren FLJ,(2008), Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases, *European Heart Journal*, 29, 2959–2971
- Hedayati M., Sharifi K, Rostami F, Daneshpour MS, Yeganeh MZ, Azizi F,(2012) Association between TNF- α promoter G-308A and G-238A polymorphisms and Obesity, *Mol Biol Rep*, 39 :825–829.
- Heredia FP, Martínez SG, Marcos A, (2012) Chronic and degenerative diseases Obesity, inflammation and the immune system, *Proceedings of the Nutrition Society*, 71(2), 332–338.
- Hotamisligil GS, Schargill NS, Spiegelman BM, (1993), Adipose Expression of Tumor Necrosis Factor- α : Direct Role in Obesity-Linked Insulin Resistance, *Science*, 259(5091): 87-91.
- Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN, Spiegelman BM, (1994), Tumor necrosis factor α inhibits signaling from the insulin receptor, *Proc. Nadl. Acad. Sci.*, 91 (11) 4854-4858.
- Hotamisligil GS, (1999), Mechanisms of TNF- α -induced insulin resistance, *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 107(2): 119-125.

- Huang M, Wang L, Ma H, Wang J, Xiang M, (2013), Lack of an Association Between Interleukin-6 -174G/C Polymorphism and Circulating Interleukin-6 Levels in Normal Population: A Meta-Analysis, *DNA and Cell Biology*, 32(11): 654-664.
- Ichihara S & Yamada Y, (2008), Genetic factors for human obesity, *Cell. Mol. Life Sc*, 65(7): 1086 – 1098.
- Intemann CD, Thye T, Förster B, Owusu-Dabo E, Gyapong J, Horstmann RD, (2011), Meyer CG, MCP1 haplotypes associated with protection from pulmonary tuberculosis, *BMC Genetics* 12: 1-9.
- Joffe YT, Merwe L, Carstens M., Collins M, Jennings C, Levitt NS, Lambert EV, Goedecke, (2016), Tumor Necrosis Factor- α Gene -308 G/A Polymorphism Modulates the Relationship between Dietary Fat Intake, Serum Lipids, and Obesity Risk in Black South African Women, *The Journal of Nutrition Biochemical*, 66: 1295–1302.
- Julio MAF., Pinhel MS, Quinhoneiro DCG., Nicoletti CF., Brandão AC, Nonino CB, Pinheiro SJr., Oliveira B.A.P., Gregório ML, Andrade DO, Oliveira CC, Souza D.S., (2014), LEP -2548G>A Polymorphism of the Leptin Gene and Its Influence on the Lipid Profile in Obese Individuals, *Journal of Nutrigenet and Nutrigenomics*;7(4-6): 225–231.
- Junqueira, LCU & Carneiro, J, (2008) *Histologia Básica*. 11^a Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro: 124-128.
- Kaptoge S, Angelotio ED, (2012), C-Reactive Protein, Fibrinogen, and Cardiovascular Disease Prediction, *The New England Journal of Medicine*, 14: 1310-1320.
- Klaauw AA, Farooqi S, (2015), *The Hunger Genes: Pathways to Obesity*, 161(1): 119–132.
- Kluft C& Maat MPM., (2003), Genetics of C-Reactive Protein New Possibilities and Complications, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23: 1956-1958.
- Khosravi R, Ka K, Huang T, Khalili, Hong B, Nguyen H, Nicolau B, Tran S, (2013), Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-6: Potential Interorgan Inflammatory mediators Contributing to Destructive Periodontal Disease in Obesity or Metabolic Syndrome, Hindawi Publishing Corporation *Mediators of Inflammation*, 2013: 1-6.
- Kuningas M, May L, Tamm R, van Bodegom D, van den Biggelaar AHJ, *et al.* (2009) Selection for Genetic Variation Inducing Pro-Inflammatory Responses under Adverse Environmental Conditions in a Ghanaian Population. *PLoS ONE*, 4(11), 1-7.
- Kwon H, Pessin JE, (2013), Adipokines mediate inflammation and insulin resistance, *Frontier of Endocrinology*, 4: 1-13.

- Lee J, (2013), Adipose tissue macrophages in the development of obesity-induced inflammation, insulin resistance and type 2 Diabetes, *Archives. Pharmacol. Research*, 36 (2): 208–222.
- Leite L.D., Rocha E.D.M., Neto J.B., (2009), Obesity: an inflammatory disease, *Revista Ciência & Saúde*, 2 (2): 85-95.
- Lolmede K, Duffaut C, Zararoff GA, Bouloumie A., (2011), Immune cells in adipose tissue: key players in metabolic disorders. *Diabetes & Metabolism*; 37(4), 283–290.
- López RG, Buen EP, Corona JS, Castro JS, Carrera FM, (2013), Interleukin-6 polymorphisms Are Associated with Obesity and Hyperglycemia in Mexican adolescents, *Archives of Medical Research*, 37(4): 62-68.
- Mammès O, Betoulle D, Aubert R, Herbeth B, Siest G, Fumeron F, (2000) Association of the G-2548A polymorphism in the 5' region of the LEP gene with overweight, *Ann Hum Genet.* 64: 391-394.
- Mandal RK, Agrawal T, Mittal RD, (2014) Genetic variants of chemokine CCL2 and chemokine receptor CCR2 genes and risk of prostate cancer, *Tumor Biology* 36(1): 1-7.
- Mirhafez SR, Ayan A, Pasdar A, Kazemi E, Kazemi E, Ghasemi F, Tajbakhsh A, Tabae S, Ferns GA, Mobarhan MG, (2015), Association of tumor necrosis factor- α promoter G-308A gene polymorphism with increased triglyceride level of subjects with metabolic syndrome, *Gene*, 568 (1): 81–84.
- Motie M, Evangelista S, Horwich T, Lombardo D, Zaldivar F, Hamilton M, Fonarow, (2014), Association between inflammatory biomarkers and adiposity in obese patients with heart failure and metabolic syndrome, *Experimental And Therapeutic Medicine* 8: 181-186.
- MS. Ministério da Saúde. Vigitel 2014.
<=<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/17445-obesidade-estabiliza-no-brasil-mas-excesso-de-peso-aumenta>>=>. Acessado em 14/02/2016.
- Murphy K, Travers P, Walpor, M.(2014) *Imunobiologia de Murphy*. 7ª ed, ArtMed, Porto Alegre: 365.
- Nasibullin TR, Belongova VA, Tuktarova IA, Nikolaeva IE, Karamova IM, Mustafina OE, (2011), Association of the CCL2C polymorphic markers with essential hypertension, *Russian Journal of Genetics*, 47:1124.
- NCBI. Nation Center of Biotechnology Information. Gene Bank;
<=<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>=>. Acessado em 14/02/2016.
- Nelson DL & Cox MM, (2014) *Princípios de Bioquímica de Lehninger*, 6ªed, Artmed, 960-970.

- Oana MC, Bănescu C, Duicu C, Pitea AM, Voidazan S, Marginean C, (2014), The role of IL-6 572 C/G, 190 C/T, and 174 G/C gene polymorphisms in children's obesity, *Eur J Pediatr*, 173 (10): 1285-1296.
- Ogden CL, Carroll MD, Kit B.K., and Flegal K.M., (2014), Prevalence of childhood and adult obesity in the United States, 2011–2012. *JAMA* 311(8): 806–814.
- Oliveira CMB, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR, Salomão R, (2011), Cytokines and Pain, *Rev Bras Anesthesiol*; 61(2): 255-265.
- Oliveira JM, Rêgo JL, Santana NL Braz M., Jamieson S.E., Vieira T.S., Magalhães T.L., Machado P.R.L., Black J.M., Castelluci L.C., (2016), The - 308 bp TNF gene polymorphism influences tumor necrosis factor expression in leprosy patients in Bahia State, Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*, 39: 1-23.
- Oliveira R, Cerda A, Genvigir DV, Sampaio MF, Armaganijan D, Bernik MS, Dorea EL, Hirata MH., Hinuy HM., Hirata RDC, (2013), Leptin receptor gene polymorphisms are associated with adiposity and metabolic alterations in Brazilian individuals, *Arq Bras Endocrinol Metab*. 57 (9): 677-684.
- Ota T, (2013), Chemokine Systems Link Obesity to Insulin Resistance. *Diabetes & Metabolism Journal*. 37(3): 165-172.
- Panee J, (2012), Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) in obesity and diabetes, *Cytokine*, 60(1): 1–12.
- PDB. Protein Data Bank. 1AX8; <=<http://www.rcsb.org/pdb>> Acessado em 14/02/2016.
- Pepys MB & Hirschfield GM, (2003), C-reactive protein: a critical update, *J. Clin. Invest*. 111: 1805–1812.
- Phillips C, Goumidi L, Bertrais S, Ferguson JF, Field MR, Kelly ED, Mehegan J, Peloso GM., Cupples LA., Shen J, Ordovas JM, McManus R, Hercberg S, Portugal H, Lairon D, Planells R, Roche HM, (2010), Additive Effect of Polymorphisms in the IL-6, LTA, and TNF- α Genes and Plasma Fatty Acid Level Modulate Risk for the Metabolic Syndrome and Its Components, *J Clin Endocrinol Metab*, 95(3): 1386–1394.
- Phillips CM, Tierney AC, Martinez PP, Defoort C, Blaak EE, Gjelstad IMF, Miranda JL, Klimczak MK, Malec MM, Drevon CA, Hall W, Lovegrove JL, Karlstrom B, Ríesrus U, Roche HM, (2013), Obesity and Body Fat Classification in the Metabolic Syndrome: Impact on Cardiometabolic Risk Metabotype, *Obesity*; 21(1): E154-E161.
- Popkin BM, (2006), Global nutrition dynamics: the world is shifting rapidly toward a diet linked with noncommunicable diseases. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006; 84(2): 289–298.

- Prado WL, Lofrano MC, Oyama LM, Dâmaso AR, (2009) Obesity and Inflammatory Adipokines: Practical Implications for Exercise Prescription, *Rev Bras Med Esporte* 15(5): 378-383.
- Pyrzaki B, Wisniewska A, Majcher A, Popko K, Wasik M, Demkow U, (2009), Association between metabolic disturbances and g-174c polymorphism of interleukin-6 gene in obese children, *Eur J Med Res*, 14(S4): 196-200.
- Radcliffe MCW, Ajuwon KM, Wang J, Christian JA, Spurlock ME, (2004), Adiponectin differentially regulates cytokines in porcine macrophages, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 316 (3): 924–929.
- Rahilly SO, Farooqi IS, (2006), Genetics of obesity, Philosophical, *Transactions of Royal. Society*, B 361: 1095–1105.
- Rasmussen H, Zawalich KC, Ganaesan S, Calle R, Zawalich WS, (1990) Physiology and pathophysiology of insulin secretion, *Diabetes Care*, 13 (6): 655–666.
- Regazzetti C, Peraldi P, Gremeaux T, Najem-Lendom R, Ben-Sahra I, Cormont M, *et al.* (2009), Hypoxia decreases insulin signaling pathways in adipocytes. *Diabetes*; 58(1): 95–103.
- Romanowski M, Dziedziejko V, Karłowska MA, Sawczuk M, Safranow K, Domanski L, Pawlik A, (2015), Adiponectin and leptin gene polymorphisms in patients with posttransplant diabetes mellitus, *Pharmacogenomics*, 16(11): 1243-1252 .
- Samaan MC, Obeid J, Nguyen T, Thabane L, Timmons BW, (2013), Chemokine (C-C motif) Ligand 2 is a potential biomarker of inflammation & physical fitness in obese children: a cross-sectional study. *BMC Pediatrics* 13(47), 1-7.
- Saxena M, Agrawal CG, Srivastava N, Banerjee M, (2014), interleukin-6 (IL-6)-597 A/G (rs1800797) & -174 G/C (rs1800795) gene polymorphisms in type 2 diabetes, *Indian J Med Res*, 140: 60-68.
- Saxena M, Srivastava N, Banerjee M, (2013), Association of IL-6, TNF-a and IL-10 gene polymorphisms with type 2 diabetes mellitus, *Mol Biol Rep*, 40(11): 6271–6279.
- Scarpelli D, Cardellini M, Andreozzi F, Laratta E, Hribal ML, Marini MA, Tassi V, Lauro R, Perticone F, Sesti G, (2006), Variants of the Interleukin-10 Promoter Gene Are Associated With Obesity and Insulin Resistance but Not Type 2 Diabetes in Caucasian Italian Subjects, *Diabetes*, 55(5): 1529-1533.
- Scotecel M, Condell J, Lopez V, Lago F, Pino J, Reino JJG, Gualillo O, (2014), Adiponectin and Leptin: New Targets in Inflammation., *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 114(1), 97–102.

- Shapiro H, Lutatu A, Ariel A, (2011), Macrophages, Meta-Inflammation, and Immuno-Metabolism, *The Scientific World Journal*; 11: 2509-2529).
- Shawky RM, Sadik DI, (2012) Genetics of obesity, *The Egyptian Journal of Medical Human. Genetics*, 13(1) 11–17.
- Singh GK, & Lin SC, (2013), Dramatic increases in obesity and overweight prevalence among Asian subgroups in the United States, 1992–2011. *ISRN Prev. Med.* 2013: 1-12.
- Sippel C, Bastian RMA, Giovanella J, Faccin C, Contini V, Bosco SMD, (2014), Inflammatory processes of obesity, *Ras*, 12(42): 48-56.
- Slaterry ML, Curtin K, Sweeney C, Wolff RK, Baumgartner RN, Baumgartner KB, Giuliano AR, Byers T, (2008), Modifying Effects of IL-6 Polymorphisms on Body Size–Associated Breast Cancer Risk, *Obesity*, 16: 339–347.
- Soskic S, Stokic E, Obradovic M, Sudar E, Tanic N, Kupusinac A, Djordjevic J, Isenovic ER, (2014), Association of leptin gene polymorphism G-2548A with metabolic and anthropometric parameters in obese patients in a Serbian population: pilot study, *Clinical Lipidology*, 9(5): 505–513.
- Spalding KL, Arner E, Westermark PO et al., (2008), Dynamics of fat cell turnover in humans, *Nature*, 453(7196): 783–787.
- Stepien M, Stepien A, Wlazel RN, Paradowski M, Banach M, Rysz J, (2014), Obesity indices and inflammatory markers in obese non-diabetic normo- and hypertensive patients: a comparative pilot study, *Lipids in Health and Disease*, 13(29), 1-10.
- Stryjecki C, & Mutch DM, (2011), Fatty acid–gene interactions, adipokines and obesity, *European Journal of Clinical Nutrition* 65: 285–297.
- Stunkard AJ, Sørensen TI, Hanis C, Teasdale TW, Chakraborty R, Schull WJ, Schulsinger F. (1986), An adoption study of human obesity. *N Engl J Med* 1986; 314:193-198
- Sun S, Ji Y, Kersten S, Qi L (2012), Mechanisms of inflammatory responses in obese adipose tissue. *Annu.Rev.Nutri* 32: 261–286.
- Sunyer FXP, (2000), Obesity: criteria and classification, *Proceedings of the Nutrition Society*, 59(4), 505–509.
- Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR, (2006), Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol*; 7:85–96.
- Tateya S, Kim F & Tamori Y, (2013) Recent advances in obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Frontiers in Endocrinology*; 4: 1-14.

- Thomas DM, Weedermann M., Fuemmeler B.F., Martin C.K., Dhurandhar N.V., Bredlau C., Heymsfield S.B., Ravussin E., and Bouchard C., (2014), Dynamic model predicting overweight, obesity, and extreme obesity prevalence trends. *Obesity*; 22(2): 590–597.
- Todendi P.F., Elisa K., Ferreira M., Reuter C.P., Burgos M.S., Possuelo L.G., Valim A.R.M., (2015), Association of IL-6 and PCR gene polymorphisms with obesity and metabolic disorders in children and adolescents, *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* 87(2): 915-924.
- Torres T, Bettencourt N, Ferreira J, Carvalho C, Mendonça D, Vasconcelos C, Selores M, Silva B, (2015), Lack of association between leptin, leptin receptor, diponectin gene polymorphisms and epicardial adipose tissue, abdominal visceral fat volume and atherosclerotic burden in psoriasis patients, *Archives of physiology and Biochemistry*, 121(3): 1-6.
- Tsillidis KK, Helzlsouer K, Smith MW, Grinberg V, Bolton JH, Clipp SL, Visvanathan K., Platz E., (2009), Association of common polymorphisms in IL10, and in other genes related to inflammatory response and obesity with colorectal cancer, *Cancer Causes Control*, 20: 1739–1751.
- Uysal KT, Wiesbrock SM, Hotamisligil GS, (1998), Functional Analysis of Tumor Necrosis Factor (TNF) Receptors in TNF- α -Mediated Insulin Resistance in Genetic Obesity, *Endocrinology*, 139(12): 4832- 4838.
- van der Klaauw & Farooqi. (2015).The Hunger Genes: Pathways to Obesity. *Cell*, 161(1): 119-132
- van Greenbroek MMJ., Schalkwijk CG, Stehouwer CDA, (2013), Obesity-associated low-grade inflammation in type 2 diabetes mellitus: causes and consequences, *The Journal of Medicine* 71(4), 174-187.
- Vielma SA, Klein RL, Levington CA, Young MRI., (2013), Adipocytes as immune regulatory cells. *International Immunopharmacology*, 16(2): 224-231.
- Wang TN, Huang MC, Chang WT, Ko AMS, Tsai EM, Liu CS, Lee CH, Ko YC, (2006), G-2548A Polymorphism of the Leptin Gene Is Correlated with Extreme obesity in Taiwanese Aborigines, *Brief Genetic Analysis, Obesity*, 14(2): 183-187.
- WHO. World Health Organization. Obesity and overweight. What are overweight and obesity? Fact sheet N°311. Updated March 2013;
<=<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/print.html>>=. Acessado: 14/02/2016.
- Wieser V, Moschen AR, Tilg H., (2013), Inflammation, Cytokines and Insulin Resistance: A Clinical Perspective, *Arch. Immunol. Ther. Exp*, 61(2): 119–125.

- Wilson AG, Giovine FS, Blakemore AIF, Duff GW, (1992) Single base polymorphism in the human Tumour Necrosis Factor alpha (TNF- α) gene detectable by A/col restriction of PCR product, *Human Molecular Genetics*, 1(5): 353.
- Wisse BE, (2004), The Inflammatory Syndrome: The Role of Adipose Tissue Cytokines in Metabolic Disorders Linked to Obesity, *J Am Soc Nephrol*, 15 (11), 2792–2800.
- Wood IS, de Heredia FP, Wang B., and Trayhurn P., (2009) Cellular hypoxia and adipose tissue dysfunction in obesity. *Proc.Nutr.Soc.*; 68: 370-377.
- Xia Q& Grant SFA., (2013), The genetics of human obesity *Ann. N.Y. Acad. Sci*, 128(1): 178–190.
- Yin YM, Sun QQ, Zhang BB, Hu AM, Liu HL, Wang Q, Zeng YH, Xu RJ, Ma JB, Shi LB, (2012), Association between interleukin-10 gene $_592$ C/A polymorphism and the risk of type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis of 5320 subjects, *Human Immunology*, 73: 960–965.
- Youcef ND, Mecili M., Ricci R., Andrès E., (2013), Metabolic inflammation: Connecting obesity and insulin resistance *Annals of Medicine*, 45: 242–253.
- Zhang F, Basinski MB, Beals JM, Briggs SL, Churgay LM, Clawson DK, DiMarchi RD, Furman TC, Hale JE, Hsiung HM, Schonker BE, Smith DP, Zhang XY, Wery JP, (1997), Crystal structure of the obese protein leptin-E100, *Nature*, 387: 206-209.
- Zhang YM, Zhou XC, Xu Z, Tang CJ, (2012) Meta-analysis of epidemiological studies of association of two polymorphisms in the interleukin-10 gene promoter and colorectal cancer risk, *Genetics and Molecular Research*, 11(3): 3389-3397.
- Zhang F, Yang Y, Lei H, Qiu J, Wang Y., Hu D., Skrip L., Chen F., (2013), A meta-analysis about the association between $_1082$ G/A and $_819$ C/T polymorphisms of IL-10 gene and risk of type 2 diabetes, *Human Immunology* 4(5): 618-626.

8. Apêndices

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)



POLIMORFISMOS MOLECULARES EM GENES ASSOCIADOS À OBESIDADE E SÍNDROME METABÓLICA

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Apresentação do estudo

O estudo de Polimorfismos Moleculares em Genes Associados à Obesidade e Síndrome Metabólica é uma pesquisa que visa analisar aspectos genéticos, imunológicos e bioquímicos em indivíduos que apresentam distúrbios no metabolismo que podem resultar em doenças crônicas relacionadas e que tem acometido um grande número de brasileiros nos últimos anos, principalmente a população adulta. Entre estas patologias podemos citar a obesidade e a síndrome metabólica (SM), que são fatores de riscos para o desenvolvimento de doenças mais severas como as doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo II e obesidade mórbida.

Objetivos do estudo

O estudo investigará fatores que podem levar ao desenvolvimento dessas doenças, ou o seu agravamento, podendo contribuir para a melhor compreensão e desenvolvimento de novas formas de prevenção e tratamento. Os fatores investigados incluem aspectos relacionados aos hábitos de vida, histórico familiar, trabalho, lazer e saúde em geral, além de fatores de riscos genéticos. Para este último se propõem o estudo de polimorfismos de genes relacionados com a regulação da fome, com o balanço energético, com o metabolismo de lipídios e com a diferenciação de adipócitos, tendo como finalidade analisar uma possível associação destes polimorfismos com o desenvolvimento de obesidade e SM. A análise de genes candidatos poderá ajudar a aumentar o conhecimento sobre as bases dos mecanismos energéticos, a compreensão dos fatores genéticos que predisõem ao desenvolvimento destas patologias, além das doenças mais graves correlacionadas (citadas anteriormente). O estudo também se propõe a estabelecer a prevalência e a definir os perfis de risco para o desenvolvimento destas morbidades.

Instituições envolvidas no estudo

O projeto será desenvolvido no Laboratório de Genética Humana do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz em colaboração com a Policlínica da Caixa de Assistência Oswaldo Cruz (FioSaúde) e o Laboratório de Imunofarmacologia/IOC/Fiocruz. O estudo está sob a coordenação da Dra. Giselda Maria Kalil de Cabello do Laboratório de Genética Humana/IOC.

Participação do estudo

Os participantes que preencherem os critérios diagnósticos de síndrome metabólica, obesidade mórbida ou no caso dos voluntários saudáveis, aqueles que não apresentem nenhuma dessas patologias, serão cadastrados e uma ficha clínica será preenchida após a leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Em

seguida, amostras de sangue total serão coletadas e utilizadas para as análises genéticas e testes imunobioquímicos. O total de sangue coletado será de aproximadamente 10 ml e não traz nenhuma inconveniência para adultos, apenas um leve desconforto pode ocorrer associado à picada da agulha. Os exames clínicos (medida de peso, altura, altura e circunferências), os testes imunobioquímicos fazem parte da rotina médica e nenhum deles é invasivo ou emite radiação. As análises genéticas são realizadas a partir do DNA extraído a amostra de sangue e além de não trazer nenhum risco, serão observadas as normas vigentes para Pesquisa em Seres Humanos segundo a resolução do Ministério da Saúde 196/96. O material biológico coletado (sangue) será encaminhado para o Laboratório de Genética Humana, do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ.

Em casos excepcionais pode ser solicitada pela equipe de pesquisa uma segunda coleta, caso o material não seja suficiente ou sofra algum tipo de alteração (coagulação, hemólise, degradação) ou ainda para a realização de novos exames ou análises genéticas não previstos inicialmente, com o objetivo de fornecer informações adicionais para o estudo, sem que isto acarrete nenhum prejuízo ou risco para a saúde do paciente, exceto aqueles relacionados com a retirada rotineira de sangue como já colocado anteriormente. Em qualquer das situações, sua participação não é obrigatória e o Sr./a não terá nenhum prejuízo caso não venha aceitar repetir ou realizar estes procedimentos.

Armazenamento de material biológico e dados clínicos

As amostras de sangue encaminhadas serão armazenadas como ácido desoxirribonucleico (DNA), soro e alíquotas de excedentes de sangue, que serão estocadas para a pesquisa por um prazo mínimo de cinco (10) anos. Cada amostra de material biológico fará parte de um banco de amostras identificadas por códigos específicos que garantirão o sigilo e a confidencialidade das informações. As respectivas fichas de dados clínicos e TCLE serão arquivadas em um banco de dados contendo as informações clínicas e epidemiológicas, sob a responsabilidade do Laboratório de Genética Humana do Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, de acordo com os requisitos da Resolução CNS 441 de 12 de Maio de 2011. Serão respeitadas as normas vigentes para Pesquisa em Seres Humanos segundo a resolução do Ministério da Saúde 196/96, especialmente relevantes a menores e aos estudos de caráter genético.

Seu direito como participante

Sua participação no projeto é inteiramente voluntária, sendo importante a participação em todas as etapas do estudo. Entretanto, se quiser, poderá deixar de responder a qualquer pergunta durante a entrevista, recusar-se a medir-se ou retirar sangue e solicitar a substituição do/a entrevistador. Os indivíduos que se opuserem a ingressar no projeto, ou que quiserem se retirar do mesmo, não sofrerão nenhum tipo de penalidade referente ao seu atendimento clínico, acesso a tratamentos disponíveis, ou acesso a qualquer outro tipo de atividade assistencial e/ou de pesquisa que por ventura possam existir no futuro.

Não haverá qualquer pagamento pela participação, pelo transporte e/ou alimentação; e todos os procedimentos serão inteiramente gratuitos. Os resultados, normais ou alterados, serão entregues aos médicos responsáveis que se comprometem a entregar a cada voluntário participante; os resultados serão utilizados com fins científicos, podendo ser publicados em revistas científicas, sem qualquer identificação do participante. Na eventualidade de um resultado que indique um perfil de risco elevado para as patologias estudadas, o médico responsável será informado para que uma abordagem terapêutica disponível seja adotada. Todos os resultados disponíveis somente serão veiculados a partir da autorização dos participantes neste termo de consentimento, como também se manterá o anonimato destes de acordo com as normas de Pesquisa em Seres Humanos (resolução 196/96 do Ministério da Saúde).

Reafirmamos que todas as informações obtidas serão confidenciais, identificadas por códigos, garantindo o anonimato. Elas serão utilizadas exclusivamente para fins científicos e serão armazenadas com segurança, tendo acesso apenas os pesquisadores envolvidos no projeto. Em nenhuma hipótese será permitido o acesso a qualquer pessoa que não faça parte do grupo de pesquisa às informações individualizadas, incluindo empregadores, seguradoras ou superiores hierárquicos.

Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido lhe será entregue e sua assinatura a seguir significa que o/a Sr/a leu e compreendeu todas as informações e concorda em participar da pesquisa. As informações contidas neste TCLE visam firmar acordo por escrito, mediante o qual o sujeito objeto de pesquisa, autoriza sua participação, com pleno conhecimento da natureza dos procedimentos e riscos a que se submeterá, com capacidade de livre arbítrio e sem qualquer coação.

Nome do participante	_____		
Documento de identidade	_____	Data de nascimento	__/__/__
Endereço:	_____		
	_____	CEP	_____
Telefone para contato	_____		

Declaro, por meio deste termo, que concordei em participar do projeto de pesquisa - **Polimorfismos moleculares em genes associados à obesidade e síndrome metabólica** - que será desenvolvido no Laboratório de Genética Humana do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz. Fui informado (a) que a pesquisa é coordenada pela **Dra. Giselda Maria Kalil de Cabello**, a quem poderei contatar a qualquer momento que julgar necessário através dos telefones (21) 3865-8213/3865-8214/3865-8192 ou e-mail gkalil@ioc.fiocruz.br. Estou ciente de que será necessária a retirada de uma amostra de

sangue, que a coleta de sangue segue rotinas padronizadas e será realizada, assim como todos os procedimentos da pesquisa, por pessoal capacitado e treinado, supervisionado por profissional qualificado, que poderá orientar-me no caso de dúvida, ou ocorrência de alguma eventualidade. Também fui informado de que serão preenchidos formulários contendo dados clínicos e pessoais e que os mesmos serão mantidos em sigilo.

Afirmo que aceitei participar por minha própria vontade, sem receber qualquer tipo de pagamento e com a finalidade exclusiva de colaborar para o sucesso da pesquisa. O médico responsável pelo meu acompanhamento me deu todas as orientações sobre esta pesquisa e entendi que se trata de uma pesquisa para estudar uma possível associação de genes com o desenvolvimento de obesidade e síndrome metabólica. Fui informado que uma ficha clínica será preenchida após a leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Também fui informado que serão coletados 10mL de sangue no antebraço, com agulha e seringa descartáveis e estéreis, antecedido por higienização local (O local da punção pode ficar dolorido por alguns minutos – é aconselhável exercer uma certa pressão neste local por aproximadamente 3 minutos após a coleta); que o sangue será utilizado para extração de DNA para avaliar a presença de variações genéticas e que os dados gerados pela análise genética não serão divulgados nominalmente e sim sob a forma de frequência, garantindo o anonimato. Esse material ficará armazenado em um banco de dados e somente será utilizado para futuros projetos mediante nova submissão e aprovação do Comitê de Ética da Instituição, bem como a concordância por escrito. Me foi informado e garantido que a assistência médica não será modificada em função da aceitação ou não em participar desta pesquisa e que posso desistir em qualquer momento da minha participação sem que isto interfira em tratamento futuro. Na eventualidade de um resultado que indique um perfil de risco elevado para as patologias estudadas, o médico responsável será informado para que uma abordagem terapêutica disponível seja adotada.

Estou ciente de poder fazer quaisquer perguntas a qualquer momento e que a coleta não acarretará nenhum prejuízo ou risco para minha saúde, exceto aqueles relacionados com a retirada rotineira de sangue. Sei que esta pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa Humana do Instituto Oswaldo Cruz (CEP Fiocruz IOC), a saber: Avenida Brasil 4036 – Sala 705 (Prédio da Expansão) – Manguinhos – RJ – CEP: 21040-360 – Tels: (21) 3882-9011 Fax: (21) 2561-4815 – E-mail: etica@fiocruz.br e cepfiocruz@ioc.fiocruz.br.

Declaro que li entendi o que me foi explicado, concordo em participar desta pesquisa e concordo que as amostras de sangue colhidas, bem como os dados clínicos, sejam armazenadas para análises sobre as doenças crônicas em estudo, não sendo necessário que eu seja consultado/a toda vez que forem utilizadas de acordo com os objetivos definidos no protocolo original da pesquisa.

Sim () Não ()

Assinatura:

Rio de Janeiro, _____/_____/_____

Nome do Sujeito da Pesquisa:

Assinatura do Sujeito da Pesquisa

Nome do/a Entrevistador/a:

Assinatura do/a entrevistador/a

Ficha de Dados do Paciente



Data de coleta: ___/___/___ Unidade Hospitalar: _____

Médico responsável: _____ CRM: _____

Telefone p/contato: _____ E-mail: _____

Dados do Paciente

Nome do Paciente: _____

Prontuário: _____ Data de Nascimento: ___/___/___

Sexo: ()F ()M Cor referida: () Branca () Preta () Parda () Amarela () Indígena

() Sem Classificação () Outra Qual? _____

Endereço: _____ Bairro: _____

CEP: _____ Profissão: _____ Telefone: _____

História Clínica:

Idade: _____	Tabagismo: ()S ()N	Prática de Atividade Física: ()S ()N
História Progressiva de Hipertensão: ()S ()N	Diabetes: ()S ()N	Diabetes Gestacional: ()S ()N
Doença arterial coronariana: ()S ()N	Síndrome de Ovário Policístico: ()S ()N	
História Familiar de Hipertensão: ()S ()N	História Familiar de Diabetes: ()S ()N	
História Familiar de doenças cardiovasculares: ()S ()N	Quem? _____	
Uso de medicamentos hiperglicemiantes: ()S ()N	Quais? _____	
Ganho de peso no último ano: ()S ()N	Quantos aproximadamente? _____	
Obesidade infantil: ()S ()N	Obesidade na gravidez: ()S ()N	Obesidade após menopausa: ()S ()N

Dados Antropométricos:

Parâmetro	Avaliação
Peso	
Altura	
IMC	
Circunferência Abdominal	
Circunferência do Quadril	
Razão Cintura/Quadril	
Pressão Arterial	
Circunferência do pescoço	

Dados Laboratoriais:

Bioquímica	Valor
Glicemia de Jejum	
Insulina	
Colesterol Total	
HDL-colesterol	
Triglicérides	

Formulário dos Pacientes.

Caro amigo (a),

Você está recebendo um material desenvolvido com o objetivo de conhecer melhor os portadores de obesidade mórbida da nossa cidade. Os conhecimentos obtidos através da análise da resposta de vocês serão úteis para que no futuro possamos empreender esforço a fim de melhorar o atendimento de vocês por parte do serviço público.

Por favor, leia com atenção as perguntas e responda com calma. Qualquer dúvida pergunte a algum dos profissionais da equipe. Lembramos que as respostas devem ser individuais e serão mantidas no mais absoluto sigilo.

Obrigado

Nome: _____

Data de Nascimento: __/__/__

Formulário para o Paciente

Estado civil	<input type="radio"/> Solteiro (a)	<input type="radio"/> Casado (a)	<input type="radio"/> Separado (a) ou divorciado (a)	<input type="radio"/> Viúvo (a)	<input type="radio"/> Outro	
Cor	<input type="radio"/> Branca	<input type="radio"/> Negra	<input type="radio"/> Parda	<input type="radio"/> Amarela	<input type="radio"/> Indígena	<input type="radio"/> Outra
Nacionalidade	_____					
Ocupação	<input type="radio"/> Estuda	<input type="radio"/> Estuda e trabalha fora	<input type="radio"/> Trabalha fora	<input type="radio"/> Do lar	<input type="radio"/> Aposentado	
	<input type="radio"/> Aposentado por doença	<input type="radio"/> Sem ocupação (não aposentado)				
Escolaridade	<input type="radio"/> Analfabeto	<input type="radio"/> 1º Grau incompleto	<input type="radio"/> 1º Grau completo	<input type="radio"/> 2º Grau incompleto	<input type="radio"/> 2º Grau completo (até a 3ª Série do 2º Grau)	
	<input type="radio"/> Superior incompleto	<input type="radio"/> Superior completo	<input type="radio"/> Pós-Graduação Incompleta	<input type="radio"/> Pós-Graduação completa		
Está trabalhando atualmente?	<input type="radio"/> Sim <input type="radio"/> Não					
Se não estiver trabalhando, é a obesidade que atrapalha você a conseguir trabalho?	<input type="radio"/> Sim <input type="radio"/> Não					
Precisa operar?	<input type="radio"/> Sim <input type="radio"/> Não <input type="radio"/> Não sei OBS.: _____					
Há quanto tempo está esperando pela cirurgia?	_____ meses	_____ anos	<input type="radio"/> Não irá operar	<input type="radio"/> Já operou		
Em que fase da vida começou o seu problema de excesso de peso? (escolher até 2)						

<input type="radio"/> infância	<input type="radio"/> adolescência	<input type="radio"/> logo após o casamento	<input type="radio"/> durante a gestação	<input type="radio"/> durante a amamentação
--------------------------------	------------------------------------	---	--	---

<input type="radio"/> Quando interrompeu atividade física		<input type="radio"/> Quando parou de fumar		<input type="radio"/> Quando usou um medicamento	
<input type="radio"/> Após uma cirurgia		<input type="radio"/> Após a menopausa		<input type="radio"/> Após uma situação muito difícil que passou (perda de alguém, acidentes ou trauma)	
<input type="radio"/> Não tenho problema com excesso de peso					
Qual o principal motivo para você ter engordado? (Escolha apenas uma opção)					
<input type="radio"/> Porque come demais.		<input type="radio"/> Porque tem tendência muito forte para engordar.		<input type="radio"/> Porque não faz exercícios	
<input type="radio"/> Porque acha que é genético					
Você está no seu peso máximo?		<input type="radio"/> Sim		<input type="radio"/> Não, já fui mais pesado no passado.	
Se não estiver no peso máximo, qual teria sido? _____					
Qual é o seu principal motivo para querer emagrecer? (escolha apenas um deles)					
<input type="radio"/> Melhorar a aparência		<input type="radio"/> Melhorar a saúde		<input type="radio"/> Facilitar as tarefas do dia a dia.	
<input type="radio"/> Se sentir melhor perante a sociedade					
Você tem casos de obesidade na família?		<input type="radio"/> Sim		<input type="radio"/> Não	
<input type="radio"/> Mãe	<input type="radio"/> Pai	<input type="radio"/> Filho (a)	<input type="radio"/> Irmão (a)	<input type="radio"/> Avós maternos	<input type="radio"/> Avós paternos
Diabetes?	<input type="radio"/> Sim	<input type="radio"/> Não	Pressão alta?	<input type="radio"/> Sim	<input type="radio"/> Não
Colesterol alto?	<input type="radio"/> Sim	<input type="radio"/> Não			
Quantos remédios você toma por dia? _____					
Você toma algum desses remédios?		<input type="radio"/> Sim		<input type="radio"/> Não	
<input type="radio"/> Amaryl	<input type="radio"/> Minidiab	<input type="radio"/> Glifage	<input type="radio"/> Dimefor	<input type="radio"/> Glucoformin	<input type="radio"/> Glucobay
<input type="radio"/> Aglucil					
<input type="radio"/> Acarbose	<input type="radio"/> Novonorm	<input type="radio"/> Prandin	<input type="radio"/> Gluconorm	<input type="radio"/> Starlix	
<input type="radio"/> Diabinese	<input type="radio"/> Daonil	<input type="radio"/> Lisaglucon	<input type="radio"/> Diamicron	Outros? _____	