

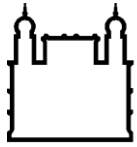
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**ANÁLISES DOS POLIMORFISMOS DOS GENES *ADIPOQ*, *RARRES2*,
PGC1A E *FNDC5* E SUAS POSSÍVEIS ASSOCIAÇÕES AO
DESENVOLVIMENTO DA OBESIDADE NO RIO DE JANEIRO**

ANA CAROLINA PROENÇA DA FONSECA

Rio de Janeiro
Agosto de 2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Ana Carolina Proença da Fonseca

Análises dos polimorfismos dos genes *ADIPOQ*, *RARRES2*, *PGC1- α* e *FNDC5* e suas possíveis associações ao desenvolvimento da obesidade no Rio de Janeiro.

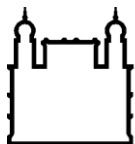
Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular

Orientador: Dr. Pedro Hernán Cabello Acero

RIO DE JANEIRO

Agosto de 2014

FICHA CATALOGRÁFICA A SER ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DE MANGUINHOS PARA A VERSÃO
FINAL DA TESE.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

ANA CAROLINA PROENÇA DA FONSECA

ANÁLISES DOS POLIMORFISMOS DOS GENES *ADIPOQ*, *RARRES2*, *PGC1A* E *FNDC5* E SUAS POSSÍVEIS ASSOCIAÇÕES AO DESENVOLVIMENTO DA OBESIDADE NO RIO DE JANEIRO

ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Pedro Hernán Cabello Acero

Aprovada em: 12/08/2014

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Fernando Regla Vargas - **Presidente** (Fiocruz-RJ)

Prof^a. Dr^a. Verônica Marques Zembruski (Fiocruz-RJ)

Prof^a. Dr^a. Maria da Graça Figueiredo Pereira Dutra (Fiocruz -RJ)

Prof. Dr. Mário Campos Júnior (FIOCRUZ-RJ)

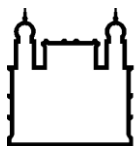
Prof. Dra. Viviane Galante Ramos (UNIGRARIO-RJ)

Rio de Janeiro, 12 de agosto de 2014

Anexar a cópia da Ata que será entregue pela SEAC já assinada.

Dedico este trabalho aos meus pais, Lúcio e Nereida por todo o amor, carinho e dedicação que recebi ao longo desses anos e por terem sido a peça fundamental para que eu conseguisse completar mais uma etapa em minha vida.

À minha família pelo carinho e apoio dispensados em todos os momentos que precisei.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Análises dos polimorfismos dos genes *ADIPOQ*, *RARRES2*, *PGC1- α* e *FNDC5* e suas possíveis associações ao desenvolvimento da obesidade no Rio de Janeiro

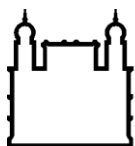
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Ana Carolina Proença da Fonseca

A obesidade é um sério problema mundial de saúde e tem sido associada ao aumento de risco para doenças comuns como a diabetes mellitus tipo 2, cardiovasculares, hipertensão, certas formas de câncer e síndrome metabólica. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde, existem mais de um bilhão de adultos com sobrepeso, e pelo menos 500 milhões de obesos, o que caracteriza a obesidade como um grave problema atual. O aumento de peso surge através de ações conjuntas dos fatores ambientais e genéticos, em particular naqueles indivíduos que já são geneticamente predispostos. Estudos têm investigado os fatores genéticos que predis põem à obesidade, embora tais fatores ainda sejam pouco compreendidos. Os genes candidatos à predisposição da obesidade estão relacionados com a regulação da fome, balanço energético, metabolismo de lipídeos e glicose; e diferenciação de adipócitos. Este trabalho teve como objetivo o estudo de polimorfismos nos genes *ADIPOQ* (rs17366568 e rs182052), *RARRES2* (rs17173608 e rs4721), *PGC1- α* (rs8192678 e rs3736265) e *FNDC5*, no intuito de analisar uma possível associação ao desenvolvimento de obesidade e complicações metabólicas associadas. A genotipagem dos polimorfismos foi realizada em 244 indivíduos, sendo 136 pacientes com obesidade e 108 eutróficos. Os polimorfismos estudados foram analisados por PCR em tempo real usando sondas TaqMan e sequenciamento automático. Nossos principais resultados mostraram os obesos exibindo altos níveis de IMC, circunferência abdominal, circunferência do quadril, pressão arterial, glicemia, triglicérides, VDL colesterol, proteína C reativa e hemoglobina glicada; e exibiram baixos níveis de HDL colesterol, quando comparados aos eutróficos. Além disso, estes obesos foram mais susceptíveis a diabetes mellitus tipo 2, síndrome metabólica e hipertensão. Em relação às análises moleculares, nós encontramos associações entre o polimorfismo rs3736265 e o haplótipo rs17366568/ rs182052 com a obesidade. Além disso, o polimorfismo rs182052 estava influenciando os traços de obesidade nos pacientes mórbidos, enquanto que o polimorfismo rs17173608 estava influenciando estes traços em ambos os indivíduos obesos e

eutróficos; e o polimorfismo rs8192678 influenciou o peso nos controles. Com relação aos parâmetros pressóricos e bioquímicos, nós observamos que o polimorfismo rs17173608 estava associado com os altos níveis de glicose nos indivíduos com IMC normal. Já os SNP rs8192678 e rs113173936 tinham efeitos na pressão arterial de obesos. Além disso, os polimorfismos rs3736265 e rs72882318 apresentaram efeitos nos níveis de VDL colesterol e triglicérides também em obesos. Finalmente, nossos resultados mostraram que os polimorfismos rs3736265 e rs4721 estavam associados com a síndrome metabólica e a diabetes mellitus tipo 2, respectivamente. Nós concluímos que estes polimorfismos influenciam de diferentes formas a obesidade e as complicações metabólicas.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Analysis of *ADIPOQ*, *RARRES2*, *PGC1- α* and *FNDC5* gene polymorphisms and possible associations with development of obesity in Rio de Janeiro

ABSTRACT

MASTER'S DISSERTATION IN CELL AND MOLECULAR BIOLOGY

Ana Carolina Proença da Fonseca

Obesity is a serious health problem worldwide and has been a major cause of morbidity and mortality associated with an increased risk for some common diseases such as type 2 diabetes mellitus, cardiovascular, hypertension, certain types of cancer and metabolic syndrome. According to the World Health Organization, there are more than one billion adults overweight and at least 500 million obese, which characterizes obesity as a serious problem today. Weight gain gives rise due to actions regarding environmental and genetic factors, in particular those who are already genetically predisposed. Studies have investigated the genetic factors that predispose to obesity, although these factors are still poorly understood. The candidate genes associated to obesity predisposition has been associated to the regulation of hungry, the energy balance, lipid and glucose metabolism; and adipocyte differentiation. This project aims to study the polymorphism of *ADIPOQ* (rs17366568 and rs182052), *RARRES2* (rs17173608 and rs4721), *PGC1- α* (rs8192678 and rs3736265) and *FNDC5* gene, in order to analyze a possible association with the development of obesity and metabolic complications associated with it. Genotyping of these polymorphisms was performed for 244 subjects, being 136 patients with obesity and 108 non-obesity controls. The polymorphisms studied in this project were analyzed by real-time PCR using TaqMan probes and automated sequencing. Our main results showed that obese subjects exhibiting high levels of BMI, abdominal circumference, hip circumference, blood pressure, fasting glucose, triglycerides, VLDL-cholesterol, C-reactive protein and glycated haemoglobin, and exhibited lower levels of HDL-cholesterol when compared to controls. Furthermore, these obese subjects were more susceptible of type 2 diabetes, metabolic syndrome and hypertension. Regarding the molecular analysis, we found association of rs3736265 polymorphism and rs17366568/rs182052 haplotype with obesity. Moreover, rs182052 polymorphism was influencing traits of obesity in morbid patients, while rs17173608 polymorphisms were influencing traits in both lean and obese subjects and rs8192678 SNP influenced only weight with control subjects only the weight of controls. Regarding to the blood pressure and biochemical parameters, we observed that rs17173608 polymorphism was associated with high levels of fasting glucose in normal BMI subjects. Already rs8192678 and rs113173936 SNP had effects of blood pressure in obese patients. Furthermore, rs3736265 and rs72882318 polymorphisms had effects of VLDL-cholesterol and triglycerides levels in obese subjects. Finally, our results showed that

rs3736265 and rs4721 polymorphisms were associated with metabolic syndrome and type 2 diabetes, respectively. We conclude that these polymorphisms influence the obesity in different ways and metabolic complications as well.

Agradecimentos

A Deus, por ter me dado força, coragem e iluminado meu caminho para que eu pudesse concluir mais uma etapa na minha vida.

À minha mãe, amiga e companheira Nereida, obrigada por absolutamente tudo! Eu sei o quanto você trabalhou uma vida inteira para que eu conseguisse chegar até aqui e o quanto batalhamos juntas nesses dois anos para que eu realizasse mais esse sonho. E também sei que este era um dos seus maiores desejos e eu dedico essa dissertação a você. Saiba que não existem palavras no mundo que definam o tamanho do amor e admiração que sinto por você.

Ao meu pai Lúcio, por todo amor e dedicação que sempre teve comigo. Homem pelo qual tenho maior orgulho de chamar de pai, meu eterno agradecimento pelos momentos em que esteve ao meu lado, me apoiando e me fazendo acreditar que nada é impossível e que este é apenas mais um obstáculo. Amo você.

Aos meus irmãos mais velhos, Lúcio e Guilherme, por toda essa caminhada que fizemos juntos e por todas as dificuldades que conseguimos ultrapassar. Obrigada pela dedicação, pela força e pelos conselhos.

Aos meus pequenos, Matheus e Ana Clara, obrigada pelas distrações, brincadeiras e muitas risadas nas horas de dificuldade.

À toda minha família, pelo amor, carinho, força que me deram em todos esses anos. Em especial minha tia Elza, que sempre cuidou de mim. Nunca se esqueça do quanto te amo.

Às minhas avós, Ottília e Hercília, que sempre me apoiaram e ajudaram em todos os momentos de dificuldade. Obrigada por tudo que fizeram por mim em toda a minha vida, sou muito grata de ter vocês como avós.

Aos meus avôs, Carlos e Othon, *in memoriam*, que apesar de não estarem mais presentes na minha vida, foram importantes para o meu desenvolvimento e sei que de onde estiverem estarão felizes com esta minha conquista.

Ao meu namorado, companheiro e melhor amigo, Bruno. Esse tempo que passamos juntos foi fundamental, você não apenas me ajudou a passar pelas dificuldades e medos, como também me fez acreditar que posso enfrentar qualquer coisa, desde que eu saiba qual o meu objetivo. E não tenho palavras para agradecer o que este ensinamento mudou minha vida. Agradeço todos os dias por ter você ao meu lado e vamos para mais uma grande etapa juntos, que venha o doutorado! Amo você!

À minha orientadora Giselda, obrigada pela paciência, dedicação e ensinamento dispensados ao longo desses 6 anos. Saiba que você possibilitou a realização de um dos objetivos mais importantes na minha vida e obrigada por ter acreditado que eu conseguiria vencer mais essa etapa.

Ao meu orientador Pedro, agradeço pela oportunidade de ter me deixado fazer parte da família LGH e ser sua aluna. Além disso, obrigada pela paciência de me explicar bioestatística e pelas horas fazendo cálculos e montando as tabelas. Sou muito grata!

Aos meus amigos do Laboratório de Genética Humana, Raisa, Paula, Tati Cozendey, Láiza, Vivianne, Verônica, Amanda, Sérgio, Juliana, Alan, Fernando e Mário. Obrigada pela

amizade, risadas, ensinamentos, carinho e paciência. As semanas são muito mais divertidas com a presença de vocês. Em especial a Láiza, que me auxiliou nas coletas. Gostaria de destacar também a Raisia, que sempre me apoiou, me deu força e fez acreditar que eu conseguiria e que ia dar certo, quando muitas vezes nem eu mesma acreditava. Nós estamos juntas desde a faculdade, passando por todas as etapas sempre ajudando uma a outra, quero que saiba que esta conquista também é sua, teria sido tudo muito mais difícil sem você. Obrigada por tudo, inclusive pela amizade!

Gostaria também de destacar a Paula e a Tati Cozendey, que apesar de mais recentes no laboratório, sempre me deram força e se tornaram grandes amigas, dentro e fora do ambiente de trabalho! Obrigada pelas conversas, conselhos e paciência!

Não posso deixar de colocar aqui, minhas amigas de anos, que mesmo sem saber, estavam sempre me ajudando. Obrigada de coração Juliana, Bárbara e Clarissa por toda atenção, carinho e paciência dispensada comigo. Vocês não são apenas parte de mim, mas da minha vida!

A todos os trabalhadores e pacientes da GRACO, em especial a presidente Rosimere, obrigada por estar sempre pronta a ajudar e ser essa pessoa maravilhosa, sem você esse trabalho não teria sido possível.

Ao professor João Regis, obrigada pela colaboração e todas as sugestões feitas ao projeto.

Ao professor Firmino e Vânia do Laboratório de Lípidos, que realizaram todas as análises bioquímicas.

E para finalizar a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Instituto Oswaldo Cruz (IOC).

“Nada na vida deve ser temido, apenas compreendido.
Agora é hora de compreender mais para temer menos.”

Marie Curie

ÍNDICE

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1 Introdução	1
1.1 Tecido Adiposo – Amigo ou inimigo?	3
1.2 Obesidade – a pandemia do século 21	7
1.3 Epidemiologia	8
1.4 Índices antropométricos e associações com as complicações metabólicas	10
1.5 Comorbidades	13
1.6 Fatores genéticos associados à obesidade	17
1.7 Genes candidatos	19
1.7.1 Gene <i>ADIPOQ</i>	19
1.7.2 Gene <i>RARRES2</i>	24
1.7.3 Gene <i>PGC1-α</i>	28
1.7.4 Gene <i>FNDC5</i>	32
2 Objetivos	36
2.1 Objetivos Gerais	36
2.2 Objetivos Específicos	36
3 Materiais e Métodos	37
3.1 Caracterização da amostra	37
3.1.1 Seleção da amostra	37
3.1.2 Coleta de sangue	37
3.2 Desenho experimental	37
3.2.1 Medidas antropométricas	38
3.2.1.1 Índice de Massa Corpóreo (IMC)	38
3.2.1.2 Mensuração da circunferência da cintura e quadril	38
3.2.1.3 Índice de massa corpóreo inverso (iIMC)	39

3.2.2 Análises bioquímicas	39
3.2.2.1 Glicose	39
3.2.2.2 Triglicérido	39
3.2.2.3 Colesterol total	40
3.2.2.4 HDL Colesterol	40
3.2.2.5 LDL Colesterol	40
3.2.2.6 VLDL Colesterol	40
3.2.2.7 Proteína C reativa	41
3.2.2.8 Hemoglobina glicada	41
3.2.3 Prevalência de comorbidades nos obesos	41
3.2.3.1 Síndrome metabólica	41
3.2.3.2 Hipertensão	42
3.2.3.3 Diabetes mellitus tipo 2.....	42
3.2.4 Análises genéticas	42
3.2.4.1 Extração de DNA.....	42
3.2.4.2 Desenho de oligonucleotídeos	43
3.2.4.3 Estratégias de rastreamento	43
3.2.5 Análises bioestatísticas	47
4 Resultados	48
4.1 Descrição da amostra	48
4.2 Análise genética	53
4.2.1 Gene <i>ADIPOQ</i>	53
4.2.1.1 Polimorfismo rs17366568 (c.-8-387G>A).....	53
4.2.1.2 Polimorfismo rs182052 (c.-60+244G>A).....	60
4.2.1.3 Análise haplotípica entre os polimorfismos do gene <i>ADIPOQ</i>	71
4.2.2 Gene <i>RARRES2</i>	72
4.2.2.1 Polimorfismo rs17173608 (c.280-494T>G).....	72
4.2.2.2 Polimorfismo rs4721 (c.515+281T>G)	81

4.2.2.3 Haplótipos entre os polimorfismos do gene <i>RARRES2</i>	89
4.2.3 Gene <i>PGC1-α</i>	90
4.2.3.1 Polimorfismo rs8192678 (c.+1564G>A)	90
4.2.3.2 Polimorfismo rs3736265 (c.+1835G>A)	101
4.2.3.3 Haplótipos entre os polimorfismos do gene <i>PGC1-α</i>	112
4.2.3 Gene <i>FNDC5</i>	113
4.2.4.1 Influência do polimorfismo rs113173936 (c.185-54A>G) nos parâmetros estudados	116
4.2.4.2 Influência do polimorfismo rs72882318 (c.275-63A>G) nos parâmetros estudados	117
4.2.4.3 Haplótipos entre os polimorfismos do gene <i>FNDC5</i>	119
5 Discussão	120
5.1 Gene <i>ADIPOQ</i>	120
5.2 Gene <i>RARRES2</i>	124
5.3 Gene <i>PGC1-α</i>	128
5.4 Gene <i>FNDC5</i>	134
6 Conclusões	136
7 Referências Bibliográficas	138
8 Apêndice – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	151

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Fatores que influenciam o desenvolvimento da obesidade. A obesidade é resultado da ação de fatores ambientais (falta de exercício, ingestão de alimentos calóricos e culturais) e genéticos (predisposição).....	2
Figura 2: Microscopia óptica da estrutura interna do tecido adiposo marrom. A imagem mostra as gotículas lipídicas encontradas em adipócitos do tecido adiposo marrom.	4
Figura 3: Microscopia eletrônica de transmissão da estrutura interna do tecido adiposo branco. A imagem mostra um adipócito com sua gotícula lipídica.	6
Figura 4: Funções do tecido adiposo branco. Com relação ao estoque de energia, o adipócito através do metabolismo do lipídeo, pode estocar triglicerídeo (alimentado) ou catabolizar este lipídeo e liberá-lo na forma de glicerol e ácidos graxos. Além disso, esta célula pode secretar adipocinas e responder a elas; e a outros sinais provenientes de outros tecidos, regulando o metabolismo do corpo.	7
Figura 5: Processos que o adipócito pode sofrer que aumentam a massa do tecido adiposo, levando à obesidade.....	8
Figura 6: Prevalência da obesidade mundial.	9
Figura 7: Prevalência da obesidade no Brasil no período de 1975 – 2009.	10
Figura 8: Ilustração evidenciando a distribuição da gordura corporal.	12
Figura 9: Diagrama delineando como o balanço energético positivo pode levar a resistência à insulina e DT2.	16
Figura 10: Estrutura da adiponectina humana. Os números representam a posição de início de cada aminoácidos nas estruturas que compõe a adiponectina.	19
Figura 11: Estrutura dos receptores AdipoR1 e AdipoR2. Estes apresentam uma estrutura altamente relacionada e uma similaridade de 67,5% da sequência de aminoácidos. Ambas são proteínas integrais de membrana com sete domínios transmembrânicos.	20
Figura 12: Mudanças no tecido adiposo, fígado e músculo esquelético e associação à resistência à insulina. O tecido adiposo de indivíduos normais apresentam poucos macrófagos e secretam uma quantidade relativamente alta de adiponectina e poucas citocinas inflamatórias. A β oxidação de lipídeos é alta, e há pouca gordura ectópica no fígado e no músculo. Nos obesos e resistentes à insulina, o tecido adiposo contém muitos macrófagos e o tecido secreta uma grande quantidade de adipocinas e pouca adiponectina. Quando o tecido adiposo chega ao limite de estoque de triglicerídeos, junto com o processo pró-inflamatório, acarreta no acúmulo de lipídeos em locais não adiposos. AG – ácidos graxos.....	22
Figura 13: Hipótese da adiponectina na resistência à insulina, SM e aterosclerose. A redução dos níveis de adiponectina pode ser causada pela interação de polimorfismos no gene <i>ADIPOQ</i> que produzem uma baixa síntese desta adipocina, juntamente com balanceamento energético positivo que causa a obesidade. Esta redução apresenta um papel importante no desenvolvimento da resistência à	

insulina, DT2 e SM que indiretamente causam aterosclerose. Além disso, a redução nos níveis de adiponectina apresenta um papel direto no risco de desenvolver aterosclerose.	23
Figura 14: Mapa genômico do gene <i>ADIPOQ</i> com a localização de polimorfismos. Os boxes representam éxons, sendo que parte preta corresponde à região traduzida do gene.	24
Figura 15: Clivagem proteolítica da quemerina	25
Figura 16: O papel da quemerina e CMKLR1 na biologia do tecido adiposo. A quemerina e seu receptor são altamente expressos no tecido adiposo (etapa 1). A proquemerina é secretada e rapidamente clivada por serino proteases extracelulares (etapa 2). Esta adipocina e o seu receptor são necessários para a diferenciação dos adipócitos (etapa 3) e modulam a expressão de genes relacionados ao metabolismo de glicose e lipídeos no tecido adiposo (etapa 4). Além disso, a quemerina secretada pode atuar no recrutamento de células que expressam CMKLR1 (ex. macrófagos) para o tecido (etapa 5). Para finalizar, alterações nesta adipocina e/ou no seu receptor podem causar consequências na homeostasia do metabolismo de glicose e lipídeo a nível sistêmico.	27
Figura 17: Organização do gene <i>PGC1A</i> . Os éxons são representados por caixas pretas e a hachurada retrata a região 3'UTR. O ATG é o sítio de iniciação e o TAA de terminação.	28
Figura 18: Estrutura do PGC1- α e domínios usados para interagir com proteínas.....	29
Figura 19: Comparação da sequência de aminoácidos entre diferentes proteínas do PGC1- α . Estas sequências foram obtidas a partir da ferramenta de bioinformática (Blast) do banco de dados NCBI. Os aminoácidos glicina (G) e serina (S) são indicados com a caixa e seta.	31
Figura 20: Alinhamento da sequência de aminoácidos entre diferentes proteínas do PGC1- α . A comparação destas sequências foi realizada através da ferramenta de bioinformática ClustalW. A variação do aminoácido da posição 612 da proteína é mostrada em negrito e sublinhada. Bt, <i>Bos taurus</i> ; Hs, <i>Homo sapiens</i> ; Mn, <i>Mus musculus</i> ; Rn, <i>Rattus norvegicus</i> ; Ss, <i>Sus scrofa</i>	31
Figura 21: Os exercícios induzem a produção do regulador transcricional PGC1- α no miócito esquelético, que por sua vez impulsiona a produção da proteína de membrana FNDC5, que será clivada e secretada como irisina. Este hormônio ativa programas termogênicos no tecido adiposo branco, resultando na produção de calor e gasto de energia.....	33
Figura 22: Estrutura da FNDC5 e da irisina.....	34
Figura 23: Organização do gene <i>FNDC5</i> . Os éxons são representados por caixas vermelhas totalmente preenchidas e as caixas abertas retratam as regiões 5'UTR e 3'UTR.....	35
Figura 24: Esquema do desenho experimental do estudo	38
Figura 25: Gráfico Multicomponente do polimorfismo rs17366568 do gene <i>ADIPOQ</i> . O eixo y representa a fluorescência do fluoróforo e o eixo x o número de ciclos. A curva em azul é o fluoróforo FAM ligado a uma sonda que se anela ao alelo G, o verde é o fluoróforo VIC que se anela ao alelo A e o vermelho é o fluoróforo ROX, que é a referência passiva. No gráfico A, observa-se um aumento apenas da fluorescência FAM, representando um indivíduo homocigoto selvagem (GG). No gráfico B, houve um aumento apenas da fluorescência VIC, representando um indivíduo homocigoto mutado (AA). E no gráfico C, ambos os fluoróforos tiveram um aumento de fluorescência, representando uma amostra heterocigota (GA).	53

- Figura 26:** Gráfico de discriminação alélica do polimorfismo rs17366568 do gene *ADIPOQ*. Os círculos em azul representam os indivíduos homocigotos selvagens (GG), os verdes heterocigotos (AG) e em vermelho os homocigotos mutados (AA). O X representa uma amostra que não teve amplificação e o quadrado o controle negativo da reação.....54
- Figura 27:** Gráficos de multicomponentes do polimorfismo rs182052 do gene *ADIPOQ*. O fluoróforo FAM (azul) detecta o alelo selvagem (G), o VIC o alelo mutado (A) e o ROX é a referência passiva. A) homocigoto selvagem (GG), B) homocigoto mutado (AA) e C) heterocigoto (GA).....60
- Figura 28:** Gráfico de discriminação alélica do polimorfismo rs182052 do gene *ADIPOQ*. Os pontos em azul representam indivíduos homocigotos selvagens (GG), os em verde são heterocigotos (GA) e os vermelhos são homocigotos mutados (AA). O X representa uma amostra que não teve amplificação e o quadrado o controle negativo da reação.61
- Figura 29:** Gráficos multicomponentes dos resultados obtidos pela análise do polimorfismo rs17173608 do gene *RARRES2*. O fluoróforo FAM (azul) detecta o alelo T, o VIC o alelo G e o ROX é a referência passiva. A) homocigoto selvagem (TT), B) homocigoto mutado (GG) e C) heterocigoto (TG).72
- Figura 30:** Gráfico de Discriminação Alélica do polimorfismo rs17173608 do gene *RARRES2*. Cada círculo representa o genótipo de um indivíduo. Todos os círculos azuis são indivíduos homocigotos selvagens (TT), os verdes são os heterocigotos (TG) e os vermelhos são os homocigotos mutados (GG). O x representa indivíduos que não amplificaram corretamente, não conseguindo ser analisados pelo programa; o quadrado preto é o controle negativo.73
- Figura 31:** Gráficos Multicomponentes do polimorfismo rs4721 do gene *RARRES2*. O eixo y representa a fluorescência do fluoróforo e o eixo x o número de ciclos. A curva azul é o aumento de fluorescência FAM, que está ligado a uma sonda que anela ao alelo T e o verde é o aumento da fluorescência VIC que está ligado a uma sonda complementar ao alelo G. O gráfico A representa um homocigoto selvagem (TT), o B um homocigoto mutado (GG) e o C representa um heterocigoto (TG).81
- Figura 32:** Gráfico de Discriminação Alélica do polimorfismo rs4721 do gene *RARRES2*. Os círculos representam indivíduos e cada “cluster” de uma cor representa os genótipos deles. O “cluster” com círculos azuis são os homocigotos selvagens (TT), os com verde são os heterocigotos (TG) e os com vermelho são os homocigotos mutados (GG). O quadrado é o controle negativo.82
- Figura 33:** Gráficos Multicomponentes do polimorfismo rs8192678 do gene *PGC1A*. O eixo y indica a fluorescência do fluoróforo e o eixo x o número de ciclos. A curva verde indica a fluorescência do VIC, que está ligado a uma sonda que anela ao alelo G (selvagem) e a azul é a fluorescência do FAM que está acoplado a uma sonda complementar ao alelo A (mutado). O gráfico A representa um homocigoto selvagem (GG), o B um homocigoto mutado (AA) e o C representa um heterocigoto (GA).90
- Figura 34:** Gráfico de Discriminação Alélica do polimorfismo rs8192678 do gene *PGC1A*. O “cluster” com círculos azuis representa os indivíduos homocigotos mutados (AA), o com círculos verdes indica os heterocigotos (GA) e o com círculos vermelhos são os homocigotos selvagens (GG).91

Figura 35: Gráficos Multicomponentes do polimorfismo rs3736265 do gene *PGCIA*. O eixo y indica a fluorescência do fluoróforo e o eixo x o número de ciclos. A curva verde indica a fluorescência do VIC, que está ligado a uma sonda que anela ao alelo G (selvagem) e a azul é a fluorescência do FAM que está acoplado a uma sonda complementar ao alelo A (mutado). O gráfico A representa um homocigoto selvagem (GG), o B um homocigoto mutado (AA) e o C representa um heterocigoto (GA).101

Figura 36: Gráfico de Discriminação Alélica polimorfismo rs3736265 do gene *PGCIA*. O “cluster” com círculos azuis representa os indivíduos homocigotos selvagens (GG), o com círculos verdes indica os heterocigotos (GA) e o com círculos vermelhos são os homocigotos mutados (AA). O quadrado representa o controle negativo e o X são amostras que não amplificaram.102

Figura 37: Eletroferogramas dos polimorfismos do gene *FNDC5* identificados neste estudo.....113

Figura 38: Distribuição da frequência mundial do polimorfismo rs8192678 do gene *PGCIA*. A frequência do aminoácido serina codificado pelo alelo mutado (A) em cada população está indicada em preto. WSN, Samoa ocidental; TON, Tonga; COK, Ilha Cook; MRI, Maori.129

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Classificação do Índice de Massa Corpóreo	11
Tabela 2: Pontos de corte e risco de complicações metabólicas.....	12
Tabela 3: Risco de distúrbios metabólicos de acordo com a combinação do IMC e circunferência da cintura	13
Tabela 4: Critérios da NCEP/ATPIII.....	42
Tabela 5: Informações sobre os “primers” do gene <i>FNDC5</i>	43
Tabela 6: Informações sobre as sondas usadas nos experimentos	44
Tabela 7: Condições de ciclagem do gene <i>FNDC5</i>	46
Tabela 8: Parâmetros antropométricos, níveis pressóricos e bioquímicos.	49
Tabela 9: Características clínicas da amostra	50
Tabela 10: Parâmetros antropométricos, níveis pressóricos e bioquímicos entre os graus de obesidade.	51
Tabela 11: Características clínicas da amostra de obesos	52
Tabela 12: Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo rs17366568 do gene <i>ADIPOQ</i> e associação à obesidade.....	55
Tabela 13: Variáveis antropométricas e hemodinâmicas em relação ao polimorfismo rs17366568 do gene <i>ADIPOQ</i> na amostra total.	56
Tabela 14: Diferença entre as variáveis em relação ao polimorfismo rs17366568 do gene <i>ADIPOQ</i> no grupo de eutróficos.	57
Tabela 15: Diferença entre as variáveis em relação ao polimorfismo rs17366568 do gene <i>ADIPOQ</i> no grupo de obesos.	58
Tabela 16: Análise da influência do polimorfismo rs17366568 do gene <i>ADIPOQ</i> na presença das características clínicas da amostra.	59
Tabela 17: Frequências genotípicas, alélicas e associação à obesidade do polimorfismo rs182052 do gene <i>ADIPOQ</i>	62
Tabela 18: Diferença entre as variáveis em relação ao polimorfismo rs182052 do gene <i>ADIPOQ</i> na amostra total.	63
Tabela 19: Diferença entre as variáveis em relação ao polimorfismo rs182052 do gene <i>ADIPOQ</i> na amostra de eutróficos.	65
Tabela 20: Diferença entre as variáveis em relação ao polimorfismo rs182052 do gene <i>ADIPOQ</i> na amostra de obesos.	67

Tabela 21: Variáveis em relação ao polimorfismo rs182052 do gene <i>ADIPOQ</i> na amostra de obesos mórbidos.....	68
Tabela 22: Influência do polimorfismo rs182052 do gene <i>ADIPOQ</i> prevalência das comorbidades da amostra de obesos.	70
Tabela 23: Frequências haplotípicas e associação à obesidade dos polimorfismos rs17366568 e rs182052 do gene <i>ADIPOQ</i>	71
Tabela 24: Análise de fator de risco dos haplótipos do gene <i>ADIPOQ</i>	72
Tabela 25: Frequência genotípica, alélica e associação do polimorfismo rs17173608 do gene <i>RARRES2</i> à obesidade.	73
Tabela 26: Variação dos parâmetros antropométricos, pressóricos e bioquímicos em relação ao polimorfismo rs17173608 do gene <i>RARRES2</i> na amostra total.....	74
Tabela 27: Diferença dos parâmetros antropométricos, pressóricos e bioquímicos em relação ao polimorfismo rs17173608 do gene <i>RARRES2</i> na amostra de eutróficos.....	76
Tabela 28: Variação dos parâmetros antropométricos, pressóricos e bioquímicos em relação ao polimorfismo rs17173608 do gene <i>RARRES2</i> na amostra de obesos.	78
Tabela 29: Influência do polimorfismo rs17173608 do gene <i>RARRES2</i> no desenvolvimento das características clínicas da amostra.	80
Tabela 30: Frequência genotípica, alélica e associação do polimorfismo rs4721 do gene <i>RARRES2</i> à obesidade.....	83
Tabela 31: Variação dos parâmetros antropométricos, pressóricos e bioquímicos em relação ao polimorfismo rs4721 na amostra total.....	84
Tabela 32: Diferenças dos parâmetros antropométricos e hemodinâmicos em relação ao polimorfismo rs4721 do gene <i>RARRES2</i> nos eutróficos.....	86
Tabela 33: Parâmetros antropométricos e hemodinâmicos em relação ao polimorfismo rs4721 do gene <i>RARRES2</i> na amostra de obesos.	87
Tabela 34: Associação do polimorfismo rs4721 do gene <i>RARRES2</i> com as características clínicas da amostra.	88
Tabela 35: Análise do fator de risco dos obesos desenvolverem diabetes com relação.....	89
Tabela 36: Frequências haplotípicas dos polimorfismos rs17173608 e rs4721 do gene <i>RARRES2</i> e associação à obesidade.	90
Tabela 37: Frequência genotípica, alélica e associação do polimorfismo rs8192678 do gene <i>PGCIA</i> ao fenótipo de obesidade.	92
Tabela 38: Diferenças dos parâmetros antropométricos e hemodinâmicos em relação ao polimorfismo rs8192678 do gene <i>PGCIA</i> na amostra total.....	93

Tabela 39: Variações nos parâmetros antropométricos, pressóricos e bioquímicos em relação ao polimorfismo rs8192678 do gene <i>PGCIA</i> nos eutróficos.....	96
Tabela 40: Variação entre os fatores quantitativos em relação ao polimorfismo rs8192678 do gene <i>PGCIA</i> no grupo de obesos.....	98
Tabela 41: Correlação do polimorfismo rs8192678 do gene <i>PGCIA</i> na prevalência de DT2, hipertensão e SM nos obesos.....	100
Tabela 42: Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo rs3736265 do gene <i>PGCIA</i> e associação ao fenótipo de obesidade.....	103
Tabela 43: Organização das variáveis antropométricas e hemodinâmicas em relação ao polimorfismo rs3736265 do gene <i>PGCIA</i> na amostra total.....	104
Tabela 44: Variações antropométricas e hemodinâmicas em relação ao polimorfismo rs3736265 do gene <i>PGCIA</i> em eutróficos.....	107
Tabela 45: Variações antropométricas e hemodinâmicas em relação ao polimorfismo rs3736265 do gene <i>PGCIA</i> em obesos.....	109
Tabela 46: Correlação do polimorfismo rs3736265 do gene <i>PGCIA</i> na prevalência de DT2, SM e hipertensão em obesos.....	111
Tabela 47: Frequências haplotípicas polimorfismos rs8192678 e rs3736265 do gene <i>PGCIA</i> e associação à obesidade.....	112
Tabela 48: Análise de fator de risco dos haplótipos do gene <i>PGCIA</i>	112
Tabela 49: Informações genéticas dos polimorfismos do gene <i>FNDC5</i>	114
Tabela 50: Frequências genotípicas e alélicas do gene <i>FNDC5</i> e associação ao fenótipo de obesidade.....	115
Tabela 51: Variáveis em relação ao polimorfismo rs113173936 do gene <i>FNDC5</i> na amostra de obesos.....	116
Tabela 52: Variáveis em relação ao polimorfismo rs72882318 do gene <i>FNDC5</i> na amostra de obesos.....	118
Tabela 53: Frequências haplotípicas dos polimorfismos rs113173936 e rs72882318 no gene <i>FNDC5</i> e associação ao fenótipo obesidade.....	119
Tabela 54: Frequências alélicas do polimorfismo rs182052 do gene <i>ADIPOQ</i> em diferentes estudos.....	122
Tabela 55: Frequência das mutações encontradas do gene <i>FNDC5</i>	134

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Variação da circunferência do quadril em relação ao polimorfismo rs182052 do gene <i>ADIPOQ</i> na amostra total.....	64
Gráfico 2: Comportamento da circunferência abdominal em relação ao polimorfismo rs182052 do gene <i>ADIPOQ</i> na amostra de eutróficos.	66
Gráfico 3: Comportamento da circunferência do quadril em relação ao polimorfismo rs182052 do gene <i>ADIPOQ</i> na amostra de eutróficos.	66
Gráfico 4: Variação do peso nos obesos mórbidos em relação ao polimorfismo rs182052 do gene <i>ADIPOQ</i>	69
Gráfico 5: Comportamento do IMC em relação ao polimorfismo rs182052 do gene <i>ADIPOQ</i> nos obesos mórbidos.	69
Gráfico 6: Comportamento da razão cintura-quadril em relação ao polimorfismo rs17173608 do gene <i>RARRES2</i> na amostra total.	75
Gráfico 7: Comportamento da circunferência do quadril em relação ao polimorfismo rs17173608 do gene <i>RARRES2</i> nos eutróficos.	77
Gráfico 8: Variação dos níveis de glicose em relação ao polimorfismo rs17173608 do gene <i>RARRES2</i> nos eutróficos.....	77
Gráfico 9: Comportamento da razão cintura/quadril em relação ao polimorfismo rs17173608 do gene <i>RARRES2</i> nos obesos.	79
Gráfico 10: Variação do índice de massa corpóreo invertido em relação ao polimorfismo rs17173608 do gene <i>RARRES2</i> nos obesos.	79
Gráfico 11: Variações nas medianas da pressão arterial sistólica em relação ao polimorfismo rs4721 do gene <i>RARRES2</i> na amostra total.	85
Gráfico 12: Influência do polimorfismo rs8192678 do gene <i>PGCIA</i> na pressão arterial diastólica na amostra total.	94
Gráfico 13: Influência do polimorfismo rs8192678 do gene <i>PGCIA</i> na variação do colesterol total na amostra total.	94
Gráfico 14: Influência do polimorfismo rs8192678 do gene <i>PGCIA</i> nas diferenças do LDL colesterol na amostra total.....	95
Gráfico 15: Comportamento do peso em relação ao polimorfismo rs8192678 do gene <i>PGCIA</i> nos eutróficos.....	97
Gráfico 16: Variação da pressão arterial diastólica em relação ao polimorfismo rs8192678 do gene <i>PGCIA</i> nos obesos.....	99

Gráfico 17: Comportamento da circunferência abdominal em relação ao polimorfismo rs3736265 do gene <i>PGC1A</i> na amostra total.....	105
Gráfico 18: Variação da razão cintura/quadril em relação aos genótipos do polimorfismo rs3736265 do gene <i>PGC1A</i> na amostra total.....	105
Gráfico 19: Comportamento do índice de massa corpóreo inverso em relação ao polimorfismo rs3736265 do gene <i>PGC1A</i> na amostra total.....	106
Gráfico 20: Comportamento da razão cintura/quadril em relação ao polimorfismo rs3736265 do gene <i>PGC1A</i> nos eutróficos.....	108
Gráfico 21: Variação dos níveis de VDL colesterol em relação ao polimorfismo rs3736265 do gene <i>PGC1A</i> na amostra de obesos.....	110
Gráfico 22: Variação dos níveis de triglicédeos em relação ao polimorfismo rs3736265 do gene <i>PGC1A</i> na amostra de obesos.....	110
Gráfico 23: Influência do polimorfismo rs113173936 do gene <i>FNDC5</i> nas diferenças da PAD no grupo de obesos.	117
Gráfico 24: Relação dos níveis de VDL colesterol com os genótipos do polimorfismo rs72882318 do gene <i>FNDC5</i>	119

ÍNDICE DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATP – Adenosina trifosfato

ADIPOQ – Adiponectina

AG – Ácidos graxos

AMPK – Proteína quinase ativada por AMP

CA- Circunferência abdominal

CQ- Circunferência do quadril

DT2 – Diabetes mellitus tipo 2

GWA – “Genome Wide Association”

LEP – Leptina

LEPR – Receptor de Leptina

NCBI - National Center for Biotechnology Information

MC4R – Receptor 4 da melanocortina

mtDNA- DNA mitocondrial

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCG1- α - Coativador do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma γ e α

PPAR- α – Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma alfa

RARRES2 – Respondedor do receptor do ácido retinóico 2

RCQ- Razão cintura-quadril

SM – Síndrome metabólica

SNA – Sistema nervoso autônomo

SNP – Polimorfismo de nucleotídeo único

TAB – Tecido adiposo branco

TAM – Tecido adiposo marrom

Tfam - Fator de transcrição mitocondrial A

TIG2 – Gene indutor de tazarotene 2

UCP-1 – Proteína desacopladora 1

1 Introdução

Nas últimas décadas a prevalência da obesidade vem aumentando em vários países ao redor do mundo. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde, existem mais de um bilhão de adultos com sobrepeso, e pelo menos 500 milhões de obesos, o que caracteriza a obesidade como um grave problema atual, acometendo países desenvolvidos e em desenvolvimento. Esse aumento de peso da população emergiu como um dos mais proeminentes problemas de saúde pública, acarretando custos significativos no setor (CUMMINGS & SCHWARTZ, 2003). No Brasil, cerca de 1,5 bilhões de reais por ano são gastos no tratamento da obesidade, abrangendo internações hospitalares, consultas médicas e medicamentos. Desse valor, 600 milhões são provenientes do governo, via Sistema Único de Saúde, representando 12% do orçamento gasto com todas as outras doenças (LEITE *et al.*, 2009).

O aumento de peso da população é devido às rápidas mudanças que vêm ocorrendo no cotidiano, como a ingestão de uma dieta hipercalórica e o aumento do sedentarismo, que resulta no desequilíbrio da homeostasia corporal (GOTTLIEB *et al.*, 2008). A contínua ingestão de alimentos calóricos, superior ao gasto energético acarreta no acúmulo de gordura do tecido adiposo branco (TAB) resultando na obesidade (KHANDEKAR *et al.*, 2011).

Apesar de estereótipos populares que retratam a obesidade como um problema de comportamento de gula e fraca força de vontade, há evidências incontestáveis que os fatores genéticos desempenham um papel importante na determinação do peso corporal dentro de um determinado ambiente (CUMMINGS & SCHWARTZ *et al.*, 2003). Estudos mostram que não são todas as pessoas que vivem em um ambiente obesogênico que desenvolvem estas patologias, o que destaca a multifatorialidade da condição. O aumento de peso surge através de ações conjuntas dos fatores ambientais e genéticos (Figura 1), em particular naqueles que já são geneticamente predispostos (HENNEMAN *et al.*, 2010; LOOS, 2009). Ademais, estudos realizados com famílias e gêmeos demonstram que fatores genéticos contribuem com 40-70% da variação interindividual na susceptibilidade de desenvolver obesidade (LOOS, 2009), enquanto que o ambiente contribui apenas com cerca de 30% (BELL *et al.*, 2005).

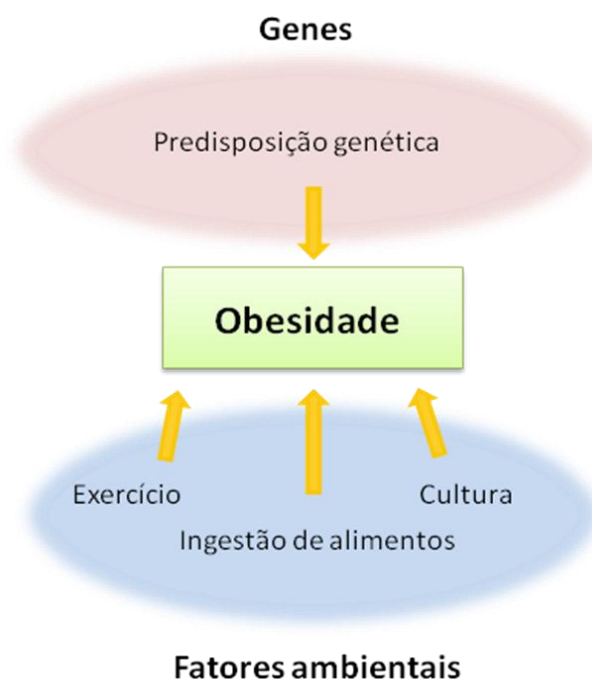


Figura 1: Fatores que influenciam o desenvolvimento da obesidade. A obesidade é resultado da ação de fatores ambientais (falta de exercício, ingestão de alimentos calóricos e culturais) e genéticos (predisposição).

Fonte: Adaptado de Kolpman, 2000 pp.638

O aumento da adiposidade corporal é acompanhado por uma profunda mudança na função fisiológica do corpo (KOLPMAN, 2000). A obesidade afeta a saúde de várias maneiras e é classificada como um dos cinco fatores de risco que vem aumentando a mortalidade (WHO, 2013). O aumento da prevalência desta patogênese é acompanhado de um número crescente de pacientes com complicações metabólicas (GRUNDY, 2000). Segundo a OMS, aproximadamente 44% da diabetes mellitus tipo 2 (DT2), 23% da doença isquêmica do coração e entre 7 – 41% dos cânceres são atribuídos ao excesso de peso (WHO, 2013). Em paralelo, observações clínicas demonstram que não são todos os obesos que desenvolvem estes problemas, sugerindo não ser um efeito direto da quantidade absoluta de gordura acumulada. Muitos pacientes obesos são metabolicamente saudáveis, apesar do grande acúmulo de gordura, enquanto outros que são apenas moderadamente obesos desenvolvem as doenças. Portanto, há indícios de que a expansão do tecido adiposo possa ser um fator importante para determinar as complicações metabólicas associadas à obesidade, no entanto, outros fatores podem estar modulando o desenvolvimento destas comorbidades (MEDINA-GOMEZ *et al.*, 2007).

O TAB é um órgão endócrino que secreta uma variedade de peptídeos ativados (adipocinas) e é responsável por coordenar uma variedade de processos metabólicos. Nas condições de obesidade estas adipocinas podem ser encontradas desreguladas (aumentadas ou

diminuídas), podendo ocasionar desordens no metabolismo, resultando na resistência à insulina e em fisiopatologias associadas, como a hipertensão, DT2, síndrome metabólica (SM), dislipidemia, aterosclerose, síndrome do ovário policístico, doenças cardiovasculares e certos tipos de câncer. As mudanças nos níveis destas adipocinas são o resultado de alterações na transcrição, bem como nos mecanismos pós-traducionais, que podem afetar a liberação de proteínas específicas (DENG & SCHERER, 2010). Além disso, tem sido sugerido que mutações genéticas que afetem o desenvolvimento e/ou a função do tecido adiposo são o suficiente para resultar nestas desordens metabólicas, sugerindo uma interação destas vias (O'RAHILLY, 2009).

Muitos genes estão associados com a obesidade humana ou suas complicações no metabolismo (KOPELMAN, 2000). Os estudos de genes candidatos à predisposição estão relacionados com a regulação da fome, o balanço energético, metabolismo do lipídio e glicose; e diferenciação do adipócito (DAS, 2010; MÜSSIG *et al.*, 2009). Análises destes genes têm ajudado a aumentar o conhecimento sobre as bases dos mecanismos energéticos e sobre os fatores genéticos que predisõem o desenvolvimento destas patologias. Entre os genes que podem estar associados, estão o *ADIPOQ*, *RARRES2*, *PGC1A* e *FNDC5* que são responsáveis pela codificação das adipocinas e miocinas, envolvidas na regulação de diversas vias metabólicas e variações genéticas que afetam a sua função e eficiência, podem contribuir para vários fatores fisiopatológicos.

Analisar as correlações entre polimorfismos destes genes e o desenvolvimento da obesidade, assim como as desordens no metabolismo, são as principais finalidades deste estudo.

1.1 Tecido Adiposo – Amigo ou inimigo?

O tecido adiposo está cada vez mais sendo estudado por contribuir tanto para o bem estar do ser humano, como para os processos de doença (HASSAN *et al.*, 2012). Este tecido é formado por diversos tipos de células, entre elas, os pré-adipócitos (precursoras), adipócitos, células endoteliais, fibroblastos, linfócitos, neutrófilos, macrófagos e algumas células-tronco mesenquimais, que podem se desenvolver em células de diversas linhagens celulares (miócitos, condrócitos, osteoblastos e adipócitos). Os adipócitos correspondem a 70% da massa total e provêm das células-tronco mesenquimais multipotentes, residentes no estroma do tecido adiposo. Estas células mesenquimais se desenvolvem em adipoblasto e depois em células pré-adiposas, perdendo a capacidade de se tornar outra linhagem mesenquimal (CUSI, 2012; QUEIROZ *et al.*, 2009). Estudos sugerem que dependendo do estímulo que essas células recebam, podem se

desenvolver em adipócitos brancos ou marrons, sendo os últimos extremamente escassos nos adultos (RÀFOLS, 2014). A maturação depende de um sistema complexo de sinais para que se tornem células maduras e possam realizar suas funções. Nesta fase acumulam gotas lipídicas e a habilidade de responder a hormônios, como a insulina (CUSI, 2012; QUEIROZ *et al.*, 2009).

Nos organismos, os lipídeos se armazenam em dois tipos de tecido adiposo: tecido adiposo marrom (TAM), que também pode ser chamado de multilocular; e o tecido adiposo branco (TAB), também denominado unilocular.

O TAM surgiu tardiamente na escala evolutiva, sendo encontrado apenas nos mamíferos. Em humanos encontramos este tecido principalmente no feto e em recém-nascido, estando localizado a nível axilar, cervical, perirrenal e periadrenal, mas sua presença diminui rapidamente após o nascimento (RÀFOLS, 2014). Em adultos são encontrados nas regiões paracervical, supraclavicular e paravertebral. O TAM maduro possui diversas gotículas lipídicas (Figura 2) e tem função termogênica, tendo um número grande de mitocôndrias nas células para realizar seu papel (DENG & SCHERER, 2010). Ele utiliza a energia química dos lipídeos e da glicose para produzir calor (sem tremor), através da via mitocondrial de fosforilação oxidativa de ácidos graxos mediados pela expressão tecido específica, da proteína de desacoplamento 1 (UCP1). Assim como o TAB, o TAM também pode afetar o metabolismo do corpo e a sua ativação pode levar a novas abordagens como a perda de peso e o aumento da sensibilidade à insulina (HASSAN *et al.*, 2012).

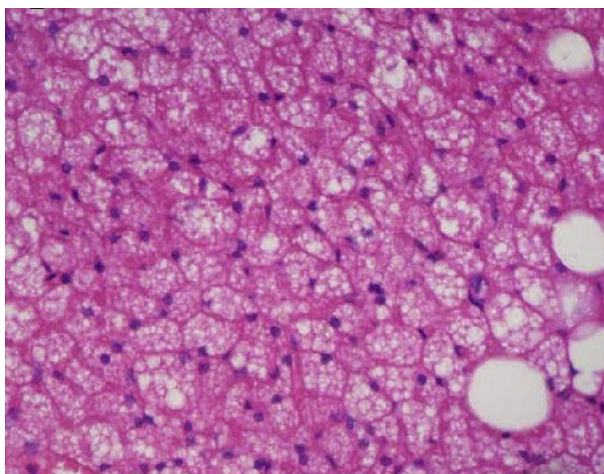


Figura 2: Microscopia óptica da estrutura interna do tecido adiposo marrom. A imagem mostra as gotículas lipídicas encontradas em adipócitos do tecido adiposo marrom.

Fonte: Ràfols, 2014 Pp. 7

Recentemente, foi descoberto um tecido metabolicamente ativo com respostas de termogênese similares ao TAM, entretanto localizadas no TAB, sendo sugerido que existem dois tipos de adipócitos marrons, conhecidos como adipócitos marrons clássicos e as “células beges” (ou “células adiposas marrons recrutáveis”) (LIDELL *et al.*, 2013). Estas células beges são semelhantes às células adiposas brancas, pois tem uma baixa expressão basal de UCP1. Entretanto, elas respondem a estimulação do cAMP com uma alta expressão dos genes *UCPI* e aumento nas taxas de respiração, alcançando níveis similares observados no TAM interescapular. Assim, essas células tem a capacidade de trocar entre os fenótipos de estoque de energia por dissipação energética, diferente das outras células adiposas. Dessa forma, elas são reconhecidas como intercalantes entre os adipócitos marrons e brancos (HASSAN *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2012).

O TAB constitui o principal componente do tecido adiposo do corpo e está localizado periféricamente na região subcutânea (sob a pele) e visceral (ao redor dos órgãos) (LEITE *et al.*, 2009). Este tecido também pode ser encontrado em muitas outras regiões, como no espaço retro-orbital (GESTA *et al.*, 2007). O seu adipócito maduro é caracterizado por ter um vacúolo de gordura que pode ocupar 90% do volume da célula, fazendo com que a mesma seja morfológicamente única e facilmente distinguível (Figura 3) (SÁNCHEZ *et al.*, 2010). Este tecido é o principal armazenador de energia do organismo e também atua como um isolante térmico e protege outros órgãos de danos por impactos mecânicos (HASSAN *et al.*, 2012). Quando o corpo tem excesso de energia e/ou diminuição do gasto energético (balanceamento positivo), este excedente é depositado no TAB na forma de triglicerídeo. Por outro lado, se há escassez de ingestão energética e/ou aumento de gasto de energia (balanceamento negativo), os depósitos de lipídeos são liberados em forma de ácido graxo (AG) e glicerol que através da corrente sanguínea são transportados para outros tecidos, onde são usados como substratos para a geração de energia, através da fosforilação oxidativa da adenosina trifosfato - ATP (RÀFOLS, 2014; RAUCI *et al.*, 2013).

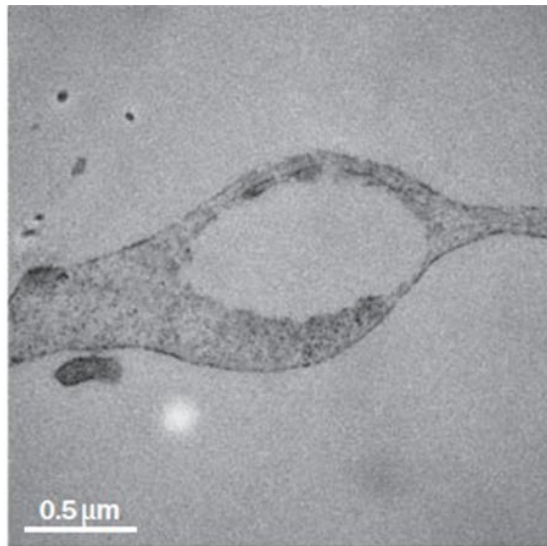


Figura 3: Microscopia eletrônica de transmissão da estrutura interna do tecido adiposo branco. A imagem mostra um adipócito com sua gotícula lipídica.

Fonte: Adaptado de Hassan *et al.*, 2012 Pp. 694

O TAB era reconhecido apenas por estocar triglicérido, sendo o seu adipócito o principal responsável pelo armazenamento dos lipídeos (DENG & SCHERER, 2010). Atualmente estas células são reconhecidas por terem papel de secretoras, fazendo com que o tecido adiposo desempenhe também a função de órgão endócrino (Figura 4). Este tecido expressa e/ou secreta, exclusivamente ou não, uma variedade de peptídeos ativados, os quais atuam localmente de forma autócrina ou parácrina e também podem atuar a nível sistêmico (endócrino) (KERSHAW & FLIER, 2004). Essas substâncias bioativas são conhecidas como adipocitocinas, quando as proteínas secretadas pelo adipócito são citocinas ou atuam como tais; e também podem ser denominadas adipocinas, que englobam todas as proteínas ou peptídeos secretados pelos adipócitos, independente do grupo funcional (TRAYHURN & WOOD, 2007). Em adição a esses sinalizadores, o tecido adiposo, também expressa uma variedade de receptores que permitem responder a sinais provenientes de outras partes do corpo, como os do sistema nervoso central e dos sistemas hormonais. Essa maquinaria permite a comunicação deste tecido com outros órgãos distantes, permitindo que coordene uma variedade de processos metabólicos em todo o corpo (KERSHAW & FLIER, 2004).

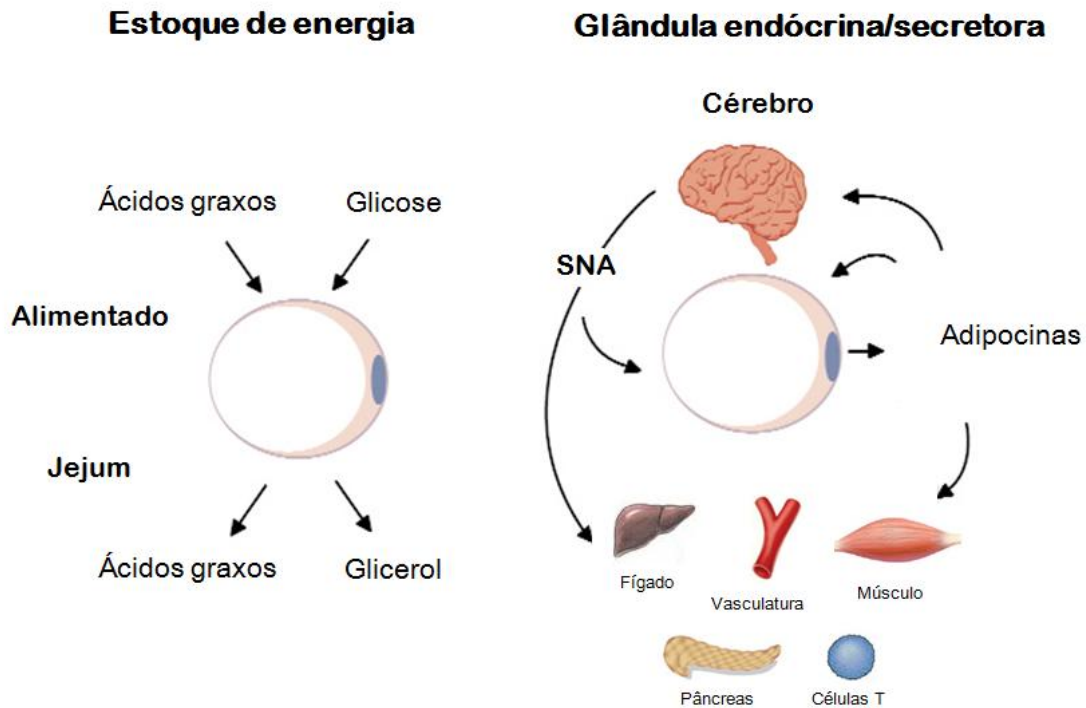


Figura 4: Funções do tecido adiposo branco. Com relação ao estoque de energia, o adipócito através do metabolismo do lipídeo, pode estocar triglicerídeo (alimentado) ou catabolizar este lipídeo e liberá-lo na forma de glicerol e ácidos graxos. Além disso, esta célula pode secretar adipocinas e responder a elas; e a outros sinais provenientes de outros tecidos, regulando o metabolismo do corpo.

Fonte: Adaptado de KAHN & FLIER 2000. Pp. 476

1.2 Obesidade – a pandemia do século 21

Desde o século 20, a sociedade vem passando por diversas transformações. Com o surgimento de novas tecnologias e a facilidade para a compra, aumentou a mecanização e a motorização. Além disso, a tecnologia fez com que diminuísse o tempo gasto para a alimentação e possibilitasse a comercialização de alimentos processados, com alto teor de gordura, com baixo custo, rapidamente consumíveis e de fácil disponibilidade em mercados e restaurantes “fast-foods” (UNGER, 2003; SWINBURN *et al.*, 2011). Essas mudanças fizeram com que se tivesse uma alimentação rica em lipídios saturados, açúcares e comidas mais refinadas; e também com que diminuísse os exercícios físicos, em virtude à automação dos afazeres básicos e à redução de se exercitar de forma espontânea e por lazer, com conseqüente aumento da vida sedentária (NAVES, 2007). Este quadro acarretou na ingestão de alimentos calóricos superior ao gasto energético, fazendo com que gordura seja depositada no TAB. Grandes quantidades de gordura disponíveis fazem com que aumente excessivamente a massa desse tecido, podendo resultar na

obesidade. Em humanos, a massa do tecido adiposo pode variar drasticamente, especialmente pelos adipócitos poderem aumentar o volume (hipertrofia) e o número destas células (hiperplasia) (Figura 5). O aumento do tamanho é reflexo do equilíbrio entre a lipogênese e a lipólise, enquanto que a quantidade dessas células é o reflexo entre a proliferação, a diferenciação dos pré-adipócitos e a apoptose dos adipócitos (RÀFOLS, 2014).

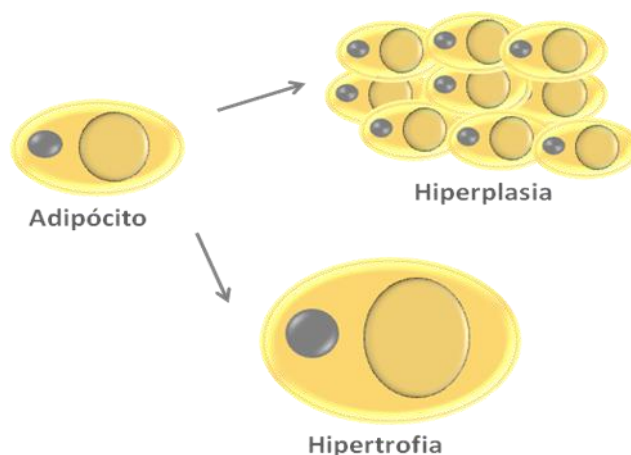


Figura 5: Processos que o adipócito pode sofrer que aumentam a massa do tecido adiposo, levando à obesidade.

1.3 Epidemiologia

A prevalência da obesidade mundial vem aumentando drasticamente nas últimas décadas, sendo atualmente encontrada em proporções epidêmicas (BASTIEN *et al.*, 2014). No período de 1980 a 2008, a prevalência da obesidade mundial dobrou e atualmente acredita-se que o aumento seja em torno de 75% desde esta época (WHO, 2013).

Até pouco tempo, a obesidade era considerada apenas um problema dos EUA e de países ocidentais, mas tem se tornado uma das maiores contribuidoras do desenvolvimento de doenças crônicas (MALIK *et al.*, 2013). Esse aumento de peso vem crescendo em diversos países, não apenas nos desenvolvidos, mas também nos com menos privilégios. No entanto, é observada uma grande variação na prevalência entre os países, sendo encontrada a maior taxa de obesos nas Ilhas do Pacífico, podendo chegar a 80% em algumas regiões, e a menor na Ásia, que tem como exemplo a Índia, onde menos de 1% da sua população é obesa. Nos países da América do Norte e Europa as taxas são geralmente altas, enquanto que nos da África e Oriente Médio são variáveis, como pode ser visto na figura 6 (NGUYEN *et al.*, 2010; WHO, 2013).

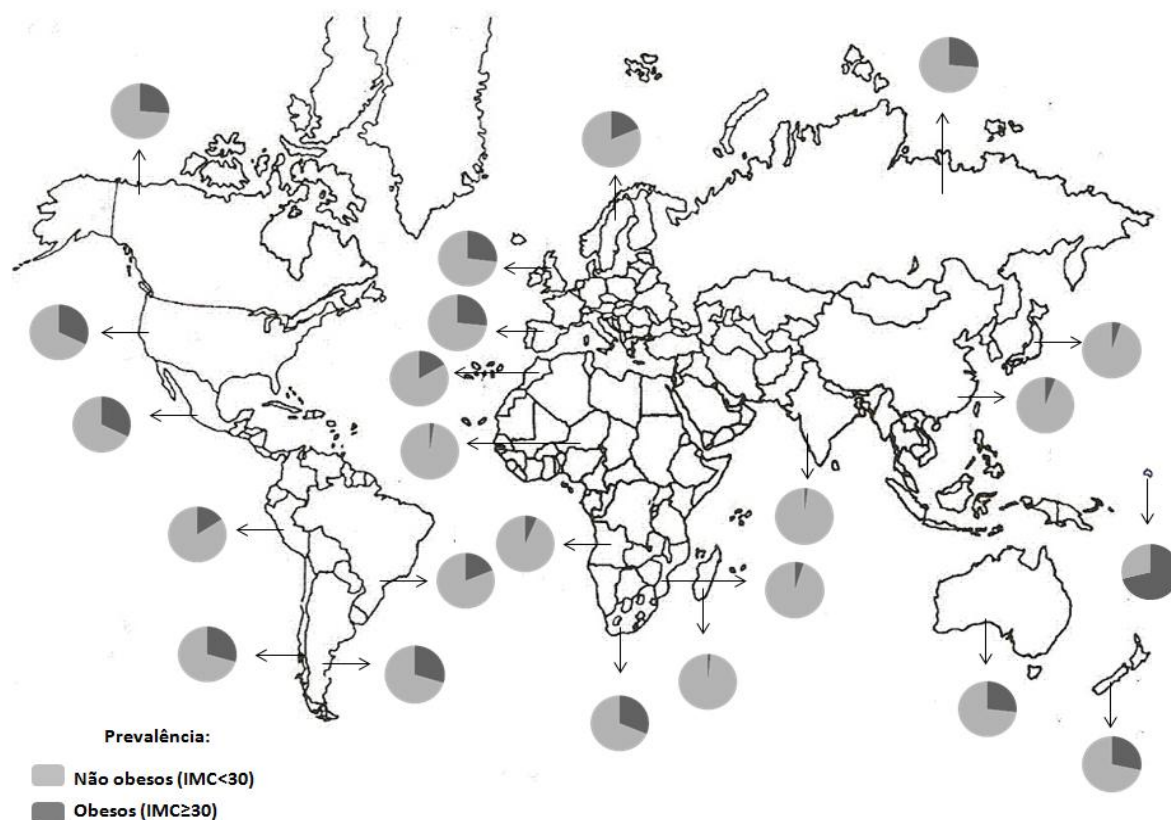


Figura 6: Prevalência da obesidade mundial.

Fonte: Adaptado de WHO, 2013

O estudo realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), pelo Ministério da Saúde e pelo Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição, mostrou um significativo aumento do número de obesos no país no período de 1975 a 2009 (Figura 7). Além disso, analisou-se a prevalência da obesidade de acordo com o gênero, sendo observado um aumento de 0,32% por ano para os homens e de 0,18% por ano para as mulheres (IBGE, 1982; 1992; 2004; MS, 2011). Segundo dados do Ministério da Saúde, o estudo antropométrico e nutricional realizado de 2008-2009, mostrou que o excesso de peso foi diagnosticado em cerca de metade dos homens e das mulheres, excedendo em 28 vezes a frequência do déficit de peso, no sexo masculino, e em 13 vezes, no sexo feminino.

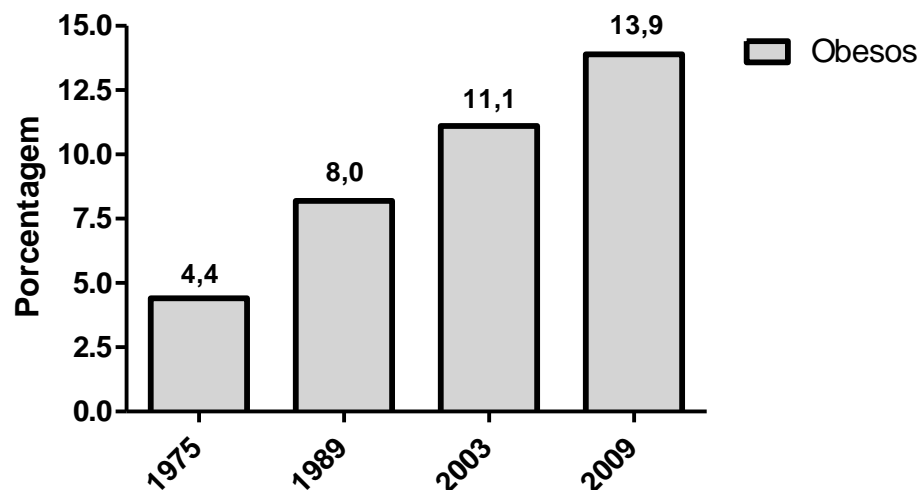


Figura 7: Prevalência da obesidade no Brasil no período de 1975 – 2009.

Fonte: IBGE, 1982; 1992; 2004; MS, 2011

Com relação à obesidade mórbida ($IMC \geq 40$), a sua prevalência mundial ainda não foi estimada. Mas, sabe-se que no Brasil, a prevalência é de 0,64% (SANTOS *et al.*, 2010), na Austrália é de 1,69% (PASCO *et al.*, 2013), na Escócia é de 2,7% (BROMLEY *et al.*, 2011), na Espanha é de 6,1% (BASTERRA-GORTARI *et al.*, 2011) e nos Estados Unidos a prevalência é ainda mais alta, sendo encontrada em 6,6% dos indivíduos adultos (STURM & HATOR, 2013). Uma estimativa linear mostra que a prevalência mundial da obesidade mórbida chegará a 9% em 2030 (FINKELSTEIN *et al.*, 2012).

1.4 Índices antropométricos e associações com as complicações metabólicas

A OMS utiliza o índice de massa corpóreo (IMC) como uma forma prática e de baixo custo para classificar a adiposidade dos adultos (Tabela 1). O IMC é calculado usando uma fórmula que combina o peso e a altura. A categorização baseada neste índice fornece valiosas informações sobre o aumento da adiposidade do corpo e tem sido muito utilizada em pesquisas clínicas e estudos epidemiológicos. Ela permite uma comparação significativa do status do peso dentro ou entre populações e a identificação de indivíduos ou grupos com risco de morbidade e mortalidade (KOLPMAN, 2000).

Tabela 1: Classificação do Índice de Massa Corpóreo

Classificação	IMC (Kg/m²)
Baixo peso	<18,50
Magreza grave	<16,00
Magreza moderada	16,00 – 16,99
Magreza leve	17,00 – 18,49
Peso normal	18,50 – 24,99
Sobrepeso	25,00 – 29,99
Obeso	≥30,00
Obeso classe I	30,00 – 34,99
Obeso classe II	35,00 – 39,99
Obeso classe III	≥40,00

*O IMC é calculado pela divisão do peso (quilogramas) pela estatura (metros) ao quadrado. Fonte: WHO, 2004

A Associação Americana do Coração (“The American Heart Association”) propôs subgrupos adicionais de obesos, em virtude do rápido crescimento de pacientes com obesidade maciça. Eles propuseram os obesos com classe IV (IMC ≥ 50 kg/m²) e classe V (IMC ≥ 60 kg/m²) (POIRIER *et al.*, 2009; POIRIER *et al.*, 2011).

Além da classificação do IMC, outras mensurações de dados antropométricos também têm sido muito utilizadas. Estes parâmetros agem de forma complementar a análise do IMC, uma vez que este índice de adiposidade é muito amplo e a distribuição da gordura no corpo pode influenciar na associação às desordens metabólicas (Figura 8) (WHO, 2008; GESTA *et al.*, 2007).

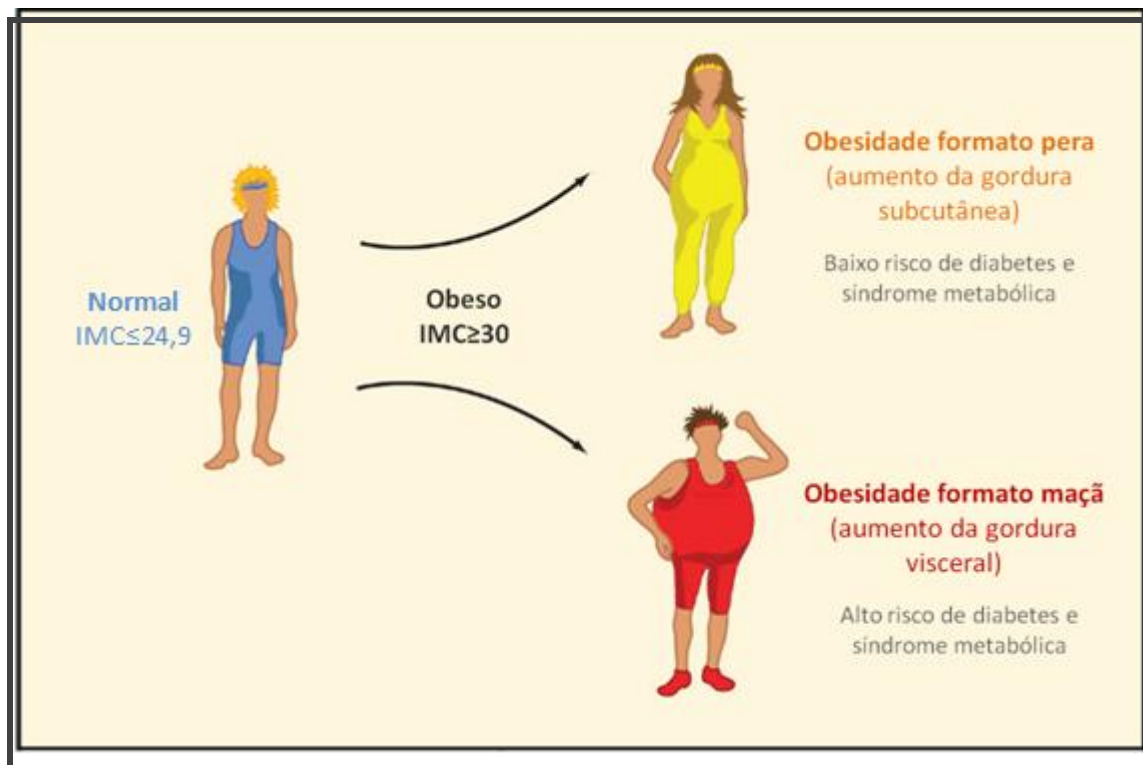


Figura 8: Ilustração evidenciando a distribuição da gordura corporal.

Fonte: Adaptado de GESTA *et al.*, 2007 pp. 243

A OMS, desde 1997, tem reconhecido a importância da massa de gordura abdominal no aumento do risco de sofrer um infarto no miocárdio, acidente vascular cerebral e morte prematura independente do IMC. Essas diferenças na composição corporal, ou seja, as quantidades relativas ou os tipos de gordura refletem na circunferência da cintura ou na medida da relação cintura-quadril (circunferência abdominal dividida pela circunferência do quadril) (WHO, 2008). As circunferências de risco são mostradas na tabela 2.

Tabela 2: Pontos de corte e risco de complicações metabólicas

Mensuração	Ponto de corte	Risco de complicações metabólicas
Circunferência da cintura	>94 cm (H); >88 cm (M)	Aumentado
Circunferência da quadril	>102 cm (H); >88 cm (M)	Substancialmente aumentado
Razão cintura/quadril	≥0.90 cm (H); ≥0.85 cm (M)	Substancialmente aumentado

H- homem/ M- mulher Fonte: WHO, 2008

Sendo estas mensurações usadas como uma forma de refinar a classificação do IMC e ao serem utilizadas juntas, permitem estabelecer um risco mais apurado para o desenvolvimento de anormalidades metabólicas, como a SM, DT2, hipertensão e doenças cardiovasculares (Tabela 3). Entretanto é importante compreender que estas associações são universais, e por mais que tenham sido estabelecidas para que fossem sensitivas ao risco de saúde de todas as populações, existem diferentes predisposições de cada grupo étnico ou população específica (WHO, 2008).

Tabela 3: Risco de distúrbios metabólicos de acordo com a combinação do IMC e circunferência da cintura

	Índice de Massa corporal (IMC)	Classe da obesidade	Risco de doença (em relação ao peso normal e a circunferência da cintura)	
			Homem<94cm Mulher<80cm	Homem>102 Mulher>88cm
Baixo peso	<18,5			
Normal	18,5 - 24,9			
Sobrepeso	25,0 - 29,9		Aumentado	Alto
Obeso	30,0 - 34,9	I	Alto	Muito alto
	35-39,9	II	Muito alto	Muito alto
Obeso extremo	>40	III	Extremamente alto	Extremamente alto

Fonte: WHO, 2008

1.5 Comorbidades

A obesidade tem sido reconhecida como uma condição que afeta o bem estar da pessoa (XIA & GRANT, 2013), por causar ou exacerbar muitos problemas de saúde, tanto de forma independente como associado a outras doenças (KOPELMAN, 2000). A primeira associação feita entre a obesidade e a susceptibilidade de desenvolver outras patologias foi realizada por um antigo físico da Grécia, conhecido como Hippocrates. Segundo sua observação: “Mortes repentinas são mais comuns em quem é naturalmente obeso do que em magros” (XIA & GRANT, 2013). Atualmente, se sabe que o peso excessivo não tem efeito apenas no social e psicológico, mas também numa significativa morbidade e morte prematura (BELL *et al.*, 2005). O aumento da prevalência da obesidade e a associação às comorbidades como a DT2, doenças

cardiovasculares e certas formas de câncer tem representado a maior ameaça à saúde pública mundial (RAMACHANDRAPPA & FAROOQI, 2011). Estudos epidemiológicos confirmam que o aumento de graus de sobrepeso e obesidade é um importante preditor da diminuição da longevidade, em virtude das profundas mudanças na função fisiológica (KOPELMAN, 2000). Algumas das modificações parecem estar associadas à hiperinsulinemia e principalmente a resistência à insulina, que ocorrem em uma grande parte dos obesos e que ao serem adquiridas iniciam uma cascata de mudanças metabólicas que podem desencadear em DT2, dislipidemia, hipertensão, hipercoagulação, eventuais doenças cardiovasculares, síndrome do ovário policístico e certas formas de câncer. Apesar de ser bem reconhecido que há uma relação entre o acúmulo de gordura e o risco de desenvolver doenças metabólicas crônicas, o processo ainda não foi totalmente elucidado (YANG & CHUANG, 2006).

Atualmente são propostos dois mecanismos (não exclusivos) para explicar como a expansão do tecido adiposo pode afetar a resistência à insulina. A primeira hipótese sugere que a acumulação excessiva de gordura é associada a um estado de inflamação crônica, que apresenta como perfil o aumento de produção de citocinas inflamatórias produzidas por adipócitos e/ou macrófagos infiltrados no tecido. Estas citocinas podem antagonizar a sinalização da insulina, causando uma desregulação no metabolismo (MEDINA-GOMEZ *et al.*, 2007). A segunda hipótese está correlacionada ao acúmulo de gordura no tecido adiposo e em órgãos não adiposos (VIRTUE & VIDAL-PUIG, 2010). A obesidade está associada à expansão do tecido adiposo (Figura 9), a qual é caracterizada pelo desequilíbrio da homeostase de AG celular, refletindo no maior acúmulo destes ácidos do que é requerido para processos anabólicos e catabólicos, sendo esta demasia de lipídeos estocada na forma de triglicerídeo. Os vacúolos de gordura dos adipócitos são dinâmicos e através das ações de hormônios podem-se aumentar ou diminuir a quantidade deste triglicerídeo (SCHAFFER, 2003). Dentre estes hormônios se destaca a insulina, que é produzida pelas células β encontradas no pâncreas e agem em vários tecidos periféricos, incluindo músculo esquelético, fígado e tecido adiposo, regulando a absorção da glicose e a concentração de ácidos graxos circulantes. No entanto, quando o tecido adiposo excede sua capacidade de expansão, ou seja, a capacidade de estocar triglicerídeo, leva a uma disfunção e modificação das células, que associado à liberação de mais adipocinas inflamatórias, acaba por desenvolver uma resistência à insulina. Esta resistência aumenta a lipólise e diminui a capacidade dos adipócitos absorverem lipídeos na circulação, o que origina no aumento dos AG e triglicerídeos na corrente sanguínea (SINGH *et al.*, 2009). Dessa forma, os lipídeos são redirecionados para tecidos periféricos ou órgãos, como as células β pancreáticas, fígado, coração e músculo esquelético, ocasionando a lipotoxicidade (GUILLET *et al.*, 2012), que é

causada pelo acúmulo de triglicérides em tecidos ectópicos e subsequente disfunção celular e/ou apoptose (CUSI, 2012).

A excessiva liberação de AG pelos adipócitos abdominais dentro da veia porta hepática faz com que eles atuem diretamente no fígado, afetando a absorção de insulina, o que contribui para uma inapropriada produção de glicose hepática (gliconeogênese) e diminuição da sua utilização, resultando na liberação deste açúcar. A redução hepática do “clearance” da insulina leva ao aumento sistemático da sua concentração (hiperinsulinemia), bem como da glicose (KOPELMAN, 2000).

O músculo esquelético é o maior sítio de captação e metabolização de glicose estimulada pela insulina. Entretanto, com o desenvolvimento da resistência à insulina, causada pelo excesso de armazenamento de triglicérido, o tecido passa a utilizar AG como fonte de energia, resultando num grande aumento de glicose no sangue (KOPELMAN, 2000).

Por sua vez, o pâncreas aumenta ainda mais produção de insulina (estado da hiperinsulinemia compensatória) com intuito de reestabelecer o equilíbrio do corpo. Com o aumento da concentração de AG, os indivíduos resistentes à insulina não podem continuar num estado de compensação de insulina, fazendo com que as células β diminuam a produção desse hormônio e a hiperglicemia prevaleça. Este processo estabelece um ciclo vicioso de hiperinsulinemia e hiperglicemia, com um papel crucial no desenvolvimento de DT2 (KOPELMAN, 2000; SILVEIRA *et al.*, 2011; ZECCHIN *et al.*, 2004).

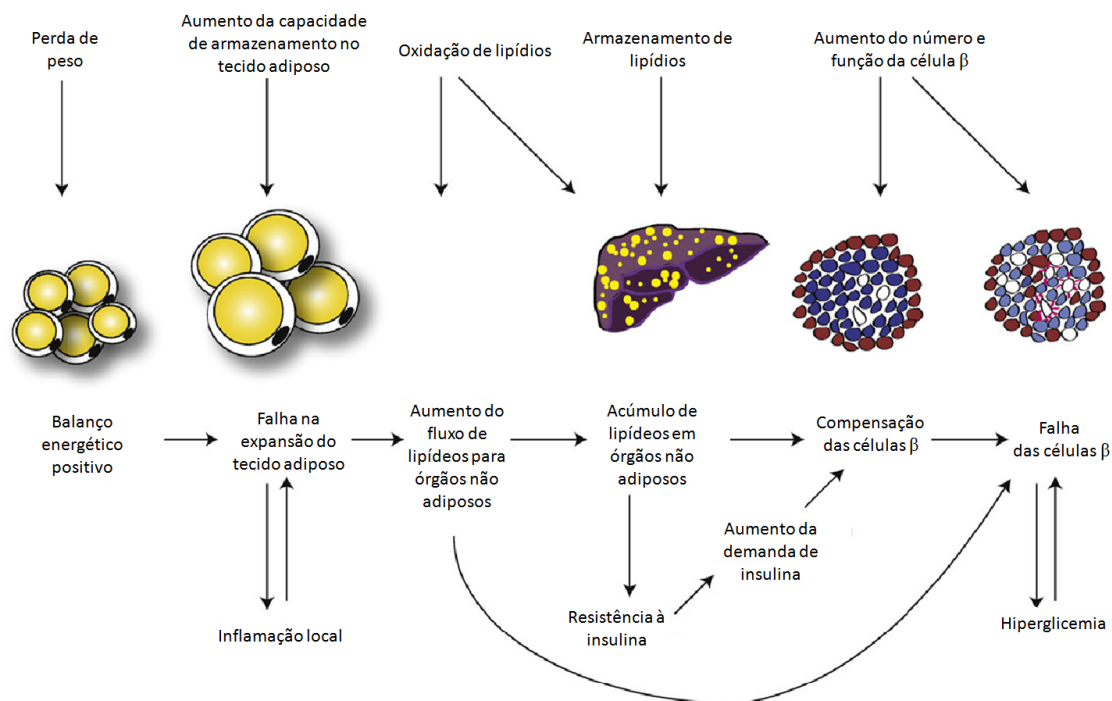


Figura 9: Diagrama delineando como o balanço energético positivo pode levar a resistência à insulina e DT2.

Fonte: Adaptado de Virtue & Vidal-Puig, 2010 pp. 345

Está claro que existe uma associação direta entre a massa do tecido adiposo e a sensibilidade à insulina. No entanto, alguns indivíduos magros se tornam resistentes à insulina, enquanto alguns muito obesos não apresentam esta resistência, destacando a multifatorialidade da condição. Mesmo entre os níveis populacionais a correlação da obesidade com a resistência à insulina pode variar, como ocorre nos asiáticos, nos quais IMC menores que dos caucasianos estão associados às complicações metabólicas (VIRTUE & VIDAL-PUIG, 2010). Ademais, segundo Yang & Chuang (2006), o risco de desenvolver DT2, hiperlipidemia e hipertensão também diferem mesmo entre indivíduos obesos. Aproximadamente 20% dos obesos tem sensibilidade à insulina e são metabolicamente normais (metabolicamente saudáveis), apesar de terem uma grande quantidade de gordura corporal. Em contraste, cerca de 20% dos indivíduos com IMC normal ou com sobrepeso leve, apresentam anormalidades metabólicas associadas a SM. Além disso, pacientes que sofrem com síndrome da lipoatrofia causada por fatores genéticos que afetam a adipogênese, geralmente tem uma disposição de lipídios em órgão não adiposo. Estes pacientes na maioria das vezes apresentam resistência à insulina e distorções no perfil metabólico, com o desenvolvimento de diabetes e altos níveis de triglicérido (REITMAN *et al.*, 2000).

Muitos fatores podem influenciar na capacidade do tecido adiposo se expandir, e estudos em modelos de camundongos e mutações em humanos existem para dar suporte a este conceito.

Estes modelos demonstram que os fatores genéticos podem limitar a expansão deste tecido, e em condições de balanço energético positivo (ingestão de alimentos maior que gasto energético), podem levar a resistência à insulina e diversas outras complicações metabólicas. Dentre os genes que podem estar associados com a expansão do tecido e conseqüentemente com o desenvolvimento de desordens no metabolismo, temos os relacionados à angiogênese, matriz extracelular, maturação do adipócito e codificadores de certas adipocinas, como leptina, adiponectina, resistina, quemerina, interleucina-6, entre outras (VIRTUE & VIDAL-PUIG, 2010).

1.6 Fatores genéticos associados à obesidade

Muitas hipóteses têm sido propostas para explicar a origem da epidemia da obesidade. Embora o impacto das mudanças no cotidiano tenham sido significantes, está claro que esta patologia tem um fundamento genético (WALLEY *et al.*, 2009). Diversas evidências têm apontado para este componente desempenhando um importante papel no risco de indivíduos se tornarem obesos, embora ainda não se saiba a magnitude desse risco (LOOS & BOUCHARD, 2003; XIA & GRANT, 2013).

Com as modificações no cotidiano, foi possível perceber que os indivíduos que vivem em ambientes “restritos” e evoluem para ambientes obesogênicos, como ocorreu em países industrializados, a maioria está propensa a ganhar peso. No entanto, aqueles com uma alta predisposição genética ganham mais peso, enquanto que aqueles resistentes ganham pouco ou nenhum peso, demonstrando que alguns indivíduos são mais propensos a ficarem mais pesados em ambientes obesogênicos que outros (LOOS & BOUCHARD, 2003).

Alguns estudos também têm demonstrado a importância destes fatores genéticos, como os dois experimentos realizados por Bouchard e colaboradores (1990 & 1994) com gêmeos idênticos. Eles selecionaram em dois trabalhos diferentes, 12 e 7 pares de gêmeos monozigóticos, sendo todos do sexo masculino, com uma faixa etária de 17-27 anos, que foram criados juntos e moraram juntos durante o tempo de recrutamento. Através de seus experimentos de aumento da ingestão calórica e indução as práticas de exercício físico, respectivamente, perceberam que a mudança do peso corpo, da composição corporal e a queima energética são mais similares entre os gêmeos idênticos do que os que apresentam diferentes características genéticas. Estes estudos com gêmeos sugerem que a obesidade e a adiposidade são fatores

herdáveis. E para que esta suposição fosse mais fortalecida, foram realizados estudos com indivíduos adotados, sendo outra maneira de confirmar a influência genética em humanos. O pesquisador Stunkard e seus colaboradores (1986) realizaram um projeto com 540 pessoas adotadas na Dinamarca, além de seus parentes biológicos e adotivos. Estes indivíduos adotados variavam desde magreza a obesidade mórbida, e foram divididos em quatro grupos de acordo com o IMC (magro, normal, sobrepeso e obeso). Através das análises, observaram uma clara relação entre o IMC dos parentes biológicos e dos adotados, mas não encontraram essa similaridade entre os pais adotivos, sugerindo que apenas os fatores ambientais têm pouco ou nenhum efeito na massa corporal. Desse modo, acredita-se que a adiposidade e o seu extremo variante, a obesidade, sejam resultados a partir de algum tipo de interação gene-ambiente não agindo independente um do outro (SORENSEN *et al.*, 1998). Nesse sentido, a susceptibilidade a esta patologia é em parte determinada pelos fatores genéticos, mas o ambiente obesogênico é necessário para a expressão desse fenótipo (LOOS & BOUCHARD, 2003).

Outro indício da contribuição genética é a existência de formas graves de obesidade monogênica, ou seja, causada por alterações em um único gene. Mutações raras nos genes codificadores das proteínas reguladoras da ingestão de alimentos, tais como a leptina (LEP) (MONTAGUE *et al.*, 1997), o receptor da leptina (LEPR) (CLÉMENT *et al.*, 1998), e o receptor 4 da melanocortina (MC4R) (FAROOQI *et al.*, 2000) foram sugeridos como responsáveis pela obesidade mórbida no início da infância. Estas mutações resultam em proteínas truncadas que ocasionam a diminuição ou a perda da função da proteína (LOOS & BOUCHARD, 2003), resultando na desregulação da via energética em humanos que associada à uma hiperfagia descontrolada, acarreta um grande aumento de peso (RAMACHANDRAPPA & FAROOQI, 2011). Os indivíduos afetados por estas formas raras correspondem apenas a uma mínima fração dos obesos da população, não podendo explicar a magnitude do problema da obesidade que a população em geral vem enfrentando (CLÉMENT & FERRÉ, 2003; WALLEY *et al.*, 2009). A forma comum da obesidade, ao contrário da monogênica, é multifatorial e abrange uma natureza poligênica, sem um padrão de herança mendeliana simples (WALLEY *et al.*, 2009). Diversos estudos de "Genome Wide Association" (GWA) utilizando metodologia caso-controle têm descrito possíveis loci candidatos à obesidade e ao consequente desenvolvimento de patologias associadas (WALLEY *et al.*, 2009; XIA & GRANT, 2013).

Atualmente existem mais de 120 genes candidatos, sendo estes envolvidos na massa do corpo, na gordura corporal ou na distribuição da gordura, enquanto outros contribuem potencialmente para regulação do gasto energético; controle de apetite e da sinalização autócrina e parácrina dos adipócitos; partição dos nutrientes no corpo; metabolismo dos lipídeos, glicose e

do tecido adiposo (LOOS & BOUCHARD, 2003; DAS, 2010; MÜSSIG *et al.*, 2009; BELL *et al.*, 2005; KOLPMAN, 2000). Adicionalmente, existem evidências que variações genéticas comuns ou polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) em genes candidatos tenham um papel importante na epidemia da obesidade. Estes SNPs apresentam modestos efeitos na susceptibilidade individual para formas comuns desta patologia, mas devido às altas frequências, eles podem ter uma grande contribuição para a obesidade a nível populacional (NGUYEN *et al.*, 2010). Desta forma, os últimos objetivos das pesquisas têm sido identificar genes envolvidos nas múltiplas faces da obesidade e subsequentemente as mutações que tem implicações funcionais (LOOS & BOUCHARD, 2003).

1.7 Genes candidatos

1.7.1 – Gene *ADIPOQ*

O gene *ADIPOQ* está localizado no cromossomo 3q27, possui uma extensão de 16kb e contém 3 éxons, que codificam a proteína plasmática com 244 aminoácidos (30 kDa), denominada adiponectina (HENNEMAN *et al.*, 2010; VENDRAMINI *et al.*, 2010). Esta proteína apresenta a sua estrutura formada por uma sequência sinal na região NH₃-terminal seguida por um domínio hipervariável (sem homologia com outras espécies), um domínio de colágeno e um domínio globular na região COOH-terminal (Figura 10) (CHANDRAN *et al.*, 2003).

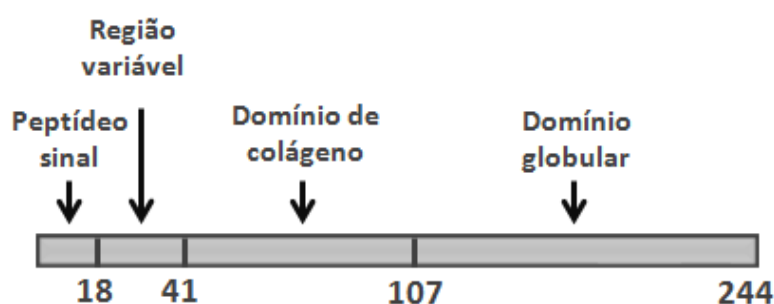


Figura 10: Estrutura da adiponectina humana. Os números representam a posição de início de cada aminoácidos nas estruturas que compõe a adiponectina.

Fonte: Adaptado de SHENG & YANG, 2008. Pp. 322

Esta proteína secretada exclusivamente pelo tecido adiposo está presente em altas concentrações no plasma com diversas isoformas e se liga aos receptores da adiponectina (AdipoR) 1 e 2 (Figura 11). O AdipoR1 é expresso no músculo esquelético e em outros tecidos,

enquanto que o AdipoR2 é expresso abundantemente no fígado (HENNEMAN *et al.*, 2010; KADOWAKI *et al.*, 2006). O AdipoR1 desempenha seu papel principalmente pela ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK), enquanto que o AdipoR2 sinaliza principalmente para os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma alfa (PPAR α) (MARRA & BERTOLANI, 2008), no entanto o inverso também pode ocorrer (CHANDRAN *et al.*, 2003). Desta forma, a adiponectina age em numerosos tecidos, regulando o metabolismo da glicose e lipídeos, por aumentar a absorção da glicose e a oxidação da gordura no músculo esquelético e no fígado, além de diminuir a produção de glicose hepática. Esta adipocina em níveis normais exerce um efeito de sensibilidade à insulina no tecido adiposo, no fígado e no músculo esquelético, por reduzir a produção de glicose e diminuir os níveis de triglicerídeos nestes tecidos (KHANDEKAR *et al.*, 2011; RABE *et al.*, 2008). Além disso, segundo Qi e colaboradores (2004) esta proteína também atua no cérebro estimulando o gasto energético.

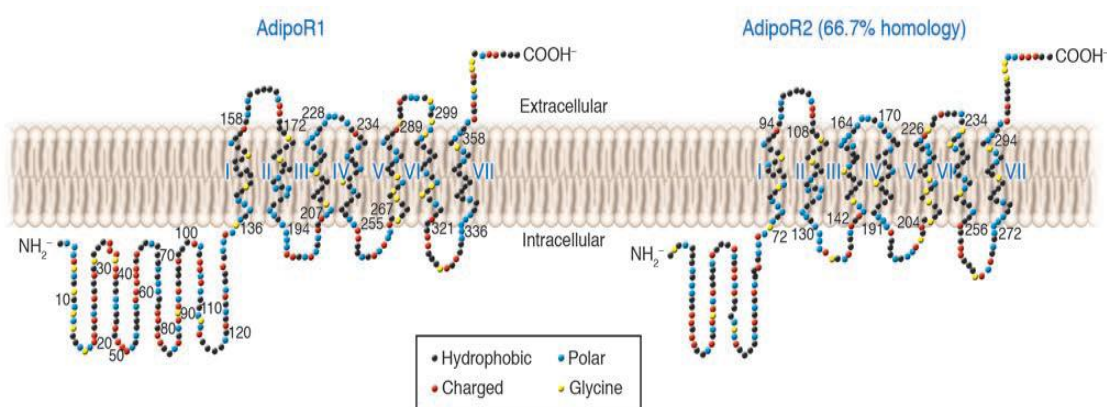


Figura 11: Estrutura dos receptores AdipoR1 e AdipoR2. Estes apresentam uma estrutura altamente relacionada e uma similaridade de 67,5% da sequência de aminoácidos. Ambas são proteínas integrais de membrana com sete domínios transmembrânicos.

Fonte: KADOWAKI *et al.*, 2006. Pp 1787

A adiponectina é a proteína secretada mais abundante do tecido adiposo (KHANDEKAR *et al.*, 2011; KONDO *et al.*, 2002), tendo um papel benéfico no metabolismo do corpo e um efeito de proteção contra muitas doenças crônicas (DENG & SCHERER, 2010). Ela apresenta propriedades anti-inflamatórias e antiaterogênicas que estão associadas à obesidade (LEU *et al.*, 2011). Estas características anti-inflamatórias são devido ao aumento da síntese molecular de citocinas, como a IL-10, diminuição da produção de TNF- α e IL-6 e inibição da ativação do NF- κ B (KUKLA *et al.*, 2011). Com relação às atividades antiaterogênicas, a diminuição de TNF- α , inibe a expressão de moléculas de adesão das células endoteliais

vasculares diminuindo a migração e proliferação de células imunes e a formação de placas ateroscleróticas (SANCHEZ *et al.*, 2010; VÀZQUEZ-VELA *et al.*, 2008). Assim sendo, a adiponectina traz efeitos favoráveis em tecidos alvos, entretanto a sua secreção e a presença de seus receptores estão em níveis reduzidos em animais e humanos obesos, produzindo efeitos deletérios, como a acumulação ectópica de lipídeos (Figura 12). Em humanos, os níveis plasmáticos de adiponectina também são inversamente proporcionais nos indivíduos que apresentam resistência à insulina, DT2 e SM (DEFOORT *et al.*, 2010; HENNEMAN *et al.*, 2010; HUNG *et al.*, 2008; VÀZQUEZ-VELA *et al.*, 2008). Também observou-se que a diminuição do peso em indivíduos obesos foi acompanhada do aumento da concentração desta adipocina no plasma (KUBOTA *et al.*, 2007). Em adição a essas observações clínicas, camundongos “knockout” para o gene *AdipoQ* apresentaram hipertensão, hipertrigliceridemia e hiperglicemia, que são algumas das características da SM (KUBOTA *et al.*, 2002). Todas essas evidências sugerem que pode existir alguma correlação entre o nível plasmático da adiponectina e o desenvolvimento destas desordens metabólicas (LEU *et al.*, 2011).

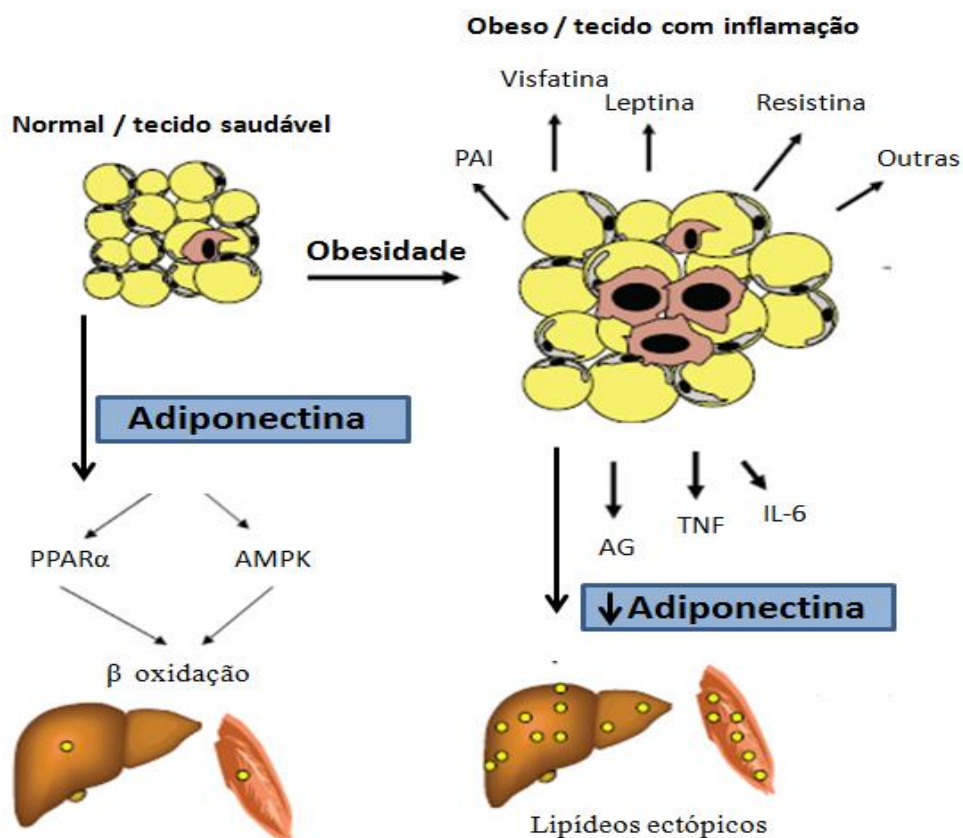


Figura 12: Mudanças no tecido adiposo, fígado e músculo esquelético e associação à resistência à insulina. O tecido adiposo de indivíduos normais apresentam poucos macrófagos e secretam uma quantidade relativamente alta de adiponectina e poucas citocinas inflamatórias. A β oxidação de lipídeos é alta, e há pouca gordura ectópica no fígado e no músculo. Nos obesos e resistentes à insulina, o tecido adiposo contém muitos macrófagos e o tecido secreta uma grande quantidade de adipocinas e pouca adiponectina. Quando o tecido adiposo chega ao limite de estoque de triglicérides, junto com o processo pró-inflamatório, acarreta no acúmulo de lipídeos em locais não adiposos. AG – ácidos graxos.

Fonte: Adaptado de RASOULI & KERN, 2008 pp. 569

Estudos têm demonstrado que os níveis individuais desse hormônio podem variar de acordo com a presença de determinados polimorfismos no gene *ADIPOQ*, sugerindo que esses níveis circulantes desta proteína podem ser hereditários e conseqüentemente o desenvolvimento de certas patologias (HENNEMAN *et al.*, 2010). Este fato é corroborado por Kondo e colaboradores (2002) que demonstraram que os polimorfismos genéticos no gene da adiponectina que resultam numa baixa produção e/ou secreção desse hormônio, possuem uma associação à SM. Além disso, estudos mais recentes também encontraram uma associação à resistência a insulina, obesidade e DT2 (BREITFELD *et al.*, 2012). Esta possível associação dos níveis de adiponectina e o desenvolvimento de desordens metabólicas podem ser vistas na figura 13.

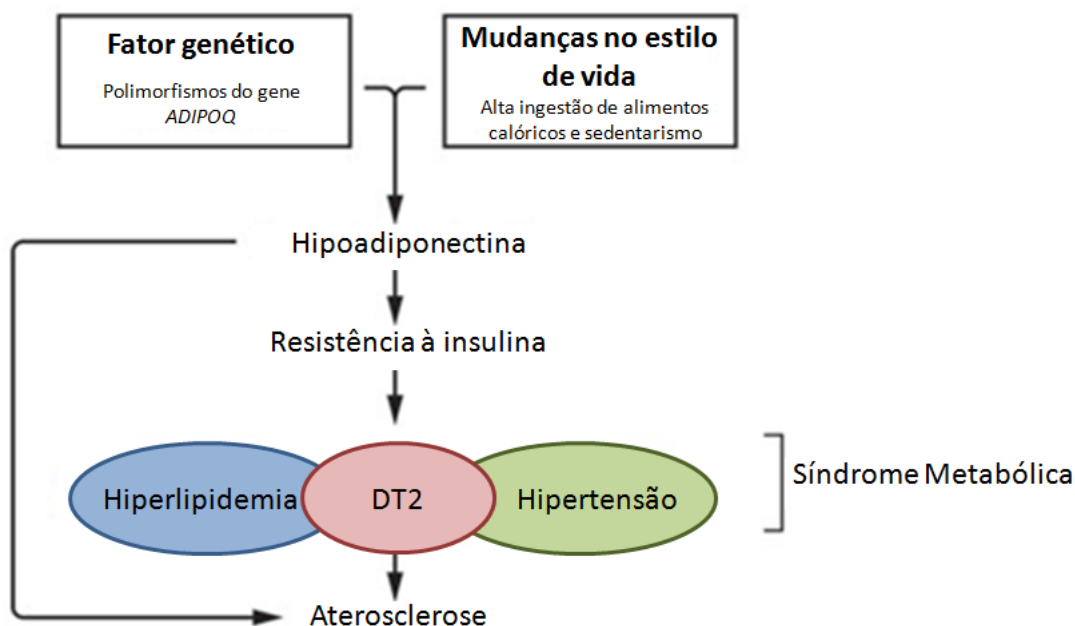


Figura 13: Hipótese da adiponectina na resistência à insulina, SM e aterosclerose. A redução dos níveis de adiponectina pode ser causada pela interação de polimorfismos no gene *ADIPOQ* que produzem uma baixa síntese desta adipocina, juntamente com balanceamento energético positivo que causa a obesidade. Esta redução apresenta um papel importante no desenvolvimento da resistência à insulina, DT2 e SM que indiretamente causam aterosclerose. Além disso, a redução nos níveis de adiponectina apresenta um papel direto no risco de desenvolver aterosclerose.

Fonte: Adaptado de Kadowaki *et al.*, 2006

De acordo com o HapMap database, já foram descritos mais de 100 SNP no gene *ADIPOQ*, sendo 21 com variações raras (frequência do menor alelo <5%). Com base nos SNP descritos, o presente estudo analisou o polimorfismo rs17366568 (c.-8-387G>A), que é a troca do nucleotídeo guanina por adenina e o polimorfismo rs182052 (c.-60+244G>A), que é a troca de uma guanina por adenina, ambos localizados no íntron 1 (Figura 14) (HIVERT *et al.*, 2008). Embora os íntrons sejam regiões não codificadoras de proteínas, o primeiro íntron do gene *ADIPOQ* contém um elemento “enhancer” da expressão do gene, no qual a proteína de ligação ao potencializador denominada CCAAT, que é o maior fator de transcrição da adiponectina, se liga para aumentar a atividade do promotor do gene (QIAO *et al.*, 2005). As evidências que estas variações genéticas podem modular os níveis de adiponectina parecem estar relacionadas a alterações metabólicas, como por exemplo, a resistência à insulina. No entanto, as ações dos polimorfismos no risco de obesidade e doenças relacionadas têm resultados distintos em algumas populações (BREITFELD *et al.*, 2012).

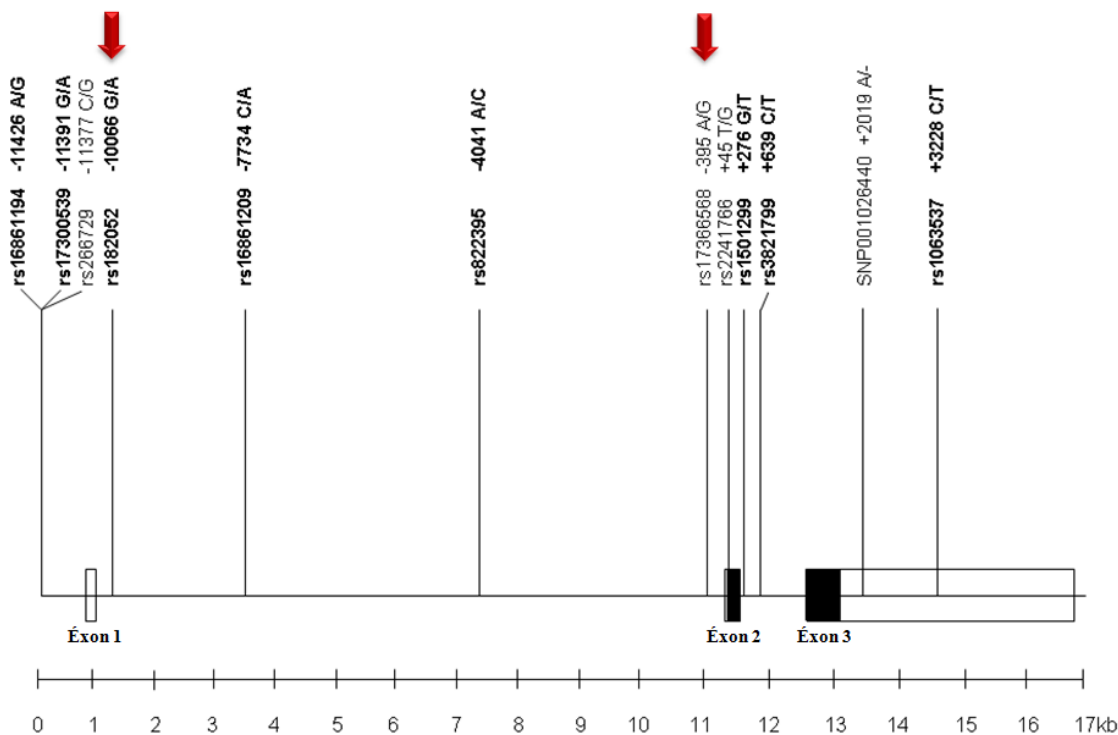


Figura 14: Mapa genômico do gene *ADIPOQ* com a localização de polimorfismos. Os boxes representam éxons, sendo que parte preta corresponde à região traduzida do gene.

Fonte: KYRIAKOU *et al.*, 2008

1.7.2 Gene *RARRES2*

O gene *respondedor do receptor do ácido retinóico 2 (RARRES2)* está localizado no cromossomo 7q36.1, e também é conhecido como *gene indutor da tazarotene 2 (TIG2)* (MÜSSIG *et al.*, 2009). O gene possui 6 éxons, mas a codificação da proteína inicia no segundo e termina no quinto. Este gene codifica uma pré-proquermerina (18kDa) que existe na forma precursora com 163 aminoácidos e é secretada pela clivagem proteolítica do peptídeo sinal na extremidade N-terminal, resultando na proquermerina (16kDa) com 143 aminoácidos. Esta proquermerina tem baixa atividade biológica e requer o processamento da região C-terminal por serino proteases para tornar-se a quemerina (Figura 15), que apresenta alta atividade biológica (GORALSKI *et al.*, 2007; BOZAOGLU *et al.*, 2010; ERNST & SINAL, 2010). Esta proteína foi recentemente descrita como uma adipocina, cujo papel original era de quimioatraentes de células imunes (BOZAOGLU *et al.*, 2007). Ela é altamente expressa no fígado e no tecido adiposo branco (visceral e subcutâneo), mas também pode ser encontrada no coração, ovário,

pulmões e rins (ROMAN *et al.*, 2012). Nos dias atuais se sabe que no tecido adiposo branco, a quemerina é expressa predominantemente pelos adipócitos, mas também pode ser sintetizada por outras células do estroma vascular (BOZAOGLU *et al.*, 2007). Quando a quemerina está ativada, se liga ao receptor acoplado a proteína G CMKLR1 (ou ChemR23) expresso nas células dendríticas, macrófagos ativados, neutrófilos, células de natural killer e no tecido adiposo (principalmente durante a diferenciação dos adipócitos), podendo também ser encontrado em baixos níveis nos ossos, pulmões, cérebro, coração e placenta (BOZAOGLU *et al.*, 2007; ROMAN *et al.*, 2012). Este fato sugere que o tecido adiposo branco é fonte primária de produção da quemerina e também é alvo autócrino/parácrino desta adipocina através da ligação ao receptor CMKLR1 (GORALSKI *et al.*, 2007).

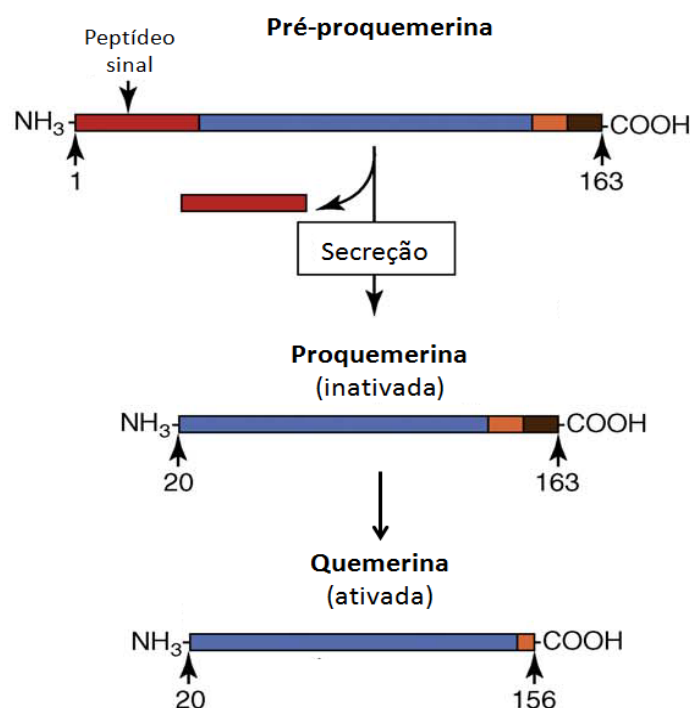


Figura 15: Clivagem proteolítica da quemerina

Fonte: ERNST & SINAL, 2010 pp.661

A quemerina tem funções na resposta imune (inata e adquirida) por ser responsável pela quimiotaxia de pré-linfócitos B, macrófagos, células dendríticas e células de natural killer, ambas imaturas. Interessantemente, as células dendríticas e as células de natural killer ao se tornarem maduras perdem a expressão do receptor CMKLR1, sugerindo que a quemerina tem um papel importante no recrutamento dos leucócitos na fase inicial da inflamação (ROMAN *et al.*, 2012). Além disso, foi demonstrada que esta proteína promove o acoplamento do macrófago com as proteínas da matriz extracelular e com as moléculas de adesão, facilitando a aderência do

macrófago ao endotélio vascular e conseqüentemente a entrada nos tecidos (ZABEL *et al.*, 2006). No entanto, a quemerina também aumenta a secreção da adiponectina e inibe a síntese de mediadores pró-inflamatórios, como o TNF- α e IL-6, o que acaba exercendo um efeito de proteção aos danos causados pela inflamação nos tecidos afetados. Estas observações sugerem que esta adipocitocina inicia e fortalece a fase aguda da resposta inflamatória, mas por outro lado pode facilitar a extinção ou a redução da inflamação crônica (KUKLA *et al.*, 2011). Com base neste quadro, sugere-se que a quemerina tem papel proinflamatório e anti-inflamatório no organismo (ERNST & SINAL, 2010)

Em adição, a quemerina também age no metabolismo da glicose e lipídios no fígado, no músculo esquelético e no tecido adiposo; regulando a absorção de glicose e estimulando a lipólise nos adipócitos. Esta proteína também atua na proliferação e diferenciação dos adipócitos; e na angiogênese (MÜSSIG *et al.*, 2009; ROMAN *et al.*, 2012). Já foi visto que a quemerina e o receptor CMKLR1 são essenciais para a diferenciação dos adipócitos ou contribuem para eventos críticos da adipogênese. Esse aumento no número de células adiposas é um processo importante para o crescimento de massa do tecido adiposo, indicando que estas proteínas podem ser biologicamente importantes para formação deste tecido adiposo durante um desenvolvimento normal ou em estados fisiológicos como a obesidade (Figura 16).

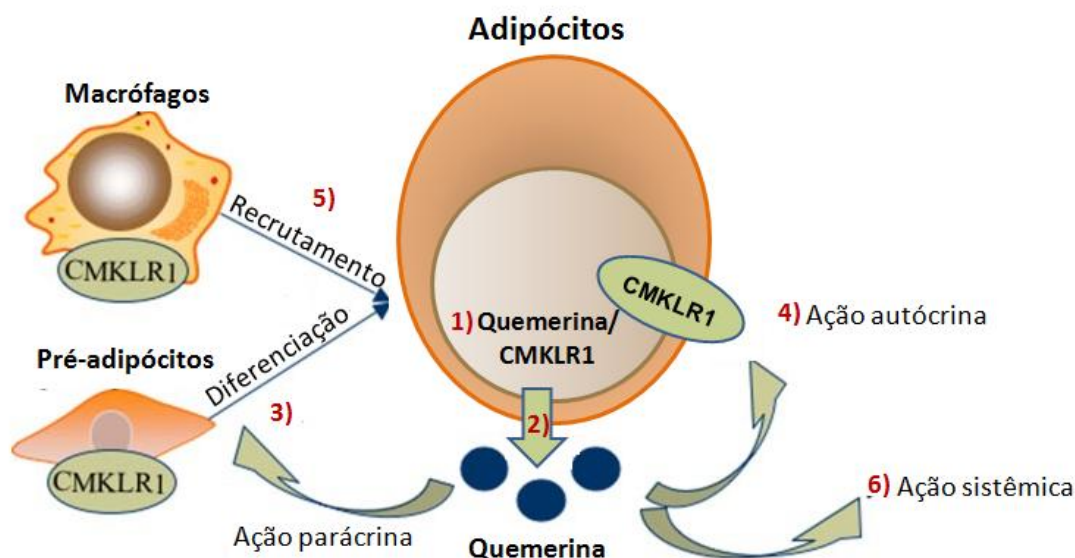


Figura 16: O papel da quemerina e CMKLR1 na biologia do tecido adiposo. A quemerina e seu receptor são altamente expressos no tecido adiposo (etapa 1). A proquemerina é secretada e rapidamente clivada por serino proteases extracelulares (etapa 2). Esta adipocina e o seu receptor são necessários para a diferenciação dos adipócitos (etapa 3) e modulam a expressão de genes relacionados ao metabolismo de glicose e lipídeos no tecido adiposo (etapa 4). Além disso, a quemerina secretada pode atuar no recrutamento de células que expressam CMKLR1 (ex. macrófagos) para o tecido (etapa 5). Para finalizar, alterações nesta adipocina e/ou no seu receptor podem causar consequências na homeostasia do metabolismo de glicose e lipídeo a nível sistêmico.

Fonte: Adaptado de GORALSKI *et al.*, 2007 pp. 28186

Numerosas evidências mostram que os níveis de quemerina estão elevados nos obesos, na DT2 e se associam com vários componentes da SM, incluindo o elevado IMC, glicemia, triglicerídeos, pressão arterial e resistência a insulina (BOZAOGLU *et al.*, 2007; ROUX *et al.*, 2011; STEJSKAL *et al.*, 2008), sugerindo que esta adipocina possa estar envolvida na fisiopatologia destas doenças (BOZAOGLU *et al.*, 2009). No entanto, alguns resultados ainda são inconclusivos, precisando um estudo mais aprofundado em cada população (STEJSKAL *et al.*, 2008). Em adição a essas observações, a relação entre a adiposidade e os níveis plasmáticos desta adipocina também é mostrada em pacientes que perderam peso através de restrições calóricas ou cirurgia bariátrica, estes apresentavam uma significativa redução na quantidade plasmática, quando comparados com indivíduos obesos que não sofreram nenhuma intervenção (CHAKAROUN *et al.*, 2012; SELL *et al.*, 2009).

Um recente estudo de GWA mostrou que os níveis plasmáticos de quemerina são altamente hereditários e observaram que polimorfismos de base única localizados no gene *EIDL3* se associam com os níveis desta proteína. Até o presente momento, estudos genéticos do gene *RARRES2* e seu receptor CMKLR1 são muito limitados (BOZAOGLU *et al.*, 2010). No

momento há poucos relatos na literatura científica, dentre eles temos que polimorfismos genéticos no intron 3 (rs17173608 T/G) e na região 3' não traduzida - 3'UTR - (rs4721 A/C) do gene *RARRES2*, que estão associados ao desenvolvimento da gordura visceral em indivíduos não obesos. Este fato sugere a influência da quemerina na distribuição regional de gordura e em particular, na adiposidade visceral, que está bastante associada às complicações metabólicas que ocorrem na obesidade (MÜSSIG *et al.*, 2009). Embora estes polimorfismos sejam localizados na região não codificadora de proteínas, tem sido demonstrado que este tipo de SNP podem afetar a degradação do RNAm, suprimir a tradução e também afetar o sítio de ligação do fator de transcrição (QIAO *et al.*, 2005).

1.7.3 Gene *PGC1A*

O gene *PGC1A* foi mapeado no cromossomo 4p15.1, possui uma extensão de aproximadamente 67 kb com 13 éxons (Figura 17), que codificam uma proteína nuclear com 797 aminoácidos (91 kDa) (ESTERBAUER *et al.*, 1999). Esta proteína é conhecida como coativador do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma γ e α (PCG1- α), o qual é um potente coativador transcricional.

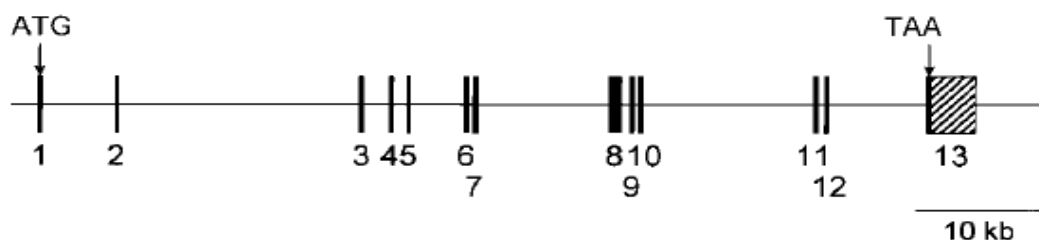


Figura 17: Organização do gene *PGC1A*. Os éxons são representados por caixas pretas e a hachurada retrata a região 3'UTR. O ATG é o sítio de iniciação e o TAA de terminação.

Fonte: Adaptado de Esterbauer *et al.*, 1999 pp. 100

O PCG1- α faz parte de uma classe reguladora de transcrição, que embora não se ligue diretamente à sequência de DNA, controla uma variedade de programas de regulação gênica (PUIGSERVER & SPLIGELMAN, 2003). Ele está envolvido numa gama de vias metabólicas e os sucessos das atuações são devido à estrutura de sua proteína (Figura 18). A região N-terminal contém um domínio ativador de transcrição que inclui a região rica em leucina (LXXLL), responsável pela interação com diversos receptores (outras partes da proteína também podem

exercer esse papel). A região C-terminal contém o motivo de ligação ao RNA (RMM) e o domínio rico em serino-argenina (RS), que aparentemente interagem com a RNA polimerase II durante a transcrição, sugerindo uma atuação no processamento do RNA (PUIGSERVER & SPLIGELMAN, 2003; LIN & SPLIGELMAN, 2005). Além destes, há também o domínio de repressão que tem a função de inibir a atividade da proteína (KNUTTI & KRALLI, 2001).

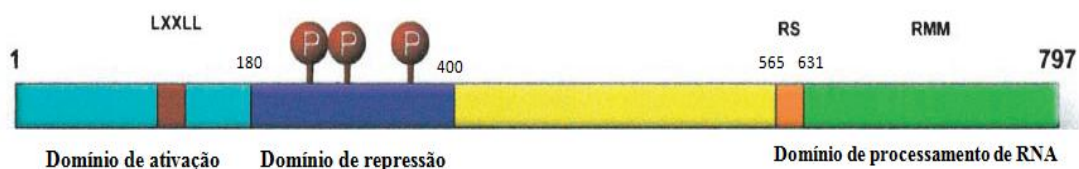


Figura 18: Estrutura do PGC1- α e domínios usados para interagir com proteínas.

Fonte: Adaptado de Puigserver & Spligelman, 2003 pp. 85

Surpreendentemente, o PGC1- α parece desempenhar um papel versátil e ter a habilidade de interagir com diferentes fatores de transcrição (LIN & SPLIGELMAN, 2005). Este coativador está envolvido em diversas vias do metabolismo energético, como a termogênese, gliconeogênese, absorção e metabolismo de glicose e lipídeo e até mesmo na adipogênese (PUIGSERVER & SPLIGELMAN, 2003; KUNEJ *et al.*, 2004; MEDINA-GOMEZ *et al.*, 2007).

O gasto energético do corpo é resultado do metabolismo basal, atividade física e termogênese. Esta refere-se à mudanças na dissipação de energia em resposta a temperaturas ambientais (exposição ao frio), status nutricional (ingestão de uma dieta hipercalórica) ou infecção. Em cada uma dessas mudanças, mecanismos fisiológicos são ativados para aumentar a produção do calor em diferentes tecidos, especialmente o adiposo marrom e o músculo esquelético. O tecido adiposo marrom contém várias gotículas de gordura e uma grande quantidade de mitocôndrias, que expressam a proteína desacopladora 1 (UCP-1). Já foi visto que o PGC1- α induz a proliferação das mitocôndrias e aumenta o processo de respiração por ativação da UCP-1, que desempenha um papel importante no gasto energético do corpo (WU *et al.*, 1999; PUIGSERVER & SPLIGELMAN, 2003). O aumento do gasto requer o acréscimo de absorção e metabolismo de combustíveis, como a captação de glicose e lipídeos; e aumento da oxidação de ácidos graxos (DEVARAKONDA *et al.*, 2011). Além de suas ações na queima energética, esta proteína tem sido identificada como cofatora do receptor nuclear PPAR γ (KNUTTI & KRALLI, 2001). Este receptor é requerido na adipogênese, atuando na diferenciação de pré-adipócitos, no aumento do número das células adiposas e também no

estímulo do armazenamento de ácidos graxos nos adipócitos maduros (MEDINA-GOMEZ *et al.*, 2007).

A família do PGC1 aparentemente responde a estímulos ambientais e ao status nutricional do corpo. Através de suas atividades de modulação da glicose, lipídeo e metabolismo energético, os organismos conseguem se adaptar as demandas metabólicas. Quaisquer anormalidades que ocorram com estes coativadores podem ocasionar na desregulação do metabolismo resultando em doenças (KNUTTI & KRALLI, 2001; LIN & SPLIGELMAN, 2005). Dentre as patogêneses, podemos destacar a obesidade, DT2, doenças neurodegenerativas e cardiomiopatias (DEVARAKONDA *et al.*, 2011).

O gene *PGC1A* apresenta diversas variações na sequência e o polimorfismo mais estudado na literatura é o rs8192678, que corresponde a troca de uma guanina por adenina na posição +1564 do éxon 8, ocasionando a mudança do aminoácido glicina para serina na posição 482 da proteína. Esta modificação do aminoácido no PGC1- α aparentemente afeta a eficiência da coativação do promotor do fator de transcrição mitocondrial A (Tfam) (CHOI *et al.*, 2006). Este último gene quando expresso produz uma proteína que se desloca para a mitocôndria e inicia a transcrição do RNA e a replicação do genoma mitocondrial, sendo importante para a biogênese desta organela (WU *et al.*, 1999; LEE *et al.*, 2014). Segundo Choi e colaboradores (2006), os homozigotos Gly/Gly tem aproximadamente 20% a menos DNA mitocondrial (mtDNA) que os indivíduos Ser/Ser, enquanto os heterozigotos Gly/Ser tem uma quantidade intermediária. Portanto, o alelo selvagem (G) pode ser ligeiramente menos eficiente na replicação do mtDNA. Na literatura o alelo mutado (A) também tem sido associado à diminuição da expressão do *PGC1- α* . Neste caso, a troca do aminoácido glicina por serina reduz 60% a quantidade de RNA mensageiro (MYLES *et al.*, 2011; WENG *et al.*, 2010). A função do domínio codificado pelo éxon 8 ainda não é totalmente compreendida, embora esse domínio seja altamente conservado entre as espécies (90% de identidade entre as sequências dos aminoácidos). Interessantemente, a variação glicina na posição 482 foi encontrada apenas nos humanos, em todos os outros casos analisados de mamíferos se tinha serina nesta posição (Figura 19).

HUMAN	462	LNKHFGHPSQAVFDDEADKT G ELRSDSDFSNEQFSKLPVFIN
PIG	460	LNKHFGHPSQAVFDDEADKT S ELRSDSDFSNEQFSKLPVFIN
SQUIRREL	175	LNKHFGHPSQAVFDDEADKT S ELRSDSDFSNEQFSKLPVFIN
BOVIN	461	LNKHFGHPSQAVFDDEADKT S ELRSDSDFSNEQFSKLPVFIN
RAT	460	LNKHFGHPSQAVFDDEADKT S ELRSDGDFSNEQFSKLPVFIN
MOUSE	461	LNKHFGHPSQAVFDDEADKT S ELRSDGDFSNEQFSKLPVFIN

Figura 19: Comparação da sequência de aminoácidos entre diferentes proteínas do PGC1- α . Estas sequências foram obtidas a partir da ferramenta de bioinformática (Blast) do banco de dados NCBI. Os aminoácidos glicina (G) e serina (S) são indicados com a caixa e seta.

Fonte: Choi *et al.*, 2006 pp.711

Dentre os polimorfismos do *PGC1- α* , há também estudos na literatura com o rs3736265. Este SNP corresponde a troca do nucleotídeo guanina por adenina na posição +1835 do éxon 9, ocasionando a mudança do aminoácido treonina por metionina na posição 612 da proteína. O resíduo treonina é 100% conservado nas espécies, indicando que mudanças neste aminoácido podem afetar a função da proteína, como pode ser visto na figura 20 (NITZ *et al.*, 2007).

Ss_NP_999128.1	...	SCYYSESGHCRHR <u>T</u> HRNSPLCARSRSR
Bt_Q865B7	...	SCYYYESGHCRR <u>T</u> HRNSPLCA-SRSR
Hs_NP_037393.1	...	SCYYESSHYRHR <u>T</u> HRNSPLYVRSR
Mm_NP_032930.1	...	SCYYESSHYRHR <u>T</u> HRNSPLYVRSR
Rn_NP_112637.1	...	SCYYESSHYRHR <u>T</u> HRNSPLYVRSR

Figura 20: Alinhamento da sequência de aminoácidos entre diferentes proteínas do PGC1- α . A comparação destas sequências foi realizada através da ferramenta de bioinformática ClustalW. A variação do aminoácido da posição 612 da proteína é mostrada em negrito e sublinhada. Bt, *Bos taurus*; Hs, *Homo sapiens*; Mn, *Mus musculus*; Rn, *Rattus norvegicus*; Ss, *Sus scrofa*.

Fonte: Adaptado Nitz *et al.*, 2007 pp., 483

Os estudos epidemiológicos destes SNP têm mostrado inconsistências no desenvolvimento de complicações metabólicas (NITZ *et al.*, 2007). Os estudos populacionais do polimorfismo rs8192678 indicam que os carreadores do alelo mutado (A), que codifica a serina, está associado à hipertensão nos homens brancos europeus com descendência alemã e austríaca (OBERKOFER *et al.*, 2003), a DT2 em chineses (WENG *et al.*, 2010) e obesidade em mulheres e resistência à insulina na Eslovênia (KUNEJ *et al.*, 2004). No entanto, em outras

populações este polimorfismo não foi associado a estas patogêneses (MULLER *et al.*, 2003). Com relação ao polimorfismo rs3736265 há poucos estudos na literatura, mas foi observada associação à DT2 em dinamarqueses brancos (EK *et al.*, 2001); no entanto não foi correlacionado com traços da SM (FRANKS *et al.*, 2010). Até o presente momento, estes polimorfismos não foram investigados em populações brasileiras, mostrando a importância do nosso estudo.

1.7.4 Gene *FNDC5*

O balanço energético é definido por dois componentes: a ingestão de alimentos e o gasto energético. A redução do gasto calórico em virtude de uma vida sedentária associado à falta de exercícios tem sido considerada como fator que pode causar a obesidade e desordens metabólicas associadas ao excesso de peso. Portanto, é reconhecido que o exercício físico tem efeitos benéficos ao metabolismo, embora pouco se conheça sobre os aspectos moleculares. Neste contexto, o tecido muscular tem sido reconhecido recentemente como um órgão endócrino que secreta várias citocinas, conhecidas como miocinas, as quais regulam uma série de vias fisiológicas e metabólicas. Estas miocinas agem como hormônios interagindo com diversos órgãos, tais como o pâncreas, o fígado e o tecido adiposo, alterando o metabolismo do corpo. (HUH *et al.*, 2012)

Um estudo recente realizado por Boström e colaboradores (2012), demonstrou a importância da proteína *FNDC5* e do *PGC1- α* na atividade física (Figura 21). Durante os exercícios, as células do músculo esquelético fazem a transcrição e a tradução do *PGC1- α* que coativa a expressão da proteína de membrana, conhecida como *FNDC5* (fibronectina do tipo III contendo cinco domínios). Esta proteína é clivada proteoliticamente e secretada na corrente sanguínea como hormônio irisina, que atua no tecido adiposo subcutâneo, estimulando a expressão de diversos genes, principalmente o *UCP1*, que transformam as células adiposas brancas em marrons (chamadas bebes ou novas marrons), ou seja, faz com que o depósito de energia (gordura) seja usado para a termogênese do corpo, levando a produção de calor nas mitocôndrias e ao gasto energético. Esse processo ocorre pela atividade de desacoplamento de *UCP1*, caracterizada pela sua capacidade de transportar prótons através da membrana mitocondrial interna, evitando a síntese de ATP, mas dissipando a energia na forma de calor (NOVELLE *et al.*, 2013). Neste contexto, tem sido demonstrado que a formação de adipócitos bebes exerce um importante papel de antiobesidade e antidiabetes em camundongos e humanos,

sugerindo que o aumento da irisina no sangue melhora a obesidade e a resistência à insulina (BÖSTROM *et al.*, 2012).

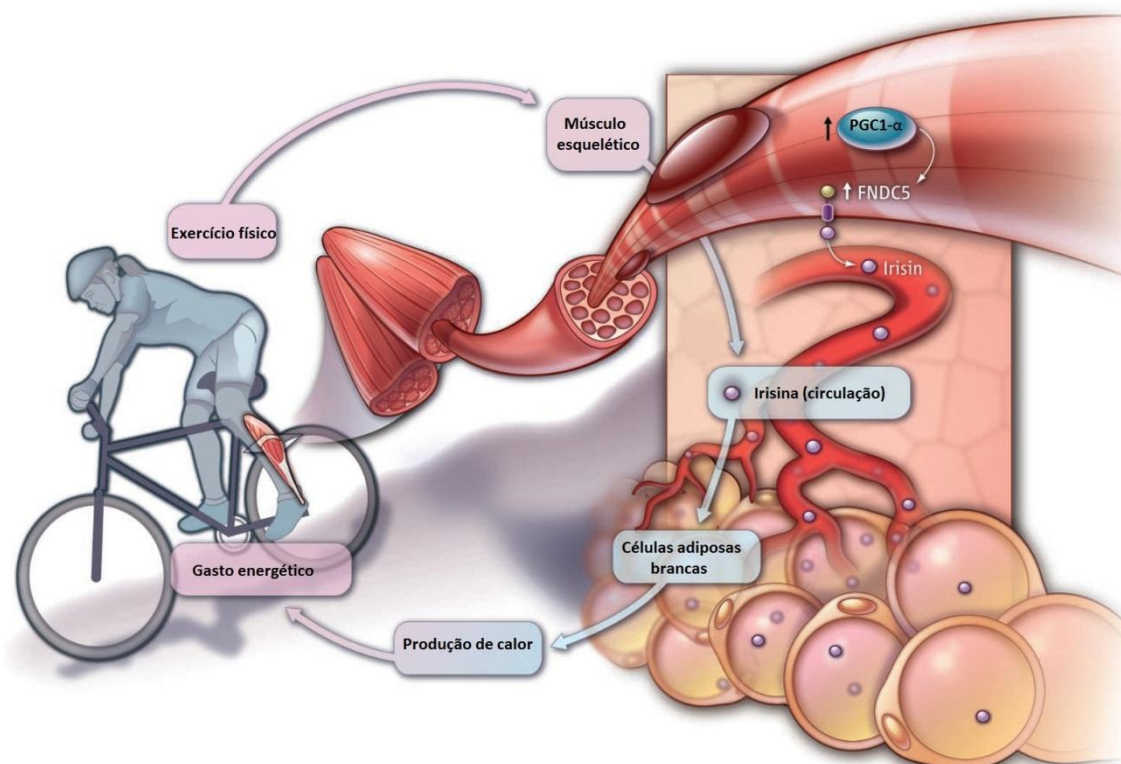


Figura 21: Os exercícios induzem a produção do regulador transcricional PGC1- α no miócito esquelético, que por sua vez impulsiona a produção da proteína de membrana FNDC5, que será clivada e secretada como irisina. Este hormônio ativa programas termogênicos no tecido adiposo branco, resultando na produção de calor e gasto de energia.

Fonte: Adaptado de KELLY 2012, pp.43

A proteína FNDC5 é uma proteína de membrana, que apresenta um peptídeo sinal na região N-terminal, seguido por dois domínios de fibronectina e um domínio hidrofóbico inserido na membrana da célula. Esta proteína é clivada e secretada, embora os aspectos da proteólise ainda não tenham sido esclarecidos. A parte secretada, chamada irisina, tem um peso molecular de 12 kDa e representa a sequência de aminoácido de 30-142 da FNDC5 (Figura 22). Esta sequência apresenta uma homologia de 100% com outras espécies de mamíferos, sugerindo uma alta conservação de sua função.

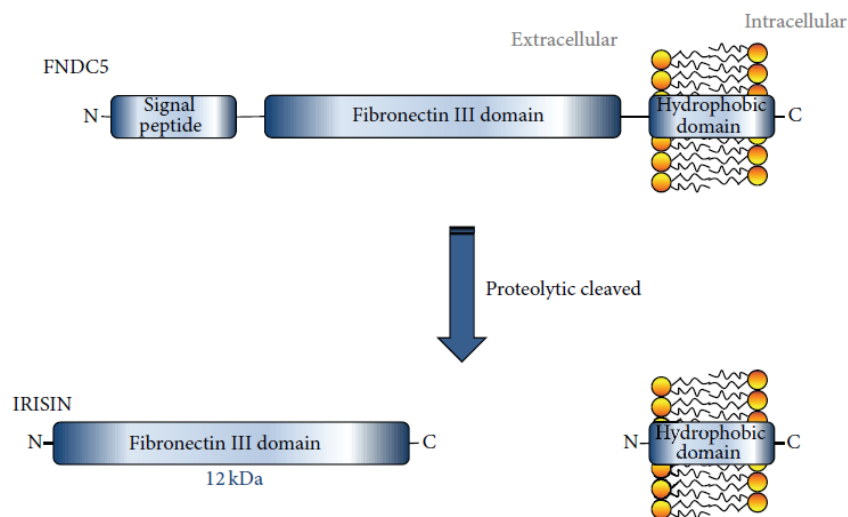


Figura 22: Estrutura da FNDC5 e da irisina.

Fonte: Novelle *et al.*, 2013 pp. 3

O hormônio irisina é em homenagem a Íris, a deusa da mitologia grega conhecida como a mensageira dos Deuses. Desde sua descoberta, muitos cientistas de diferentes áreas vêm estudando este hormônio e tem sido sugerido que este possa se tornar um agente terapêutico contra as doenças metabólicas (HUH *et al.*, 2012). De fato, a administração de irisina reduz o ganho de peso e o desenvolvimento de resistência à insulina em camundongos alimentados com uma dieta hipercalórica (BÖSTROM *et al.*, 2012). Mesmo com resultados interessantes sobre a atuação no metabolismo, ainda pouco se sabe a forma na qual a irisina e seu precursor estão envolvidos nas complicações metabólicas humanas. Além disso, estudos têm mostrado que a FNDC5 é altamente expressa no tecido muscular, no coração e no sistema nervoso, induzindo aparentemente uma adequada diferenciação neural e proliferação destas células, mas são necessários maiores pesquisas sobre o assunto (HUH *et al.*, 2012; SPIELGMAN *et al.*, 2013).

O gene *FNDC5* está localizado no cromossomo 1p34.4, contém 6 éxons que codificam a proteína com 212 aminoácidos (Figura 23). Segundo o HapMap, já foram descritos mais de 156 variações de sequência, sendo 116 nos íntrons e 40 nas regiões codificantes. Até o presente momento, há poucos trabalhos na literatura científica com os polimorfismos do gene *FNDC5* e principalmente com relação à obesidade e outras complicações metabólicas em humanos. Dentre os encontrados temos o realizado por Staiger e colaboradores (2013), que fizeram um “screening” de todo o gene *FNDC5* em alemães e observaram que os polimorfismos rs16835198 e rs726344 se associaram com a sensibilidade à insulina nesta população. Temos também o

estudo realizado por Tanisawa e colaboradores (2014), que identificaram os polimorfismos rs3480 e rs16835198, e observaram que influenciam no metabolismo de glicose em homens japoneses que praticam atividade física.



Figura 23: Organização do gene *FNDC5*. Os éxons são representados por caixas vermelhas totalmente preenchidas e as caixas abertas retratam as regiões 5'UTR e 3'UTR.

2 Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

O projeto tem como objetivo o estudo de polimorfismos dos genes *ADIPOQ*, *RARRES2*, *PGC1A* e *FNDC5* na população do Rio de Janeiro, com a finalidade de estabelecer uma possível associação ao desenvolvimento da obesidade. Ademais, visa também analisar a influência destes polimorfismos na susceptibilidade destes indivíduos desenvolverem desordens metabólicas, como a síndrome metabólica, diabetes mellitus tipo 2 e hipertensão.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Investigar diferenças nos parâmetros antropométricos, pressóricos e bioquímicos e na susceptibilidade à síndrome metabólica, hipertensão e diabetes *mellitus* tipo 2; entre os eutróficos e obesos e nos diferentes graus de obesidade.
- ✓ Realizar a genotipagem de polimorfismos nos genes *ADIPOQ*, *RARRES2*, *PGC1- α* e o rastreamento de variações no gene *FNDC5* na amostras de eutróficos e obesos.
- ✓ Descrever a distribuição das frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas dos polimorfismos dos genes *ADIPOQ*, *RARRES2*, *PGC1- α* e *FNDC5* nos grupos.
- ✓ Analisar a associação dos polimorfismos a susceptibilidade à obesidade e a presença de diabetes *mellitus* tipo 2, hipertensão e síndrome metabólica nos obesos.
- ✓ Investigar a relação entre os polimorfismos e a variabilidade dos parâmetros antropométricos, bioquímicos e pressóricos nos grupos.

3 Materiais e Métodos

3.1 Caracterização da amostra

3.1.1 Seleção da amostra

O critério de seleção da amostra foi baseado no Índice de Massa Corpórea (IMC), sendo o estudo constituído de 136 obesos ($IMC \geq 30$). Estes indivíduos fazem acompanhamento na ONG conhecida como Grupo de Resgate a Autoestima e Cidadania do Obeso. Além disso, foram coletadas amostras de um grupo controle contendo 108 voluntários eutróficos (IMC: 18,5 – 24,99). Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da Fiocruz (CAAE: 09225113.0.0000 / nº do parecer: 346.634). Todos os pacientes foram informados dos objetivos e dos possíveis riscos do estudo. Posteriormente, todos os que preencheram os critérios e concordaram em participar do projeto assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) de acordo com as normas de Pesquisa em Seres Humanos (resolução 196/96 do Ministério da Saúde).

3.1.2 Coleta de sangue

As análises bioquímicas e genéticas foram realizadas a partir de 10 ml de sangue periférico, coletados em um tubo EDTA (4ml), um tubo de soro (4ml) e de fluoreto de sódio (2ml). O material dos tubos estéreis contendo EDTA foi transferido para tubos de criopreservação e estocado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para que posteriormente o DNA fosse extraído. Enquanto que de soro e de fluoreto foram centrifugados a 5000 rpm por 10 minutos, sendo o soro e o plasma enviados para o Laboratório de Lipídes/UERJ para as análises bioquímicas.

3.2 Desenho experimental

O estudo é dividido em duas etapas e o resumo do desenho experimental pode ser observado na figura 24.

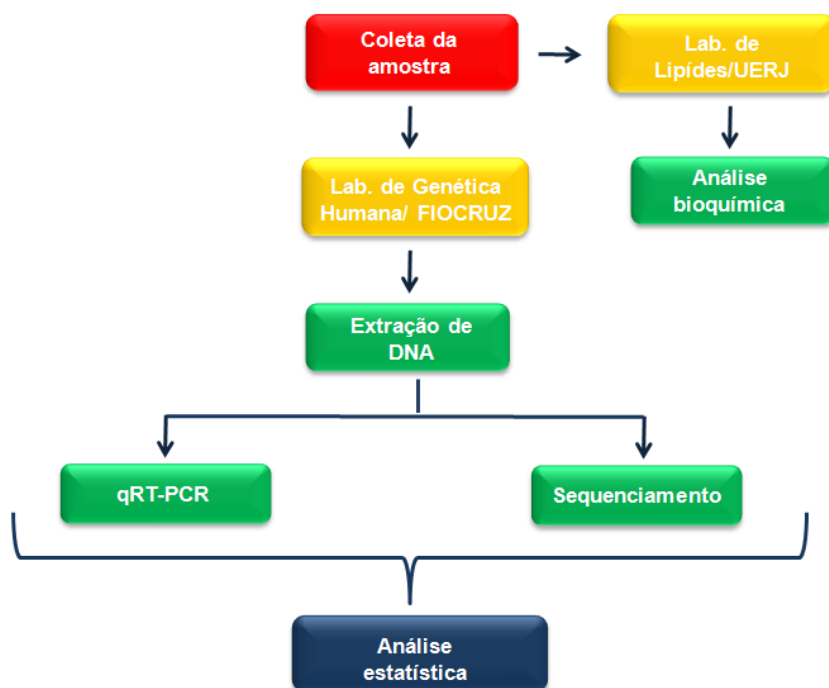


Figura 24: Esquema do desenho experimental do estudo

3.2.1 Medidas antropométricas

3.2.1.1 Índice de Massa Corpóreo (IMC)

O cálculo do IMC foi calculado através da divisão do peso (em kg) pela estatura elevada ao quadrado (em m²).

3.2.1.2 Mensuração da circunferência da cintura e quadril

Estas avaliações antropométricas foram realizadas de acordo com o protocolo estabelecido pelo “National Institutes of Health” fornecido pelo Guia Prático para obesidade (NHLBI, 2000).

As circunferências foram mensuradas com o auxílio da fita métrica graduada em centímetros, com o paciente ereto, com os braços ao longo do corpo, pés posicionados próximos e com o abdome relaxado. A circunferência da cintura (CC) foi mensurada a partir do ponto médio entre a crista ilíaca e o último arco costal. A circunferência do quadril (CQ) foi medida

em torno da porção mais larga das nádegas. E a relação cintura/quadril (RCQ) foi obtida a partir da razão entre a CC e a CQ para avaliar o padrão de distribuição do tecido adiposo.

3.2.1.3 Índice de massa corpóreo inverso (iIMC)

O iIMC foi obtido com pacientes em jejum, sem sapatos e vestindo roupas leves. Este foi calculado através da divisão circunferência da cintura (em cm) pelo peso (em kg).

3.2.2 Análises bioquímicas

As amostras de sangue foram coletadas em tubos gel para a análise de colesterol total, HDL colesterol, triglicerídeo e proteína C reativa; em tubos de fluoreto de sódio para glicose; e em tudo de EDTA para a hemoglobina glicada. Este material foi encaminhado para o Laboratório de Lípidos/UERJ, para que fossem realizados os estudos bioquímicos.

3.2.2.1 Glicose

A glicose foi analisada através do plasma, pelo método glicose oxidase/peroxidase. Este método tem como princípio a formação de um complexo colorido na presença de glicose que é quantificado por espectrofotometria no aparelho Analisador Automático A25 da marca BioSystems, utilizando o kit BioSystems.

3.2.2.2 Triglicerídeo

O triglicerídeo do soro foi analisado através do método triglicerídeo oxidase/Peroxidase, que tem como princípio a formação de complexo colorido que é quantificado por espectrofotometria pelo Analisador Automático A25 marca BioSystems.

3.2.2.3 Colesterol total

A quantificação do colesterol livre e estratificado presente no soro foi realizado através do método Colesterol Oxidase/Peroxidase utilizando o Analisador Automático A25 marca BioSystems.

3.2.2.4 HDL Colesterol

A lipoproteína de alta densidade (HDLc) foi quantificada pelo método detergente direto, em que as proteínas de baixa densidade (LDLc), as de muito baixa densidade (VLDLc), e os quilomícrons são hidrolisados pelo colesterol oxidase mediante uma reação enzimática acelerada que não forma cor. Entretanto, o detergente presente no reagente B solubiliza o colesterol HDL da amostra de soro, permitindo que seja quantificado por espectrofotometria. O aparelho utilizado foi o Analisador Automático A25 marca BioSystems.

3.2.2.5 LDL Colesterol

A determinação desta lipoproteína foi realizada através do cálculo de Friedewald segundo equação abaixo:

$$\text{Colesterol LDLc (mg/dL)} = \text{Colesterol Total} - \text{Colesterol HDLc} - \frac{\text{Triglicerídeos}}{5}$$

3.2.2.6 VLDL Colesterol

A determinação do colesterol VLDL também é realizada através do cálculo de Friedewald segundo equação abaixo:

$$\text{Colesterol VLDLc (mg/dL)} = \frac{\text{Triglicerídeos}}{5}$$

3.2.2.7 Proteína C reativa

A proteína C reativa foi quantificada através da técnica de turbidimetria/ látex de alta sensibilidade. O princípio do método é baseado na proteína sérica provocar uma aglutinação das partículas de látex cobertas com anticorpo anti-proteína C-reativa humana. A aglutinação das partículas de látex é proporcional à concentração de PCR e pode ser quantificada por turbidimetria. O aparelho utilizado foi o Analisador Automático A25 marca BioSystems.

3.2.2.8 Hemoglobina glicada

A determinação da hemoglobina glicada baseia-se no imunoensaio de inibição turbidimétrica (TINIA) do sangue total hemolisado. O aparelho utilizado foi o Analisador Automático A25 marca BioSystems.

3.2.3 Prevalência de desordens metabólicas

3.2.3.1 Síndrome metabólica

Os critérios diagnósticos utilizados para a Síndrome Metabólica estão baseados naqueles definidos pela *National Cholesterol Education Program* (NCEP/ATPIII). São necessários 3 dos 5 critérios maiores – obesidade determinada pela circunferência abdominal, hipertensão arterial, baixos níveis de HDL, triglicerídeos elevados e intolerância a glicose (Tabela 4) (GRUNDY *et al.*, 2004) .

Tabela 4: Critérios da NCEP/ATPIII

Parâmetros	Níveis
Glicose*	≥ 100mg/dL
HDL-colesterol*	Homens: < 40mg/dL Mulheres: < 50mg/dL
Triglicérides*	≥ 150mg/dL
Obesidade	Cintura ≥ 102 cm para homens ou ≥ 88 cm para mulheres.
Hipertensão*	≥ 130 x 85 mmHg
<i>* O uso de medicamentos específicos é considerado como tendo esse parâmetro no critério da síndrome metabólica.</i>	

3.2.3.2 Hipertensão

Os critérios de diagnósticos utilizados para a hipertensão foram baseados naqueles definidos pela OMS (2003) e atualizados pela Sociedade Europeia de Hipertensão e Cardiologia (MANCIA *et al.*, 2013). Os critérios de inclusão foram pressão arterial 140 x 90 mmHg ou o uso de pelo menos um medicamento hipertensivo.

3.2.3.3 Diabetes mellitus tipo 2

Os critérios usados para o diagnóstico de DT2 foram de acordo com o sugerido pelo Ministério da Saúde (2006), sendo considerados diabéticos os indivíduos com glicemia em jejum superior a 126mg/dL e hemoglobina glicada superior a 7%. Além disso, consideramos diabéticos obesos que já estivessem em tratamento, utilizando pelo menos um medicamento.

3.2.4 Análises genéticas

3.2.4.1 Extração de DNA

Todas as amostras de DNA foram extraídas a partir de células de sangue periférico utilizando o kit QIAamp DNA Blood Kit (Qiagen) de acordo com o protocolo do fabricante. A

integridade do DNA foi visualizada em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. As amostras foram estocadas em freezer -20°C no Laboratório de Genética Humana.

3.2.4.2 Desenho de oligonucleotídeos

Todos os oligonucleotídeos usados para a genotipagem dos éxon 3, 4 e 5 do gene *FNDC5* foram desenhados no Laboratório de Genética Humana (IOC/Fiocruz – RJ). A sequência do gene usada para desenhar os “primers” foi obtida no banco de dados do NCBI (*The National Center for Biotchnology Information*). E os oligonucleotídeos foram desenhados através da utilização do programa Primer3Plus (Tabela 5).

Tabela 5: Informações sobre os “primers” do gene *FNDC5*

Genes	Éxon	“Primers”	Pares de Bases
<i>Fndc5</i>	3	Fndc5E3 - F Fndc5E3 - R	344pb
	4	Fndc5E4 - F Fndc5E4 - R	295pb
	5	Fndc5E5 - F Fndc5E5 - R	286pb

3.2.4.3- Estratégias de rastreamento

3.2.4.3.1 PCR em tempo real

A identificação dos polimorfismos selecionados dos genes *ADIPOQ*, *RARRES2* e *PGC1A*, foi obtida através de genotipagem pelo método da PCR em tempo real (qRT-PCR), utilizando ensaios com sondas de hidrólise – Taqman – desenhadas e validadas pela Life Technology (Tabela 6).

As reações foram feitas com 5µL de Master Mix, 0,25µl de sonda TaqMan específica para cada variante estudada, 20 – 30 ng de DNA e água ultrapura suficiente para atingir um volume reacional de 10µl. Toda reação inclui um controle negativo, que contém todos os reagentes da reação de PCR, sem o acréscimo de DNA. Este controle é utilizado para garantir que não houve nenhuma contaminação com qualquer DNA. Além disso, também foi incluído um controle positivo, para uma maior confiabilidade nos resultados. As máquinas utilizadas para estes experimentos foram a 7500 (Life Technology) e StepOne plus (Life Technology). As sondas usadas nesses experimentos, assim como as diferenças nas condições de amplificação são apresentadas na tabela 6.

Tabela 6: Informações sobre as sondas usadas nos experimentos

<i>Genes</i>	<i>Polimorfismos</i>	Sequência do desenho da sonda (VIC/FAM)	Ciclagem
<i>ADIPOQ</i>	rs17366568	CAGAGGAGAGAAGCTGGTTAGCATT[A/G]AAT GGAGCAATCTGTGTCATCGTAC	60°C - 1 min 95°C- 10 min 95°C -15 seg } 50 ciclos 60°C -1,5min 60°C – 1,5min
	rs182052	GATGCATGGAACCATTCTGAATTTT[A/G]CCC AGTTCGCTCTGTAGCAGGATAC	60°C - 1 min 95°C- 10 min 95°C -15 seg } 40 ciclos 60°C -1min 60°C – 1min
<i>RARRES2</i>	rs17173608	TCATTGCTATAGTCCAGTGCCCTCC[G/T]TGAG CCGACAGAGGGAAGTGGGGCC	
	rs4721	GCAGCGGTCCTGGAGGCACCACGCA[G/T]CTC TAGACAAAAGGGGAAACAGGTT	
<i>PGC1-α</i>	rs8192678	CTGAAATCACTGTCCCTCAGTTCAC[C/T]GGTC TTGTCTGCTTCGTCGTCAAAA	60°C - 1 min 95°C- 10 min 95°C -15 seg } 50 ciclos 60°C -1min 60°C – 1min
	rs3736265	CACATACAAGGGAGAATTTTCGGTGC[A/G]TGC GGTGTCTGTAGTGGCTTGACTC	

3.2.4.3.2 Sequenciamento

Devido os poucos estudos no gene *FNDC5*, foi realizado o rastreamento das junções intron-éxon e dos próprios éxons 3, 4 e 5, através de sequenciamento automático, utilizando a plataforma de redes tecnológicas da Fiocruz.

Primeiramente, as amostras foram submetidas a PCR convencionais para amplificar esses três fragmentos. O protocolo utilizado para as reações são similares, pois apresentam um volume final de 50µl contendo 2 µl (50ng-100ng) de DNA; 15 pmoles de cada oligonucleotídeo; 5 µl de uma solução 2mM de cada dNTP (Invitrogen); Tampão Amplitaq 1X e 2,5 U de Taq Polimerase Amplitaq(Life Techonology). Os programas do termociclador são apresentados na tabela 7. Posteriormente, os fragmentos são submetidos a um gel de agarose a 1,5% para avaliar a amplificação da PCR.

Os produtos da PCR são purificados com o Kit Chargeswitch Pro-Pcr (Invitrogen) e novamente submetidos a um gel de agarose 2,0% usando marcador Low mass para uma quantificação relativa.

Após estas etapas, é realizada a reação de sequenciamento, utilizando 3-10 ng do DNA amplificado purificado, 3,2 pmoles de cada iniciador (*foward* e *reverse*), 1 µL do Big Dye terminator v3.1 (Applied Biosystems), 1,5 µL Tampão 5x (Applied Biosystems) e água ultrapura suficiente para 7,5 µL. A reação de sequenciamento foi conduzida no termociclador GenAmp PCR System 9700 (Life Technologies), com as seguintes condições de ciclagem: aquecimento a 94°C por 10 segundo, seguido por 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos, sendo realizado 40 repetições desses ciclos.

Os produtos da reação anterior passaram pelo processo de precipitação, que consiste na adição de 30 µL (3x volume) de Isopropanol 75% (MERCK) para cada amostra. O material foi submetido a uma agitação no vortex por 10 segundos, repouso por 15 minutos (sob o abrigo de luz) e centrifugação a 4.000 rpm por 15 minutos. O material sobrenadante é descartado e é adicionado 50 µL (5x volume) de Etanol 75% (MERCK) em cada amostra. Este material é centrifugado por 15 minutos a 4.000 rpm e o sobrenadante é descartado novamente. Para finalizar, é colocado no termociclador aquecido a 60°C por 10 minutos. Este material foi encaminhado para a Plataforma de Sequenciamento de DNA RPT01A, para que pudessem ser realizados os passos de desnaturação usando formamida e análise no sequenciador automático 3730XL (Life Techonologies).

Tabela 7: Condições de ciclagem do gene *FNDC5*

<i>Gene</i>	<i>Éxon</i>	Condições de ciclagem
<i>FNDC5</i>	3	95°C- 10 min 94°C -1min } 30 ciclos 65°C -1min } 72°C – 1min } 72°C – 10min
	4	95°C- 10 min 94°C -1min } 30 ciclos 60°C -45seg } 72°C – 50seg } 72°C – 10min
	5	95°C- 10 min 94°C -1min } 30 ciclos 60°C -1min } 72°C – 1min } 72°C – 10min

3.2.4.3.3 Análise das sequências do DNA

Os eletroferogramas obtidos das reações de sequenciamento foram analisados de duas formas diferentes. A primeira é uma análise mais bruta dos resultados, em que se utiliza o programa Chromas Lite e o BioEdit. Estes nos permitem observar a qualidade da corrida e realizar o alinhamento com a sequência referência do gene (*FNDC5*) obtida do banco de dados NCBI.

A segunda análise é realizada pelo programa SeqScape versão 2.1, em que sobrepõe a sequência senso e antisenso, construindo o alinhamento das sequências e criando uma 5'-3'. Posteriormente, este alinhamento é pareado com a sequência do gene referência para uma melhor análise das variações nucleotídicas.

3.2.5 Análises bioestatísticas

A determinação da normalidade dos parâmetros antropométricos, pressóricos e bioquímicos da amostra foi através do teste de Kolmogorov-Smirnov. As variáveis com distribuição normal foram apresentadas na forma de média e desvio padrão (DP) e as sem distribuição normal foram através de mediana e percentil 25 e 75. Posteriormente, as variáveis tiveram suas diferenças testadas entre o grupo de obesos e controles através do teste t-student (distribuição normal) e Mann-Whitney (sem distribuição normal). E para a variação dos parâmetros entre os graus de obesidade foram realizados testes One-Way ANOVA e o teste não paramétrico Kruskal-Wallis.

A prevalência das comorbidades clínicas é apresentada na forma de frequência e porcentagem e as diversas comparações foram feitas usando o teste do Qui-Quadrado. Da mesma forma, a associação dos genótipos e alelos com a obesidade, DT2, hipertensão e SM foram realizadas com o mesmo teste. Este também foi utilizado para investigar se as frequências genotípicas do grupo de eutróficos e obesos estavam de acordo com o equilíbrio genético de Hardy-Weinberg.

As análises haplotípicas foram realizadas pelos programas EH e PHASE, estes obtém os haplótipos com cálculos das maiores probabilidades de ocorrência e posteriormente verificam se estão em equilíbrio de ligação. Em seguida, a partir das contagens obtidas dos grupos de eutróficos e obesos, realizamos o teste do qui-quadrado para verificar se há diferenças entre as frequências haplotípicas.

Todo esse conjunto de análises é realizados fazendo uso de planilhas Excel e dos Software SPSS V. 16, EH e PHASE. As inferências estatísticas foram feitas ao nível de 5% e as tendências foram baseadas entre os níveis de 5-10%.

4 Resultados

4.1 Descrição da amostra

As análises foram realizadas em 136 obesos, sendo 107 mulheres (78,7%) e 29 homens (21,3%). E também foram coletados 108 eutróficos, sendo 76 mulheres (70,4%) e 32 homens (29,6%). Dentre as informações desta amostra, temos os parâmetros antropométricos, níveis pressóricos, bioquímicos (Tabela 8) e prevalência da DT2, SM e hipertensão (Tabela 9). A partir dos resultados da Tabela 8, podemos observar que os obesos apresentaram valores significativamente maiores para circunferência abdominal, circunferência de quadril, pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica, glicemia, VDL colesterol, triglicerídeo, proteína C reativa e hemoglobina glicada, enquanto que o HDL colesterol foi significativamente maior em eutróficos.

Com relação às patologias, os obesos mostraram-se mais susceptíveis a DT2 ($\chi_{(1)}^2=31,62$; $p<0,001$), hipertensão ($\chi_{(1)}^2=86,34$; $p<0,001$) e SM ($\chi_{(1)}^2=100,64$; $p<0,001$) quando comparados aos eutróficos (Tabela 9).

Tabela 8: Parâmetros antropométricos, níveis pressóricos e bioquímicos.

	Total		Eutróficos		Obesos		p
	N	Valores	N	Valores	N	Valores	
Idade	244	36 (28; 46)	108	29 (25; 37)	136	40 (31; 51)	<0,01
Peso (Kg)	244	97,58±38,56	108	62,83±9,27	136	125,17±29,58	<0,01
Circ. abdominal (cm)	242	109,0 (82,0; 136,0)	108	81,5 (74,1; 85,9)	134	133,0(120,5;145,1)	<0,01
Circ. do quadril (cm)	242	116,5 (99,0; 141,6)	108	99,0 (94,5; 102,0)	134	141,0(128,0;152,0)	<0,01
Razão cintura-quadril	242	0,91 (0,82; 0,97)	108	0,82 (0,77; 0,88)	134	0,96 (0,91; 1,01)	0,75
PAS (mmHg)*	185	126,04±20,54	96	116,59±12,44	89	136,24±22,64	<0,01
PAD (mmHg)*	185	81,16±14,35	96	76,44±10,08	89	86,26±16,44	<0,01
iIMC (cm²/kg)	242	126,0(105,7; 147,7)	108	104,5(94,0;113,7)	134	145,4(130,7;159,4)	0,08
Glicemia (mg/dl)*	180	92,0 (86,0; 92,0)	101	90,0 (84,0; 96,0)	79	97,0 (89,0; 108,0)	<0,01
Colesterol total*	206	192,52±41,06	101	184,04±35,24	105	200,69±44,64	0,11
HDL(mg/dL)*	206	51,5 (44,0; 63,0)	101	60,0 (47,5; 69,0)	105	48,0 (42,0; 54,0)	<0,01
LDL(mg/dL)*	201	113,82±34,25	100	105,19±31,39	101	122,37±34,97	0,36
VDL(mg/dL)*	201	20,0 (15,0; 29,0)	100	16,0 (13,4; 22,0)	101	26,0 (18,0; 35,5)	<0,01
Triglicerídeo (mg/dL)*	206	104,0 (75,0; 151,5)	101	81,0 (68; 111,5)	105	138,0 (94,0; 185,0)	<0,01
PCR (mg/dL)*	140	0,73 (0,28; 1,49)	43	0,19 (0,06; 0,34)	97	1,13 (0,57; 1,91)	<0,01
Hemoglobina glicada (%)*	143	4,85 (4,50; 5,50)	44	4,7 (4,5; 5,0)	99	5,3 (4,7; 6,3)	<0,01

Legenda: PAS – pressão arterial sistólica; PAD – pressão arterial diastólica; IMC – índice de massa corpóreo; iIMC – índice de massa corporal invertido; PCR- proteína C reativa.

Nota: Os valores representam média ± desvio padrão para variáveis com distribuição normal ou mediana (percentil 25; percentil 75), para variáveis sem distribuição normal.

O *p*-valor representa as diferenças entre as médias das variáveis com distribuição normal e diferenças entre as medianas das variáveis sem distribuição normal nos grupos de eutróficos e obesos.

*Foram excluídos da análise todos os indivíduos que tomam medicamento.

Tabela 9: Características clínicas da amostra

	Total			Eutróficos			Obesos			<i>p</i>
	n	Sim	Não	n	Sim	Não	n	Sim	Não	
Diabetes tipo 2*	243	34 (14%)	209 (86%)	108	0 (0%)	108 (100%)	135	34 (25,2%)	101 (74,8%)	<0,001
Hipertensão*	243	93 (38,3%)	150 (61,7%)	107	6 (5,6%)	101 (94,4%)	135	87 (64%)	49 (36%)	<0,001
Síndrome metabólica	211	85 (40,3%)	126 (59,7%)	101	5 (5%)	96 (95%)	110	80 (72,7%)	30 (27,3%)	<0,001

Nota: As características são apresentadas na forma de frequência e porcentagem.

O *p*-valor é referente ao teste de homogeneidade entre eutróficos e obesos.

*Inclusos todos os indivíduos diagnosticados a partir dos exames e os que já estavam em tratamento.

As amostras de obesos foram classificadas de acordo com a OMS, sendo 14 obesos grau 1 (71,4% de mulheres; 28,6 de homens), 21 obesos grau 2 (81% de mulheres; 19% de homens) e 101 obesos grau 3 (79,2% de mulheres; 20,8% de homens). Os mesmos parâmetros analisados anteriormente foram subdivididos entre os graus de obesidade, para uma melhor visualização das diferenças entre os parâmetros e prevalência das doenças metabólicas na nossa amostra de obesos (Tabela 10 e Tabela 11). Dessa forma, foi possível observar que mesmo entre estes grupos, os parâmetros como peso, circunferência abdominal, circunferência do quadril, pressão arterial sistólica, glicose e proteína C reativa apresentam diferenças significativas.

Com relação às características clínicas, a SM apresentava uma tendência de desequilíbrio na sua distribuição na amostra de obesos ($\chi_{(2)}^2 = 5,46$; $p=0,07$). E foi observado um aumento significativo de SM nos obesos grau 3 (mórbidos), quando comparada aos graus 1 e 2 ($\chi_{(1)}^2 = 5,36$; $p=0,02$).

Tabela 10: Parâmetros antropométricos, níveis pressóricos e bioquímicos entre os graus de obesidade.

	Grau 1		Grau 2		Grau 3		p
	N	Média	N	Média	N	Média	
Idade (anos)	14	47 (33; 55)	21	46 (31; 54)	101	39 (31; 49)	0,44
Peso (Kg)	14	85,42±8,86	20	100,67±9,50	101	135,78±26,30†	<0,01
Circ. abdominal (cm)	14	108,5 (101,8; 113,5)	20	120,0 (108,3; 127,9)	100	138,3 (128,1; 149,8)	<0,01
Circ. do quadril (cm)	14	113,5 (110,0; 118,3)	20	125,3 (121,0; 131,4)	100	144,5 (135,3; 154,8)	<0,01
Razão cintura-quadril	14	0,96 (0,89; 1,0)	20	0,95 (0,87; 1,02)	100	0,97 (0,91; 1,01)	0,77
PAS (mmHg)*	10	124,10±21,62	14	124,00±19,52	65	140,74±22,02	0,007
PAD (mmHg)*	10	79,30±18,99	14	83,21±14,66	65	87,98±16,27	0,23
iIMC (cm²/kg)	14	137,7 (124,6; 157,8)	20	136,3 (118,1; 164,5)	100	146,9 (133,0; 161,0)	0,39

Glicose em jejum (mg/dl)*	11	93,0 (88,0; 105,0)	14	90,0 (86,8; 99,3)	54	100,9 (89,8; 112,0)	0,05
Colesterol total*	14	226,57±36,81	17	197,53±46,60	74	196,51±44,41	0,07
HDL(mg/dl)*	14	48,5 (43,5; 58,5)	17	47,0 (40,5; 55,0)	74	47,5 (41,8; 54,0)	0,66
LDL(mg/dl)*	13	142,88±34,66	17	122,89±35,22	71	118,49±34,11	0,07
VDL(mg/dl)*	13	22 (17,5; 40,8)	17	25,0 (17,5; 32,5)	71	27,0 (20,0; 36,0)	0,89
Triglicerídeo (mg/dl)*	14	125,0 (88,0; 220,3)	17	124,0 (89,5; 162,0)	74	138,5 (103,0; 185,0)	0,80
PCR (mg/dl)*	10	0,55 (0,30; 0,96)	16	0,95 (0,51; 2,07)	73	1,3 (0,7; 1,9)	0,02
Hemoglobina glicada(%)*	10	5,4 (4,5; 6,1)	16	4,8 (4,4; 5,1)	71	5,2 (4,7; 5,9)	0,12

Legenda: PAS – pressão arterial sistólica; PAD – pressão arterial diastólica; IMC – índice de massa corpóreo; iIMC – índice de massa corporal invertido; PCR- proteína C reativa.

Nota: Os valores representam média ± desvio padrão para variáveis com distribuição normal ou mediana (percentil 25; percentil 75), para variáveis sem distribuição normal.

O *p*-valor representa as diferenças entre as médias das variáveis com distribuição normal e diferenças entre as medianas das variáveis sem distribuição normal nos diferentes graus de obesidade.

*Foram excluídos da análise todos os indivíduos que tomam medicamento.

Tabela 11: Características clínicas da amostra de obesos

	Grau 1			Grau 2			Grau 3			P
	n	Sim	Não	N	Sim	Não	n	Sim	Não	
Diabetes tipo 2*	14	2 (14,3%)	12 (85,7%)	21	3 (14,3%)	18 (85,7%)	100	29 (29%)	71 (71%)	0,23
Hipertensão*	14	7 (50%)	7 (50%)	21	10 (47,6%)	11 (52,4%)	100	69 (68,3%)	32 (31,7%)	0,20
Síndrome metabólica	13	7 (53,8%)	6 (46,2%)	17	10 (58,8%)	7 (41,2%)	80	63 (78,8%)	17 (21,3%)	0,07

Nota: As características são apresentadas na forma de frequência e porcentagem.

O *p*-valor é referente ao teste de homogeneidade entre os obesos.

*Inclusos todos os indivíduos diagnosticados a partir dos exames e os que já estavam em tratamento.

4.2-Análise genética

4.2.1- Gene *ADIPOQ*

4.2.1.1 Polimorfismo rs17366568 (c.-8-387G>A)

Os indivíduos coletados foram analisados para o polimorfismo rs17366568, localizado no intron 1 do gene *ADIPOQ*, através da PCR em tempo real, utilizando sondas taqman (Figura 25 e 26).

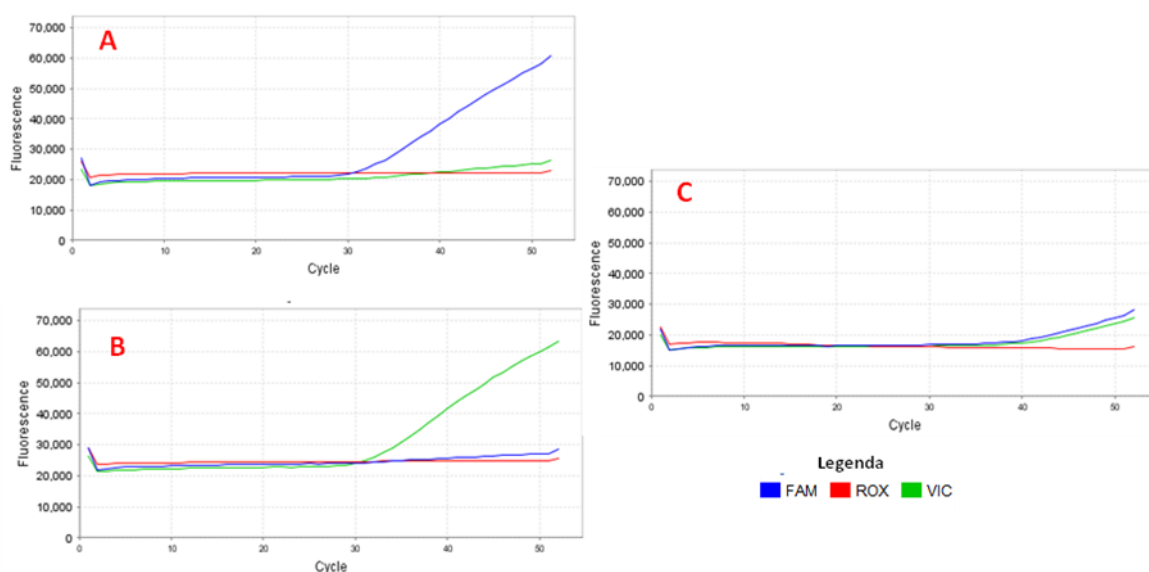


Figura 25: Gráfico Multicomponente do polimorfismo rs17366568 do gene *ADIPOQ*. O eixo y representa a fluorescência do fluoróforo e o eixo x o número de ciclos. A curva em azul é o fluoróforo FAM ligado a uma sonda que se anela ao alelo G, o verde é o fluoróforo VIC que se anela ao alelo A e o vermelho é o fluoróforo ROX, que é a referência passiva. No gráfico A, observa-se um aumento apenas da fluorescência FAM, representando um indivíduo homocigoto selvagem (GG). No gráfico B, houve um aumento apenas da fluorescência VIC, representando um indivíduo homocigoto mutado (AA). E no gráfico C, ambos os fluoróforos tiveram um aumento de fluorescência, representando uma amostra heterocigota (GA).

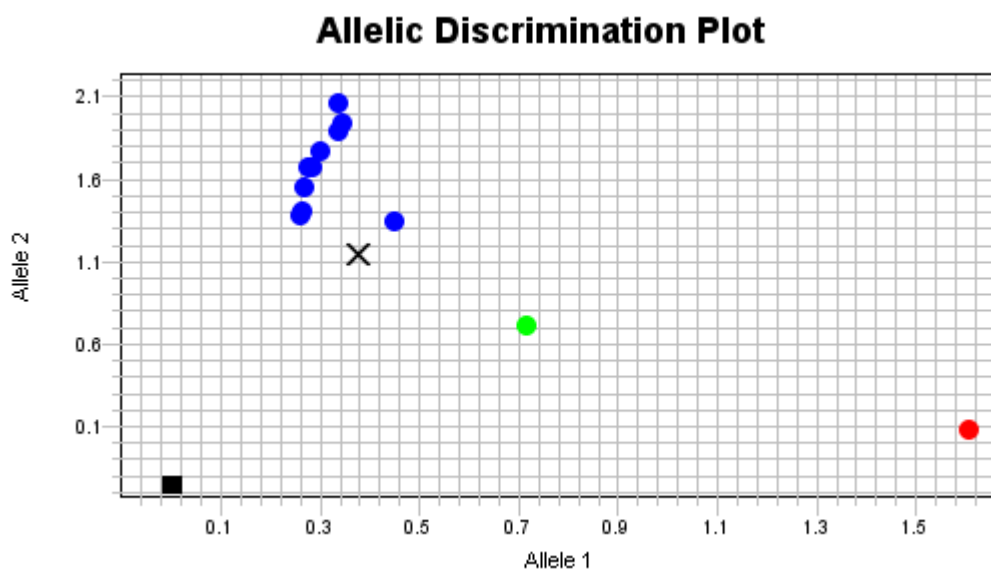


Figura 26: Gráfico de discriminação alélica do polimorfismo rs17366568 do gene *ADIPOQ*. Os círculos em azul representam os indivíduos homocigotos selvagens (GG), os verdes heterocigotos (AG) e em vermelho os homocigotos mutados (AA). O X representa uma amostra que não teve amplificação e o quadrado o controle negativo da reação.

Com base nas análises do PCR em tempo real, obtivemos as frequências genotípicas e alélicas do grupo de eutróficos e obesos (Tabela 12), sendo que em ambos os casos, o genótipo mais frequente foi o homocigoto selvagem (GG). Ademais, os resultados mostraram que não há diferenças significativas nas frequências genotípicas ($\chi_{(2)}^2 = 2,76; p = 0,25$) e alélicas ($\chi_{(1)}^2 = 1,11; p = 0,29$) entre os grupos. Em relação à Teoria de Hardy-Weinberg, os genótipos de ambos os grupos não se mostraram em equilíbrio (obesos: $\chi_{(2)}^2 = 40,80; p < 0,00$; eutróficos: $\chi_{(2)}^2 = 12,74; p < 0,00$).

Tabela 12: Frequências genóticas e alélicas do polimorfismo rs17366568 do gene *ADIPOQ* e associação à obesidade.

	Grupos			<i>p</i>
	Total	Eutróficos	Obesos	
Genótipo				
GG	203 (83,2)	86 (79,6)	117 (86,0)	
GA	27 (11,1)	16 (14,8)	11 (8,1)	0,25
AA	14 (5,7)	6 (5,6)	8 (5,9)	
Alelo				
G	0,89	0,87	0,90	0,29
A	0,11	0,13	0,10	

Os valores são apresentados na forma de frequência e porcentagem. O *p*-valor é referente aos testes de homogeneidade entre os genótipos e alelos dos eutróficos e obesos.

Diversos parâmetros antropométricos, pressóricos e bioquímicos mostraram variações na nossa amostra. Para uma melhor compreensão se os genótipos do polimorfismo rs17366568 influenciam na diferença entre estas variáveis realizamos o teste estatístico ANOVA (distribuição normal) e Kruskal-Wallis (distribuição não normal) com todos os indivíduos. De acordo com os resultados apresentados na tabela 13, observou-se apenas uma tendência de diminuição da glicose na presença do alelo mutado (A), mas não foi significativa. Com relação aos outros fatores é sugerido que estes genótipos não exercem influência ($p > 0,05$).

Tabela 13: Variáveis antropométricas e hemodinâmicas em relação ao polimorfismo rs17366568 do gene *ADIPOQ* na amostra total.

	Genótipos						P
	n	GG	n	GA	n	AA	
Peso	203	98,7±38,4	27	85,9±34,5	14	103,9±46,0	0,22
IMC (kg/m²)	203	38,4 (23,2; 48,9)	27	31,5 (22,1; 44,7)	14	23,92 (23,0; 48,9)	0,29
Circ. Abdominal (cm)	201	116,0 (86,0; 139,0)	27	101,3 (80,5; 124,8)	14	85,5 (76,0; 139,0)	0,20
Circ. de quadril (cm)	201	126,5 (102,0; 143,0)	27	116,5 (97,5; 141,6)	14	105,0 (102,0; 143,0)	0,23
Razão cintura/quadril (cm)	201	0,90 (0,83; 0,97)	27	0,89 (0,79; 1,01)	14	0,82 (0,75; 0,97)	0,24
iIMC (cm²/kg)	201	126,4 (108,6; 147,2)	27	126,2 (107,5; 157,8)	14	115,9 (98,2; 132,1)	0,44
PAS (mmHg)	151	126,2±20,6	23	122,6±20,8	11	131,1±20,6	0,52
PAD (mmHg)	151	81,2±14,7	23	80,8±11,7	11	82,0±15,6	0,98
Glicose (mg/dL)	148	97,0 (89,0; 107,0)	23	93,0 (88,0; 97,8)	9	88,0 (82,0; 92,0)	0,08
Colesterol total (mg/dL)	170	192,1±42,0	26	195,4±40,3	10	193,2±27,6	0,93
HDL - Colesterol (mg/dL)	179	49,0 (43,0; 57,0)	26	48,0 (41,5; 67,0)	10	59,0 (44,0; 64,0)	0,42
LDL - Colesterol (mg/dL)	166	113,4±34,8	25	116,9±36,2	10	113,3±19,2	0,90
VLDL - Colesterol (mg/dL)	166	22,0 (16,0; 31,0)	25	20,0 (15,3; 28,0)	10	23,0 (17,0; 28,0)	0,80
Triglicerídeos (mg/dL)	170	108,0 (79,0; 154,0)	25	100,5 (74,25; 139,5)	10	114,0 (86,0; 140,0)	0,61
Proteína C reativa (mg/dL)	117	0,60 (0,23; 1,45)	15	0,61 (0,26; 1,20)	8	0,26 (0,16; 1,71)	0,90
Hemoglobina glicada (%)	99	4,8 (4,5; 5,4)	12	4,8 (4,5; 5,8)	7	4,6 (4,8; 5,6)	0,95

Legenda: PAS – pressão arterial sistólica; PAD – pressão arterial diastólica; IMC – índice de massa corpóreo; iIMC – índice de massa corporal invertido

Nota: Os valores representam média ± desvio padrão para variáveis com distribuição normal ou mediana (percentil 25; percentil 75), para variáveis sem distribuição normal.

O *p*-valor é referente às diferenças entre as médias (variáveis com distribuição normal) ou medianas (variáveis sem distribuição normal).

Avaliações estatísticas adicionais para o polimorfismo estudado, utilizando apenas os dados das variáveis dos eutróficos, podem ser observadas na tabela 14. Neste modelo, não foram encontradas influência do SNP nas variáveis ($p > 0,05$).

Tabela 14: Diferença entre as variáveis em relação ao polimorfismo rs17366568 do gene *ADIPOQ* no grupo de eutróficos.

	Genótipos						<i>p</i>
	n	GG	n	GA	n	AA	
Peso	86	63,06±9,71	16	61,89±7,01	6	61,90±9,05	0,87
IMC (kg/m²)	86	22,4 (20,9; 23,9)	16	22,7 (20,9; 23,4)	6	23,5 (22,2; 24,8)	0,40
Circ. Abdominal (cm)	86	82,0 (74,0; 85)	16	97,8 (95,5; 99,4)	6	81,2 (75,5; 91,0)	0,81
Circ. de quadril (cm)	86	98,8 (93,0; 102,0)	16	97,0 (95,0; 99,3)	6	102,5 (98,5; 104,6)	0,21
Razão cintura/quadril (cm)	86	0,83 (0,78; 0,88)	16	0,82 (0,74; 0,89)	6	0,79 (0,75; 0,90)	0,72
iIMC (cm²/kg)	86	104,9 (93,8; 113,5)	16	102,8 (91,8; 116,0)	6	104,9 (98,1; 122,6)	0,78
PAS (mmHg)	76	116,25±12,94	14	117,50±10,88	6	118,83±10,55	0,85
PAD (mmHg)	76	76,25±10,13	14	78,07±10,16	6	75,0±10,81	0,78
Glicose (mg/dL)	79	91,0 (84,0; 97,0)	16	89,0 (84,0; 92,0)	6	87,0 (79,8; 97,5)	0,42
Colesterol total (mg/dL)	79	181,29±33,82	16	197,88±43,24	6	183,33±25,45	0,23
HDL - Colesterol (mg/dL)	79	59,0 (46,0; 69,0)	16	62,5 (52,3; 72,0)	6	59,5 (50,5; 75,5)	0,47
LDL - Colesterol (mg/dL)	78	103,43±31,17	16	114,66±36,66	6	102,77±13,12	0,42
VLD - Colesterol (mg/dL)	78	16,0 (13,0; 22,0)	16	16,5 (14,0; 24,5)	6	16,5 (14,8; 21,5)	0,72
Triglicerídeos (mg/dL)	79	80,0 (65,0; 108,0)	16	82,5 (70,3; 121,0)	6	83,5 (73,8; 106,5)	0,75
Proteína C reativa (mg/dL)	33	0,19 (0,07; 0,33)	6	0,21 (0,01; 0,40)	4	0,2 (0,05; 0,26)	0,79
Hemoglobina Glicada (%)	35	4,7 (4,4; 5,1)	5	4,5 (4,5; 4,8)	4	4,8 (4,6; 5,0)	0,74

Legenda: PAS – pressão arterial sistólica; PAD – pressão arterial diastólica; IMC – índice de massa corpóreo; iIMC – índice de massa corporal invertido

Nota: Os valores representam média ± desvio padrão para variáveis com distribuição normal ou mediana (percentil 25; percentil 75), para variáveis sem distribuição normal.

O *p*-valor é referente às diferenças entre as médias (variáveis com distribuição normal) ou medianas (variáveis sem distribuição normal).

As variáveis quantitativas dos obesos, também foram avaliadas em relação ao polimorfismo estudado (Tabela 15), mas não foram encontrados resultados estatisticamente significativos ($p > 0,05$).

Tabela 15: Diferença entre as variáveis em relação ao polimorfismo rs17366568 do gene *ADIPOQ* no grupo de obesos.

	Genótipos						<i>p</i>
	n	GG	n	GA	n	AA	
Peso	117	124,9±29,5	11	121,0±27,4	8	135,6±34,9	0,55
IMC (kg/m²)	117	45,2 (39,7; 50,9)	11	44,9 (39,1; 53,9)	8	48,8 (38,5; 54,0)	0,77
Circ. Abdominal (cm)	115	133,0 (119,0; 145,0)	11	127,0 (119,0; 145,0)	8	139,5 (130,6; 147,5)	0,53
Circ. de quadril (cm)	115	140,0 (128,0; 150,0)	11	148,0 (122,0; 158,0)	8	147,5 (137,0; 155,8)	0,46
Razão cintura/quadril (cm)	115	0,97 (0,91; 1,01)	11	0,93 (0,86; 0,99)	8	0,94 (0,92; 0,98)	0,62
iIMC (cm²/kg)	115	145,7 (131,5; 159,0)	11	149,5 (115,1; 162,0)	8	139,9 (130,4; 158,1)	0,98
PAS (mmHg)	75	136,38±21,9	9	130,6±29,7	5	145,8±20,7	0,49
PAD (mmHg)	75	86,1±16,9	9	85,1±13,2	5	90,4±17,3	0,84
Glicose (mg/dL)	69	99,0 (89,0; 110,5)	7	93,0 (88,0; 108,0)	3	88,0 (88,0)	0,50
Colesterol total (mg/dL)	91	201,4±46,2	10	191,4±36,8	4	208,0±26,8	0,76
HDL - Colesterol (mg/dL)	91	49,0 (42,0; 54,0)	10	44,0 (39,5; 48,0)	4	54,0 (36,5; 74,5)	0,23
LDL - Colesterol (mg/dL)	88	122,2±35,6	9	120,8±37,1	4	129,0±16,5	0,92
VDL - Colesterol (mg/dL)	88	26,5 (19,0; 36,0)	9	24,0 (17,0; 37,0)	4	26,5 (16,8; 28,8)	0,8
Triglicerídeos (mg/dL)	91	138,0 (96,0; 185,0)	10	131,5 (86,3; 248,8)	4	132,5 (84,5; 144,5)	0,81
Proteína C reativa (mg/dL)	84	1,06 (0,57; 1,89)	9	1,2 (0,61; 1,60)	4	1,9 (0,81; 2,81)	0,47
Hemoglobina Glicada (%)	64	5,1 (4,6; 5,6)	7	5,5 (4,5; 6,2)	3	5,6 (4,6)	0,58

Legenda: PAS – pressão arterial sistólica; PAD – pressão arterial diastólica; IMC – índice de massa corpóreo; iIMC – índice de massa corporal invertido.

Nota: Os valores representam média ± desvio padrão para variáveis com distribuição normal ou mediana (percentil 25; percentil 75), para variáveis sem distribuição normal.

O *p*-valor é referente às diferenças entre as médias (variáveis com distribuição normal) ou medianas (variáveis sem distribuição normal).

A prevalência da DT2, hipertensão e a SM na amostra de obesos, foram analisadas em relação ao polimorfismo rs17366568 do gene *ADIPOQ* (Tabela 16). Entretanto, não observamos resultados significativos.

Tabela 16: Análise da influência do polimorfismo rs17366568 do gene *ADIPOQ* na presença das características clínicas da amostra.

Genótipo	Obesos				P
	<i>Diabetes</i>				
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
GG	30	88,2	86	85,1	0,69
GA	3	8,8	8	7,9	
AA	1	2,9	7	6,9	
	<i>Hipertensão</i>				
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
GG	78	89,7	39	79,6	0,26
GA	5	5,7	6	12,2	
AA	4	4,6	4	8,2	
	<i>Síndrome Metabólica</i>				
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
GG	71	88,8	25	83,3	0,64
GA	6	7,5	4	13,3	
AA	3	3,8	1	3,3	

Nota: Os dados mostram os números de observações e a porcentagem.
O P-valor é referente ao teste χ^2 com dois graus de liberdade.

4.2.1.2 Polimorfismo rs182052 (c.-60+244G>A)

As amostras foram analisadas para o polimorfismo rs182052 que está localizado no intron 1 do gene *ADIPOQ*. Esta análise foi realizada através da técnica de PCR em tempo real, utilizando sondas de hidrólise (Taqman). Alguns dos resultados obtidos podem ser visualizados na figura 27 e 28.

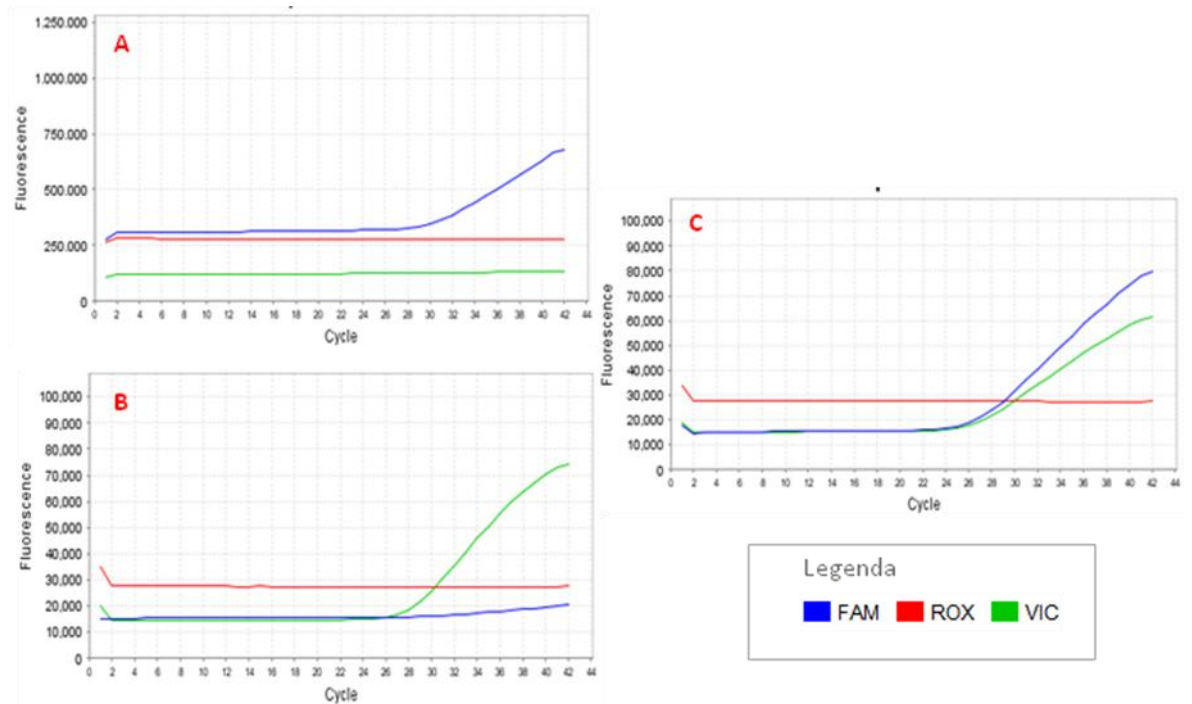


Figura 27: Gráficos de multicomponentes do polimorfismo rs182052 do gene *ADIPOQ*. O fluoróforo FAM (azul) detecta o alelo selvagem (G), o VIC o alelo mutado (A) e o ROX é a referência passiva. A) homozigoto selvagem (GG), B) homozigoto mutado (AA) e C) heterozigoto (GA).

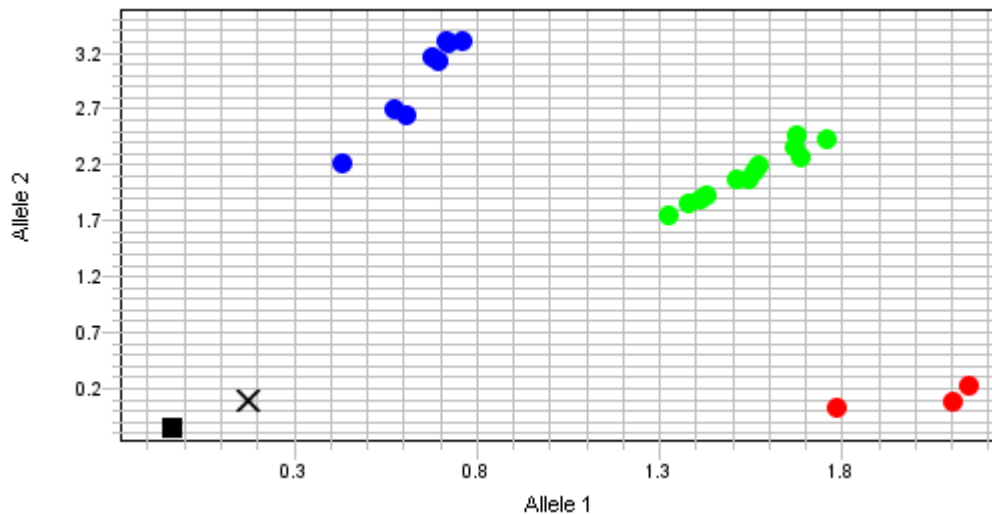


Figura 28: Gráfico de discriminação alélica do polimorfismo rs182052 do gene *ADIPOQ*. Os pontos em azul representam indivíduos homocigotos selvagens (GG), os em verde são heterocigotos (GA) e os vermelhos são homocigotos mutados (AA). O X representa uma amostra que não teve amplificação e o quadrado o controle negativo da reação.

A partir da análise dos gráficos de resultados, foram obtidas às frequências genotípicas e alélicas (Tabela 17). Sendo observado um aumento na frequência de heterocigotos (GA) nos obesos (50%), mas ao contrapor com os controles (44,4%), este aumento não foi significativo ($\chi_{(2)}^2 = 2,40$; $p = 0,30$). Também não foram encontradas diferenças nas frequências dos alelos entre os dois grupos estudados ($\chi_{(1)}^2 = 2,22$; $p = 0,14$). Além disso, a distribuição genotípica na amostra obedeceu ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (obesos: $\chi_{(2)}^2 = 0,98$; $p = 0,61$; eutróficos: $\chi_{(2)}^2 = 0,47$; $p = 0,79$).

Tabela 17: Frequências genóticas, alélicas e associação à obesidade do polimorfismo rs182052 do gene *ADIPOQ*

Genética	Grupos			<i>p</i>
	Total	Eutróficos	Obesos	
Genótipo				
GG	105 (43,0)	52 (48,1)	53 (39,0)	0,30
GA	116 (47,5)	48 (44,4)	68 (50,0)	
AA	23 (9,4)	8 (7,4)	15 (11,0)	
Alelos				
G	0,67	0,70	0,64	0,14
A	0,33	0,30	0,36	

Os valores são apresentados na forma de frequência e porcentagem.
O *p*-valor é referente aos testes de homogeneidade entre os genótipos e alelos dos eutróficos e obesos.

O comportamento das variáveis antropométricas, pressóricas e bioquímicas em relação ao polimorfismo estudado na amostra total, é mostrado na tabela 18.

Tabela 18: Diferença entre as variáveis em relação ao polimorfismo rs182052 do gene *ADIPOQ* na amostra total.

	Genótipos						p
	n	GG	n	GA	n	AA	
Peso	105	91,49±35,29	116	101,50±39,58	23	105,57±44,97	0,9
IMC (kg/m²)	105	30,1 (21,7; 44,9)	116	37,8 (23,1; 47,1)	23	35,3 (24,4; 49,9)	0,10
Circ. Abdominal (cm)	105	98,0 (79,0; 135,3)	114	112,0 (84,0 136,0)	23	109,5 (92,0; 142,0)	0,08
Circ. de quadril (cm)	105	111,5 (97,0; 137,8)	114	121,8 (100,9; 143,1)	23	119,0 (102,60; 150,0)	0,05
Razão cintura/quadril (cm)	105	0,89 (0,80; 0,97)	114	0,91 (0,83; 0,97)	23	0,92 (0,86; 0,96)	0,39
iIMC (cm²/kg)	105	120,0 (101,8; 146,3)	114	130,4 (108,5; 149,5)	23	129,9 (111,2; 157,4)	0,22
PAS (mmHg)	76	123,80±18,83	90	128,38±22,55	19	123,95±16,38	0,32
PAD (mmHg)	76	80,92±14,17	90	81,70±15,04	19	79,58±12,09	0,83
Glicose (mg/dL)	81	90,0 (85,5; 97,0)	83	95,0 (87,0; 103,0)	16	92,5 (87,3; 99,3)	0,27
Colesterol total (mg/dL)	93	196,42±43,32	93	188,26±39,51	20	194,25±37,15	0,39
HDL - Colesterol (mg/dL)	93	53,0 (46,0; 66,5)	93	51,0 (43,0; 60,0)	20	48,5 (42,5; 60,3)	0,10
LDL - Colesterol (mg/dL)	91	114,01±34,97	91	113,78±34,27	19	113,15±32,42	1,00
VDL - Colesterol (mg/dL)	91	21,0 (15,0; 28,0)	91	20,0 (14,8; 31,0)	19	18,0 (16,8; 29,0)	0,99
Triglicerídeos (mg/dL)	93	108,0 (75,5; 144,0)	91	102,0 (73,5; 156,5)	20	89,5,0 (84,0; 161,0)	0,95
Proteína C reativa (mg/dL)	56	0,73 (0,28; 1,44)	69	0,81 (0,24; 1,63)	15	0,51 (0,30; 1,22)	0,83
Hemoglobina Glicada (%)	47	4,8 (4,4; 5,3)	59	4,9 (4,6; 5,5)	12	5,0 (4,6; 5,6)	0,70

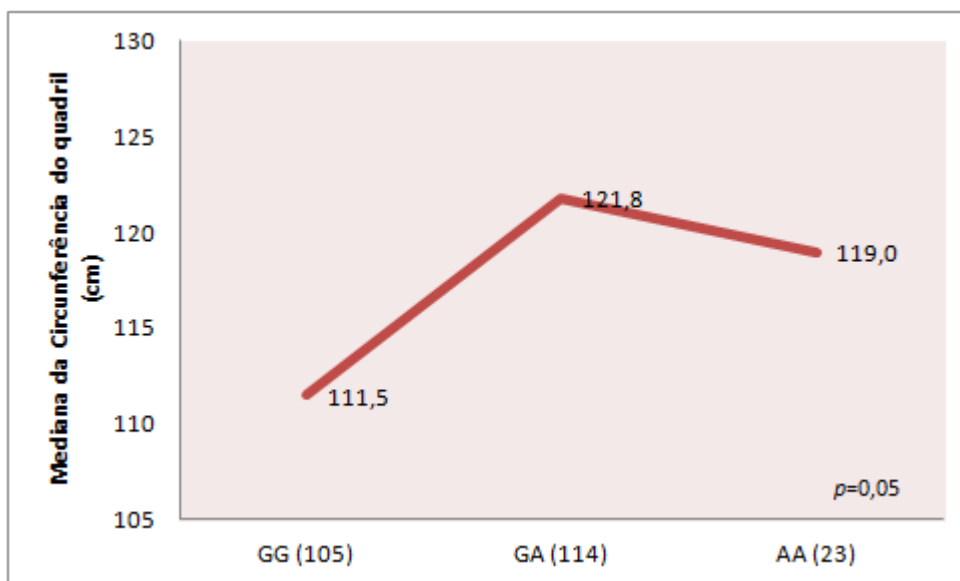
Legenda: PAS – pressão arterial sistólica; PAD – pressão arterial diastólica; IMC – índice de massa corpóreo; iIMC – índice de massa corporal invertido

Nota: Os valores representam média ± desvio padrão para variáveis com distribuição normal ou mediana (percentil 25; percentil 75), para variáveis sem distribuição normal.

O p-valor é referente às diferenças entre as médias (variáveis com distribuição normal) ou medianas (variáveis sem distribuição normal).

Os resultados sugerem uma influência deste polimorfismo na circunferência do quadril e uma tendência no IMC, na circunferência abdominal e no HDL colesterol. Nestes parâmetros antropométricos e no bioquímico, há um perfil de aumento das variáveis na presença do alelo mutado (A), com exceção do HDL colesterol que há um perfil inverso. O gráfico 1 mostra bem esse perfil de aumento na circunferência do quadril.

Gráfico 1: Variação da circunferência do quadril em relação ao polimorfismo rs182052 do gene *ADIPOQ* na amostra total.



As variações dos mesmos fatores quantitativos foram submetidas a novas análises para investigar se os genótipos influenciam nas diferenças dentro do grupo de eutróficos, como mostrado na tabela 19.

Tabela 19: Diferença entre as variáveis em relação ao polimorfismo rs182052 do gene *ADIPOQ* na amostra de eutróficos.

	Genótipos						P
	n	GG	n	GA	n	AA	
Peso	52	61,0±8,50	48	64,12±10,03	8	66,93±7,49	0,10
IMC (kg/m²)	52	21,0 (19,4; 23,1)	48	22,9 (21,9; 23,3)	8	23,7 (22,6; 24,8)	0,11
Circ. Abdominal (cm)	52	79,0 (74,0; 85,3)	48	82,5 (76,0; 86,0)	8	90,3 (76,8; 94,4)	0,03
Circ. de quadril (cm)	52	98,5 (94,9; 101,1)	48	100,5 (98,5; 105,0)	8	104,0 (100,5; 197,9)	0,02
Razão cintura/quadril (cm)	52	0,80 (0,78; 0,84)	48	0,83 (0,78; 0,84)	8	0,84 (0,75; 0,92)	0,36
iIMC (cm²/kg)	52	105,1 (96,6; 113,7)	48	105,7 (98,2; 113,4)	8	109,9 (93,2; 117,8)	0,33
PAS (mmHg)	45	114,98±9,88	43	117,37±14,57	8	121,50±12,88	0,34
PAD (mmHg)	45	75,33±10,54	43	77,02±10,13	8	79,50±6,87	0,50
Glicose (mg/dL)	49	90,5 (79,8; 97,0)	44	95,0 (88,0; 99,0)	8	89,0 (86,3; 92,5)	0,36
Colesterol total (mg/dL)	49	186,18±36,29	44	180,93±33,59	8	188,0±40,87	0,74
HDL - Colesterol (mg/dL)	49	60,5 (49,8; 69,0)	44	56,0 (45,0; 69,0)	8	52,0 (40,5; 59,0)	0,49
LDL - Colesterol (mg/dL)	48	104,54±30,77	44	104,15±30,41	8	114,84±42,22	0,67
VLD - Colesterol (mg/dL)	48	20,0 (11,5; 25,5)	44	16,0 (14,0; 21,0)	8	17,0 (15,5; 20,8)	0,93
Triglicerídeos (mg/dL)	49	98,5 (57,0; 127,0)	44	81,0 (69,0; 104,0)	8	85,0 (77,3; 102,5)	0,53
Proteína C reativa (mg/dL)	15	0,24 (0,05; 0,33)	24	0,19 (0,03; 0,35)	4	0,24 (0,11; 0,33)	0,92
Hemoglobina Glicada (%)	16	4,6 (4,4; 4,7)	24	4,7 (4,5; 5,0)	4	4,7 (4,4; 5,4)	0,59

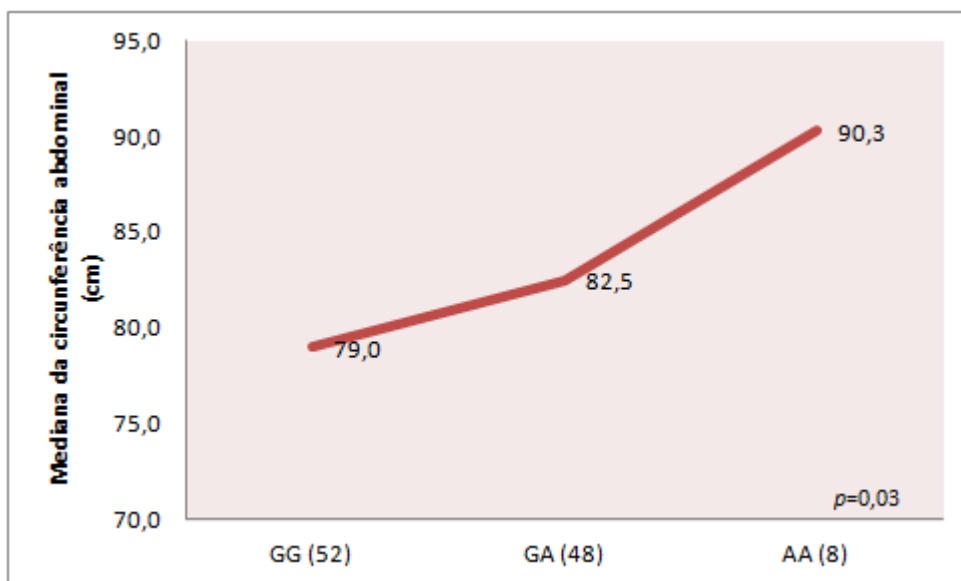
Legenda: PAS – pressão arterial sistólica; PAD – pressão arterial diastólica; IMC – índice de massa corpóreo; iIMC – índice de massa corporal invertido

Nota: Os valores representam média ± desvio padrão para variáveis com distribuição normal ou mediana (percentil 25; percentil 75), para variáveis sem distribuição normal.

O *p*-valor é referente às diferenças entre as médias (variáveis com distribuição normal) ou medianas (variáveis sem distribuição normal).

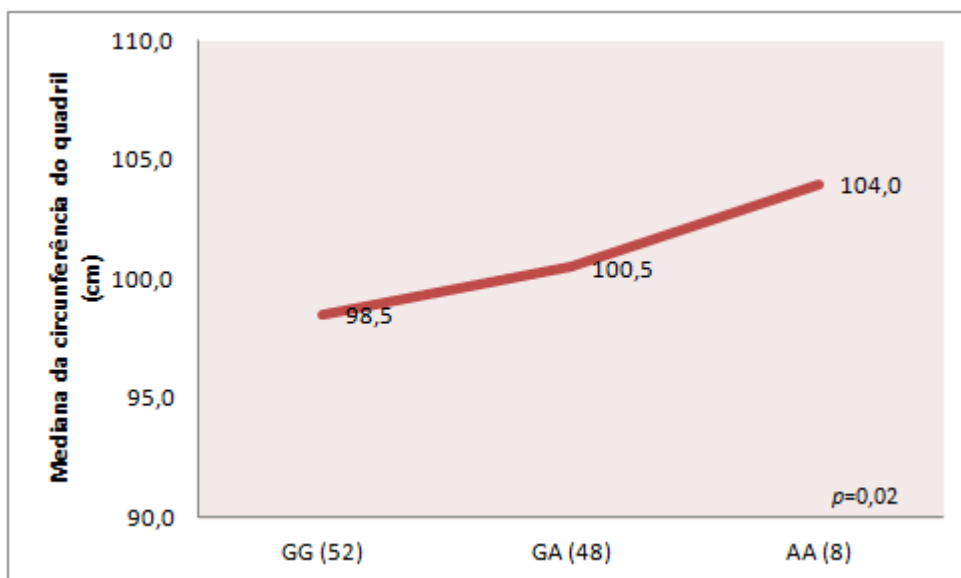
Nesta amostra, há diferenças significativas entre as medianas da circunferência abdominal (Gráfico 2) em relação aos genótipos, apresentando um perfil de aumento desta circunferência na presença do alelo mutante (A). Tendo o homocigoto mutado (AA) os maiores valores.

Gráfico 2: Comportamento da circunferência abdominal em relação ao polimorfismo rs182052 do gene *ADIPOQ* na amostra de eutróficos.



Neste grupo de eutróficos, também há diferenças significativas entre as medianas da circunferência do quadril (Gráfico 3) em relação aos genótipos, apresentando um perfil de aumento destas circunferências na presença do alelo mutante (A). Além disso, também há uma tendência de aumento do peso na presença deste alelo. Em todas essas variáveis, o genótipo homozigoto mutado (AA) apresentou os maiores valores.

Gráfico 3: Comportamento da circunferência do quadril em relação ao polimorfismo rs182052 do gene *ADIPOQ* na amostra de eutróficos.



As variações dos mesmos fatores quantitativos foram submetidas a novas análises para avaliar se os genótipos influenciam nas diferenças dentro do grupo de obesos, como mostrado na tabela 20. Mas, neste grupo não foram encontrados resultados significativos ($p>0,05$).

Tabela 20: Diferença entre as variáveis em relação ao polimorfismo rs182052 do gene *ADIPOQ* na amostra de obesos.

	Genótipos						<i>P</i>
	n	GG	n	GA	n	AA	
Peso	53	121,41±24,05	68	127,89±30,18	15	126,19±42,90	0,49
IMC (kg/m²)	53	44,8 (38,8; 49,7)	68	45,9 (39,2; 55,4)	15	49,9 (35,5; 51,7)	0,57
Circ. Abdominal (cm)	53	130,0 (115,0; 140,0)	66	129,3 (119,5; 149,5)	15	130,0 (106,8; 152,8)	0,65
Circ. de quadril (cm)	53	134,0 (126,5; 147,8)	66	141,0 (125,8; 155,0)	15	145,5 (119,8; 151,8)	0,48
Razão cintura/quadril (cm)	53	0,96 (0,88; 1,01)	66	0,96 (0,89; 1,02)	15	0,93 (0,87; 1,02)	0,78
iIMC (cm²/kg)	53	141,6 (126,7; 154,3)	66	142,7 (128,5; 155,8)	15	125,7 (113,0; 141,4)	1,00
PAS (mmHg)	31	136,61±21,36	47	138,45±23,95	11	125,73±18,94	0,25
PAD (mmHg)	31	89,03±14,98	47	85,98±17,46	11	79,64±15,17	0,26
Glicose (mg/dL)	32	97,0 (88,5; 110,0)	39	100,5 (89,5; 108,8)	8	93,5 (89,0; 109,8)	0,93
Colesterol total (mg/dL)	44	207,82±47,88	49	194,84±43,46	12	198,42±35,68	0,37
HDL - Colesterol (mg/dL)	44	48,0 (41,5; 54,0)	49	46,0 (41,0; 51,8)	12	44,0 (40,8; 49,0)	0,27
LDL - Colesterol (mg/dL)	43	124,58±36,66	47	122,80±35,52	11	111,91±25,30	0,56
VLD - Colesterol (mg/dL)	43	25,0 (18,0; 32,0)	47	24,0 (17,3; 31,8)	11	26,5 (19,3; 41,3)	0,99
Triglicerídeos (mg/dL)	44	123,0 (89,5; 159,0)	49	120,5 (86,8; 157,8)	12	133,0 (95,3; 207,3)	0,92
Proteína C reativa (mg/dL)	41	1,0 (0,51; 1,74)	45	1,25 (0,61; 2,01)	11	0,79 (0,56; 1,42)	0,37
Hemoglobina Glicada (%)	31	5,0 (4,4; 5,6)	35	5,1 (4,6; 5,8)	8	5,1 (4,8; 5,6)	0,93

Legenda: PAS – pressão arterial sistólica; PAD – pressão arterial diastólica; IMC – índice de massa corpóreo; iIMC – índice de massa corporal invertido

Nota: Os valores representam média ± desvio padrão para variáveis com distribuição normal ou mediana (percentil 25; percentil 75), para variáveis sem distribuição normal.

O *p*-valor é referente às diferenças entre as médias (variáveis com distribuição normal) ou medianas (variáveis sem distribuição normal).

Ademais, investigamos o comportamento destas variáveis dentro do grupo de obesos, utilizando apenas os indivíduos com obesidade mórbida ($IMC \geq 40,0$) (Tabela 21).

Tabela 21: Variáveis em relação ao polimorfismo rs182052 do gene *ADIPOQ* na amostra de obesos mórbidos.

	Genótipos						p
	n	GG	n	GA	n	AA	
Peso	41	129,33±20,73	51	138,08±27,29	9	152,10±36,07	0,04
IMC (kg/m²)	41	48,9 (43,1; 50,7)	51	48,5 (45,3; 62,6)	9	51,5 (49,9; 67,2)	0,05
Circ. Abdominal (cm)	41	138,0 (122,0; 146,0)	50	142,5 (138,0; 143,0)	9	143,0 (130,0; 175,5)	0,35
Circ. de quadril (cm)	41	143,0 (132,5; 153,0)	50	143,5 (136,0; 160,0)	9	151,0 (145,5; 168,0)	0,08
Razão cintura/quadril (cm)	41	0,96 (0,90; 1,0)	50	0,97 (0,91; 1,01)	9	0,94 (0,89; 1,05)	0,85
iIMC (cm²/kg)	41	145,7 (131,8; 154,3)	50	145,1 (133,0; 155,6)	9	140,4 (110,3; 156,5)	0,97
PAS (mmHg)	24	139,25±21,72	35	142,86±23,76	6	134,33±10,63	0,63
PAD (mmHg)	24	89,46±18,46	35	87,0±18,46	6	87,83±6,55	0,85
Glicose (mg/dL)	23	97,0 (88,5; 113,0)	26	101,0 (89,0; 109,0)	5	103,0 (91,0; 114,5)	0,41
Colesterol total (mg/dL)	33	206,91±48,99	34	189,12±41,27	7	183,43±26,98	0,19
HDL - Colesterol (mg/dL)	33	46,0 (40,0; 54,0)	34	47,0 (42,0; 52,0)	7	44,0 (41,0; 50,0)	0,76
LDL - Colesterol (mg/dL)	32	122,81±35,74	32	117,91±34,21	7	101,43±22,16	0,33
VLD - Colesterol (mg/dL)	32	27,0 (20,0; 34,0)	32	25,0 (19,0; 31,0)	7	24,0 (20,0; 45,5)	0,99
Triglicerídeos (mg/dL)	33	136,0 (100,0; 168,0)	34	123,0 (96,0; 154,0)	7	120,0 (99,5; 227,0)	0,97
Proteína C reativa (mg/dL)	31	1,31 (0,73; 1,84)	33	1,31 (1,0; 2,43)	7	0,73 (0,43; 1,12)	0,19
Hemoglobina Glicada (%)	23	4,8 (4,4; 6,1)	25	5,5 (4,7; 5,9)	5	5,2 (4,9; 6,0)	0,78

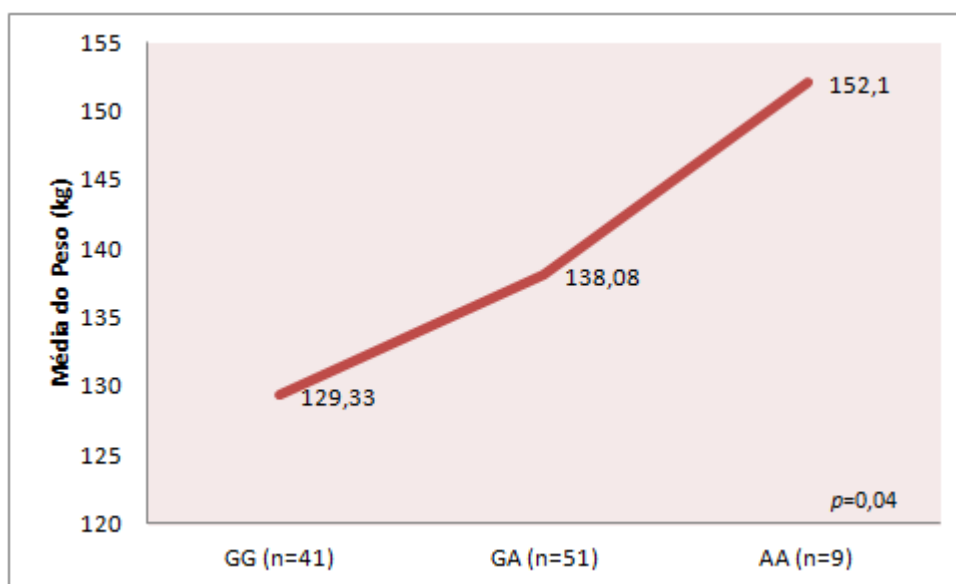
Legenda: PAS – pressão arterial sistólica; PAD – pressão arterial diastólica; IMC – índice de massa corpóreo; iIMC – índice de massa corporal invertido

Nota: Os valores representam média ± desvio padrão para variáveis com distribuição normal ou mediana (percentil 25; percentil 75), para variáveis sem distribuição normal.

O p-valor é referente às diferenças entre as médias (variáveis com distribuição normal) ou medianas (variáveis sem distribuição normal).

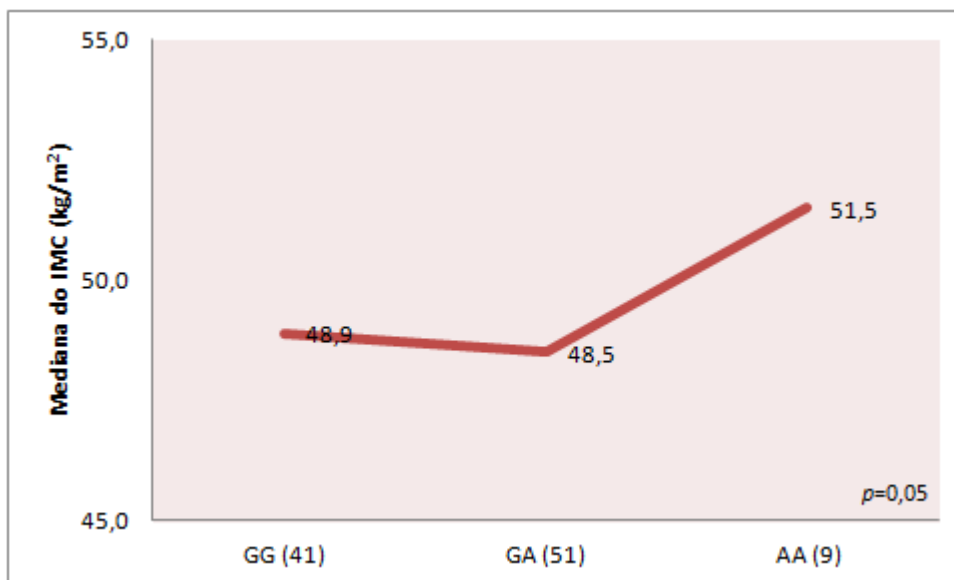
Os resultados sugerem que o SNP influencia na variabilidade do peso (Gráfico 4). Este parâmetro apresenta um aumento nos indivíduos com o alelo mutado (A). Sendo que o genótipo homocigoto mutado (AA) apresentou os maiores valores para esta variável.

Gráfico 4: Variação do peso nos obesos mórbidos em relação ao polimorfismo rs182052 do gene *ADIPOQ*.



Os resultados também sugerem que o SNP influencia na variabilidade do IMC (Gráfico 5) e uma tendência com a circunferência do quadril. Esses parâmetros apresentaram um aumento nos indivíduos homocigotos mutados (AA).

Gráfico 5: Comportamento do IMC em relação ao polimorfismo rs182052 do gene *ADIPOQ* nos obesos mórbidos.



Na amostra também foi analisada uma possível associação dos genótipos deste polimorfismo com a presença de hipertensão, DT2 e SM no grupo de obesos (Tabela 22), mas não foram encontrados resultados sugestivos de uma associação entre eles ($p>0,05$).

Tabela 22: Influência do polimorfismo rs182052 do gene *ADIPOQ* prevalência das comorbidades da amostra de obesos.

Genótipo	Obesos				P
	Diabetes				
	Sim		Não		
	N	%	n	%	
GG	16	47,1	37	36,6	0,39
GA	16	47,1	51	50,5	
AA	2	5,9	13	12,9	
	Hipertensão				
	Sim		Não		
	N	%	n	%	
GG	36	41,4	17	34,7	0,74
GA	42	48,3	26	53,1	
AA	9	10,3	6	12,2	
	Síndrome Metabólica				
	Sim		Não		
	N	%	n	%	
GG	31	38,8	14	46,7	0,75
GA	40	50,0	13	43,3	
AA	9	11,3	3	10,0	

Nota: Os dados mostram os números de observações e a porcentagem.
O P-valor é referente ao teste χ^2 com dois graus de liberdade.

4.2.1.3 – Análise haplotípica entre os polimorfismos do gene *ADIPOQ*

A composição haplotípica dos polimorfismos rs17366568 e rs182052 do gene *ADIPOQ* foram analisados, cujos resultados podem ser observados na tabela 23. Encontramos um aumento do haplótipo AG nos eutróficos, quando comparado aos obesos ($\chi_{(3)}^2 = 11,55$; $p = 0,01$). Análises posteriores mostraram que este haplótipo é um fator de proteção da presença de obesidade na nossa amostra (Odd Ratio [OR] = 0,36; intervalo de confiança de 95% [CI] = 0,18-0,74) (Figura 24). Todavia, foi observado que os alelos não estavam em desequilíbrio de ligação (eutróficos: $\chi_{(3)}^2 = 1,35$; $p = 0,72$; obesos: $\chi_{(3)}^2 = 0,008$; $p = 1,0$).

Tabela 23: Frequências haplotípicas e associação à obesidade dos polimorfismos rs17366568 e rs182052 do gene *ADIPOQ*.

Haplótipos	Grupos			<i>p</i>
	Total	Eutróficos	Obesos	
GG	293 (60,0)	130 (61,6)	163 (58,5)	0,01
GA	140 (28,7)	58 (25,4)	82 (31,6)	
AG	34 (7,0)	23 (9,2)	11 (5,5)	
AA	21 (4,3)	5 (3,7)	16 (4,4)	

Os valores são apresentados na forma de frequência e porcentagem.

O *p*-valor é referente ao teste de homogeneidade entre os haplótipos dos eutróficos e obesos.

Tabela 24: Análise de fator de risco dos haplótipos do gene *ADIPOQ*.

Fator de risco	Amostra		Total
	Obesos	Controles	
AG	11	23	34
Outros	261	193	454
Total	272	216	488

Odd Ratio	0,36	
IC 95%	0,18	0,74
χ^2	7,70	
P	0,005	

4.2.2- Gene *RARRES2*

4.2.2.1 Polimorfismo rs17173608 (c.280-494T>G)

As amostras foram analisadas para o polimorfismo rs17173608 localizado no intron 3 do gene *RARRES2*, pela técnica de PCR em tempo real utilizando sondas Taqman. Alguns dos resultados obtidos podem ser visualizados no gráfico multicomponente (Figura 29) e no de discriminação alélica (Figura 30).

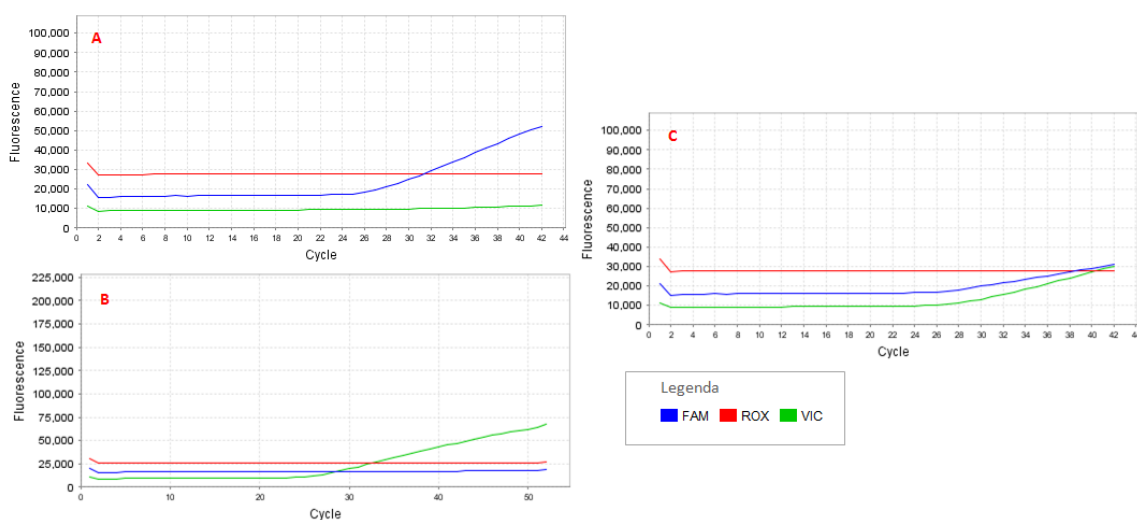


Figura 29: Gráficos multicomponentes dos resultados obtidos pela análise do polimorfismo rs17173608 do gene *RARRES2*. O fluoróforo FAM (azul) detecta o alelo T, o VIC o alelo G e o ROX é a referência passiva. A) homocigoto selvagem (TT), B) homocigoto mutado (GG) e C) heterocigoto (TG).

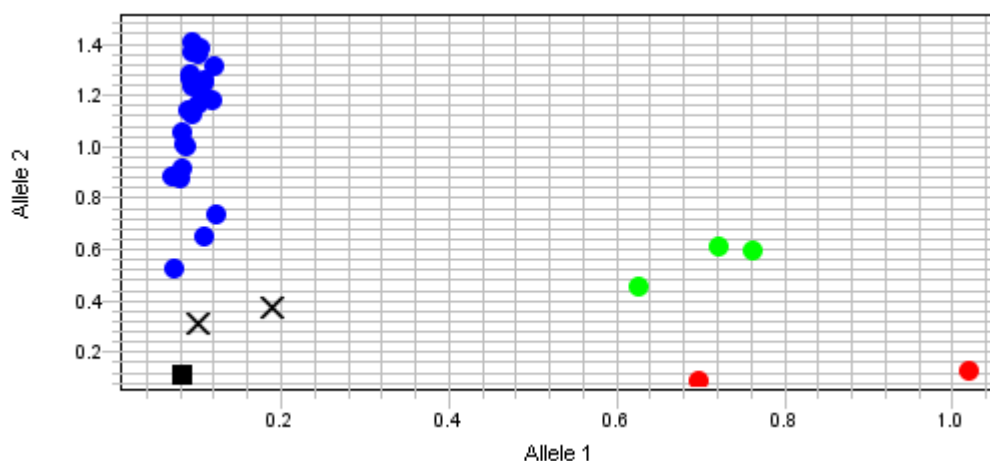


Figura 30: Gráfico de Discriminação Alélica do polimorfismo rs17173608 do gene *RARRES2*. Cada círculo representa o genótipo de um indivíduo. Todos os círculos azuis são indivíduos homocigotos selvagens (TT), os verdes são os heterocigotos (TG) e os vermelhos são os homocigotos mutados (GG). O x representa indivíduos que não amplificaram corretamente, não conseguindo ser analisados pelo programa; o quadrado preto é o controle negativo.

As frequências genotípicas e alélicas foram obtidas por contagem direta (Tabela 25). Neste polimorfismo, o homocigoto mutado (GG) é raro, não sendo encontrado em nenhum eutrófico. Ademais, a amostra é homogênea, pois estas frequências não diferiram entre os dois grupos analisados, sugerindo que este SNP não está associado ao desenvolvimento de obesidade (genotípica: $\chi_{(2)}^2 = 3,47$; $p = 0,18$; alélica: $\chi_{(1)}^2 = 0,009$; $p = 0,92$). Com relação à Teoria de Hardy-Weinberg, o grupo de eutróficos está em equilíbrio ($\chi_{(2)}^2 = 0,89$; $p = 0,64$), mas os genótipos dos obesos apresenta um desvio da distribuição esperada ($\chi_{(2)}^2 = 5,93$; $p = 0,05$).

Tabela 25: Frequência genotípica, alélica e associação do polimorfismo rs17173608 do gene *RARRES2* à obesidade.

Genética	Grupos			P
	Total	Eutróficos	Obesos	
Genótipo				
TT	207 (84,8)	90 (83,3)	117 (86,0)	
TG	34 (13,9)	18 (16,7)	16 (11,8)	0,18
GG	3 (1,2)	0 (0,0)	3 (2,2)	
Alelos				
T	0,918	0,917	0,919	0,92
G	0,082	0,083	0,081	

Os valores são apresentados na forma de frequência e porcentagem.
O p-valor é referente ao teste de homogeneidade entre os genótipos e alelos dos eutróficos e obesos.

As medidas obtidas dos parâmetros antropométricos e hemodinâmicos permitiram analisar a variabilidade destes fatores em relação ao polimorfismo estudado na amostra como um todo (Tabela 26). Devido à raridade do homozigoto mutado (GG), as análises foram realizadas utilizando o modelo dominante (TT versus TG+GG).

Tabela 26: Variação dos parâmetros antropométricos, pressóricos e bioquímicos em relação ao polimorfismo rs17173608 do gene *RARRES2* na amostra total.

	Genótipos				<i>p</i>
	n	TT	n	TG+GG	
Peso	207	98,08±38,53	37	94,77±39,16	0,75
IMC (kg/m²)	207	35,3 (22,8; 46,7)	37	31,4 (23,1; 45,3)	0,87
Circ. Abdominal (cm)	206	109,8 (82,9; 136,3)	36	103,5 (78,3; 130,5)	0,32
Circ. de quadril (cm)	206	116,5 (99,0; 141,3)	36	115,3 (102,3; 141,9)	0,67
Razão cintura/quadril (cm)	206	0,91 (0,83; 0,98)	36	0,86 (0,80; 0,92)	0,01
iIMC (cm²/kg)	206	128,7 (105,2; 149,5)	36	119,2 (109,2; 135,7)	0,28
PAS (mmHg)	160	125,73±20,14	25	128,04±20,14	0,28
PAD (mmHg)	160	80,78±14,46	25	83,60±13,67	0,80
Glicose (mg/dL)	153	92,0 (85,5; 101,0)	27	95,0 (90,0; 105,0)	0,12
Colesterol total (mg/dL)	175	191,22±40,04	31	199,87±46,46	0,22
HDL - Colesterol (mg/dL)	175	51,0 (44,0; 64,0)	31	54,0 (44,0; 60,0)	0,97
LDL - Colesterol (mg/dL)	172	113,4±34,01	29	113,40±34,01	0,61
VLD - Colesterol (mg/dL)	172	20,0 (15,0; 28,0)	29	23,0 (15,4; 34,0)	0,53
Triglicerídeos (mg/dL)	175	104,0 (75,0; 146,0)	31	118,0 (80,0; 177,0)	0,30
Proteína C reativa (mg/dL)	118	0,72 (0,28; 1,50)	22	0,77 (0,26; 1,24)	0,74
Hemoglobina Glicada (%)	98	4,8 (4,5; 5,5)	20	5,0 (4,6; 5,2)	0,92

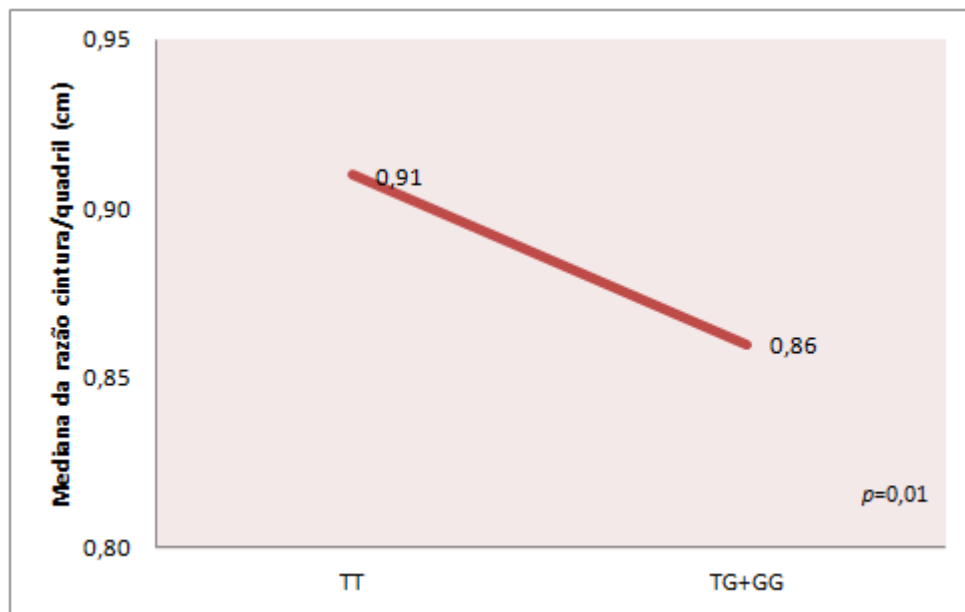
Legenda: PAS – pressão arterial sistólica; PAD – pressão arterial diastólica; IMC – índice de massa corpóreo; iIMC – índice de massa corporal invertido

Nota: Os valores representam média ± desvio padrão para variáveis com distribuição normal ou mediana (percentil 25; percentil 75), para variáveis sem distribuição normal.

O *p*-valor é referente às diferenças entre as médias (variáveis com distribuição normal) ou medianas (variáveis sem distribuição normal).

Os resultados apontam que o polimorfismo influencia no comportamento da RCQ na amostra, sendo que a combinação dos heterozigotos (TG) com os homozigotos mutados (GG) se associaram às menores razões quando comparado aos homozigotos selvagens (Gráfico 6).

Gráfico 6: Comportamento da razão cintura-quadril em relação ao polimorfismo rs17173608 do gene *RARRES2* na amostra total.



Posteriormente, analisamos a variação dos fatores estudados com relação ao polimorfismo rs17173608 no grupo de eutróficos (Tabela 27). Devido à ausência dos homocigotos mutados (GG), os cálculos estatísticos foram baseados apenas no homocigoto selvagem (TT) e heterocigoto (TG).

Tabela 27: Diferença dos parâmetros antropométricos, pressóricos e bioquímicos em relação ao polimorfismo rs17173608 do gene *RARRES2* na amostra de eutróficos.

	Genótipos				P
	n	TT	n	TG	
Peso	90	63,14±9,51	18	61,28±8,04	0,44
IMC (kg/m²)	90	20,9 (22,5; 23,8)	18	23,1 (20,1; 24,0)	0,47
Circ. Abdominal (cm)	90	82,0 (74,0; 86,0)	18	78,5 (76,0; 85,0)	0,72
Circ. de quadril (cm)	90	98,0 (94,0; 101,6)	18	102,5 (94,9; 104,0)	0,05
Razão cintura/quadril (cm)	90	0,83 (0,78; 0,89)	18	0,81 (0,75; 0,84)	0,18
iIMC (cm²/kg)	90	104,0 (93,8; 112,6)	18	109,2 (97,4; 121,8)	0,62
PAS (mmHg)	81	116,11±11,04	15	119,20±18,60	0,38
PAD (mmHg)	81	75,96±9,61	15	79,0±12,46	0,29
Glicose (mg/dL)	85	88,0 (83,0; 95,5)	16	93,5 (90,0; 96,8)	0,04
Colesterol total (mg/dL)	85	182,53±32,70	16	192,06±47,04	0,32
HDL - Colesterol (mg/dL)	85	61,0 (47,5; 69,5)	16	59,0 (46,5; 67,0)	0,61
LDL - Colesterol (mg/dL)	85	104,21±29,47	15	110,76±41,46	0,46
VLDL - Colesterol (mg/dL)	85	16,0 (13,1; 22,0)	15	17,2 (14,0; 23,6)	0,61
Triglicerídeos (mg/dL)	85	79,0 (66,5; 108,0)	16	88,0 (69,8; 127,0)	0,35
Proteína C reativa (mg/dL)	35	0,20 (0,07; 0,31)	8	0,15 (0,02; 0,71)	0,87
Hemoglobina Glicada (%)	35	4,7 (4,5; 4,9)	9	5,0 (4,4; 5,1)	0,47

Legenda: PAS – pressão arterial sistólica; PAD – pressão arterial diastólica; IMC – índice de massa corpóreo; iIMC – índice de massa corporal invertido

Nota: Os valores representam média ± desvio padrão para variáveis com distribuição normal ou mediana (percentil 25; percentil 75), para variáveis sem distribuição normal.

O *p*-valor é referente às diferenças entre as médias (variáveis com distribuição normal) ou medianas (variáveis sem distribuição normal).

Na amostra de eutróficos, encontramos que os indivíduos heterozigotos (TG) possuem medianas maiores da circunferência de quadril (Gráfico 7) e nos níveis de glicose (Gráfico 8) quando comparados aos homozigotos selvagens (TT).

Gráfico 7: Comportamento da circunferência do quadril em relação ao polimorfismo rs17173608 do gene *RARRES2* nos eutróficos.

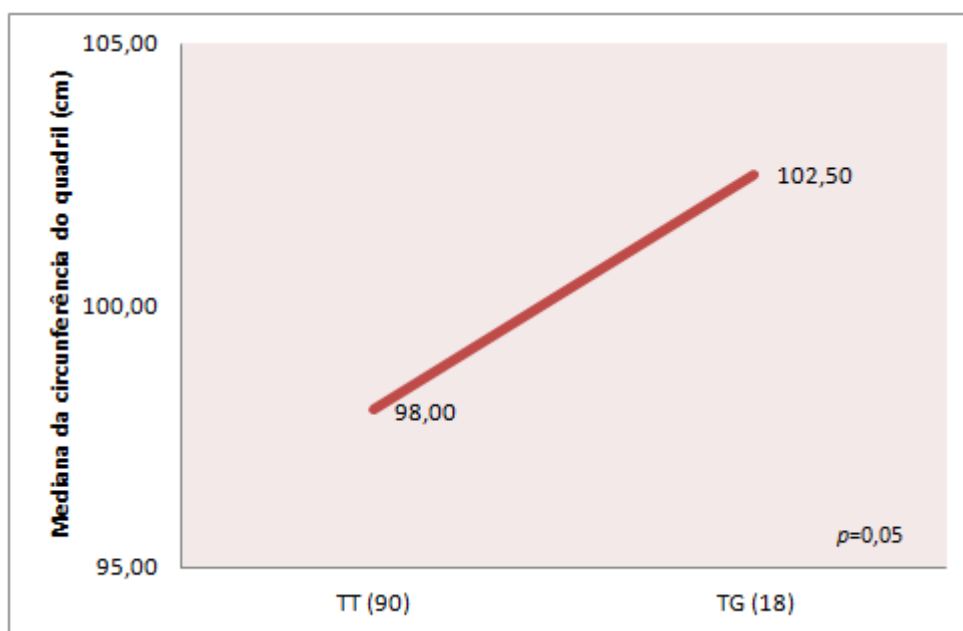
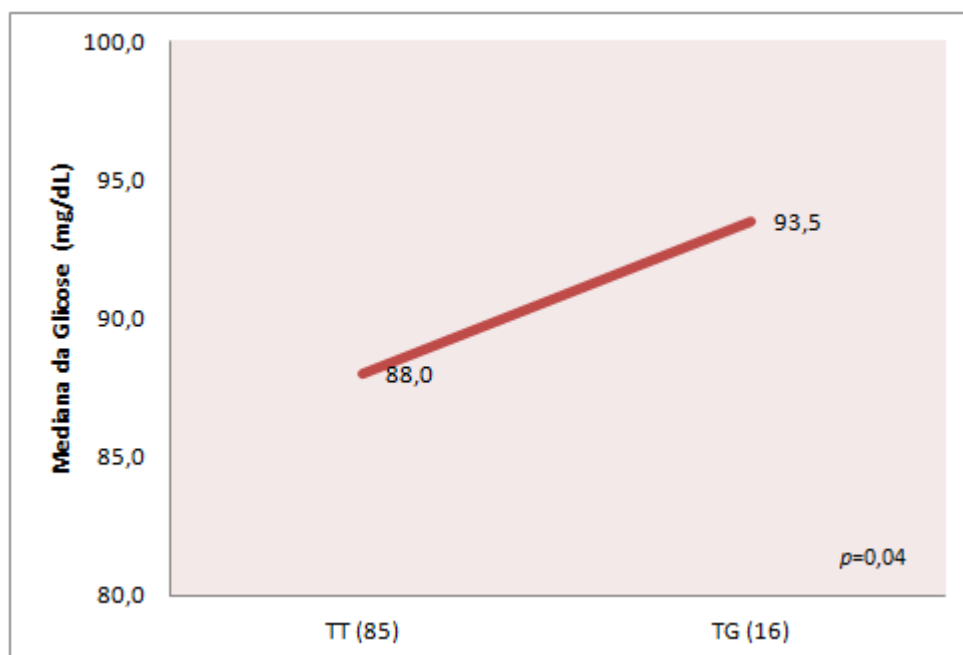


Gráfico 8: Variação dos níveis de glicose em relação ao polimorfismo rs17173608 do gene *RARRES2* nos eutróficos.



Na tabela 28, mostramos as diferenças nos valores das variáveis estudadas entre os genótipos na amostra de obesos. Devido à raridade do homocigoto mutado (GG), as análises foram realizadas utilizando o modelo dominante (TT versus TG+GG).

Tabela 28: Variação dos parâmetros antropométricos, pressóricos e bioquímicos em relação ao polimorfismo rs17173608 do gene *RARRES2* na amostra de obesos.

	Genótipos				P
	n	TT	n	TG+GG	
Peso	117	124,96±29,84	19	126,51±28,65	0,68
IMC (kg/m²)	117	45,3 (39,4; 51,4)	19	45,2 (40,6; 51,0)	0,77
Circ. Abdominal (cm)	116	133,0 (121,1; 145,9)	18	128,0 (115,1; 143,1)	0,44
Circ. de quadril (cm)	116	140,5 (128,0; 150,0)	18	141,8 (130,5; 157,3)	0,34
Razão cintura/quadril (cm)	116	0,97 (0,91; 1,01)	18	0,91 (0,86; 0,95)	<0,01
iIMC (cm²/kg)	116	147,1 (132,5; 160,9)	18	131,0 (118,4; 150,2)	0,03
PAS (mmHg)	79	135,59±22,52	10	141,30±24,14	0,96
PAD (mmHg)	79	85,72±16,82	10	90,5±13,0	0,37
Glicose (mg/dL)	68	97,0 (89,0; 108,0)	11	102,0 (90,0; 109,0)	0,79
Colesterol total (mg/dL)	90	199,43±44,55	15	208,1±45,95	1,00
HDL - Colesterol (mg/dL)	90	48,0 (41,8; 54,3)	15	51,0 (44,0; 54,0)	0,71
LDL - Colesterol (mg/dL)	87	122,39±35,86	14	122,29±30,0	0,48
VLDL - Colesterol (mg/dL)	87	25,0 (18,0; 34,0)	14	32,5 (19,0; 37,0)	0,46
Triglicérides (mg/dL)	90	128,0 (89,8; 180,5)	15	168,0 (97,0; 186,0)	0,37
Proteína C reativa (mg/dL)	83	1,19 (0,56; 1,93)	14	0,92 (0,65; 1,76)	0,88
Hemoglobina Glicada (%)	63	5,1 (4,6; 5,6)	11	5,1 (4,6; 5,7)	0,88

Legenda: PAS – pressão arterial sistólica; PAD – pressão arterial diastólica; IMC – índice de massa corpóreo; iIMC – índice de massa corporal invertido

Nota: Os valores representam média ± desvio padrão para variáveis com distribuição normal ou mediana (percentil 25; percentil 75), para variáveis sem distribuição normal.

O *p*-valor é referente às diferenças entre as médias (variáveis com distribuição normal) ou medianas (variáveis sem distribuição normal).

Na amostra de obesos, a combinação dos heterozigotos (TG) e homozigotos mutados (GG) foram associados à diminuição da RCQ (Gráfico 9) e do iIMC (Gráfico 10), quando comparado aos homozigotos selvagens (TT).

Gráfico 9: Comportamento da razão cintura/quadril em relação ao polimorfismo rs17173608 do gene *RARRES2* nos obesos.

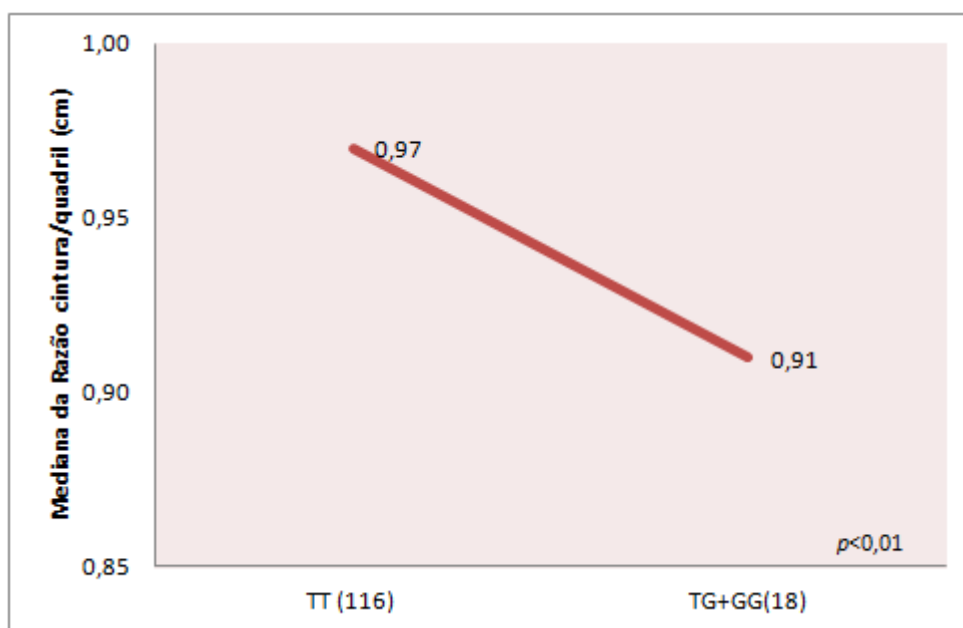
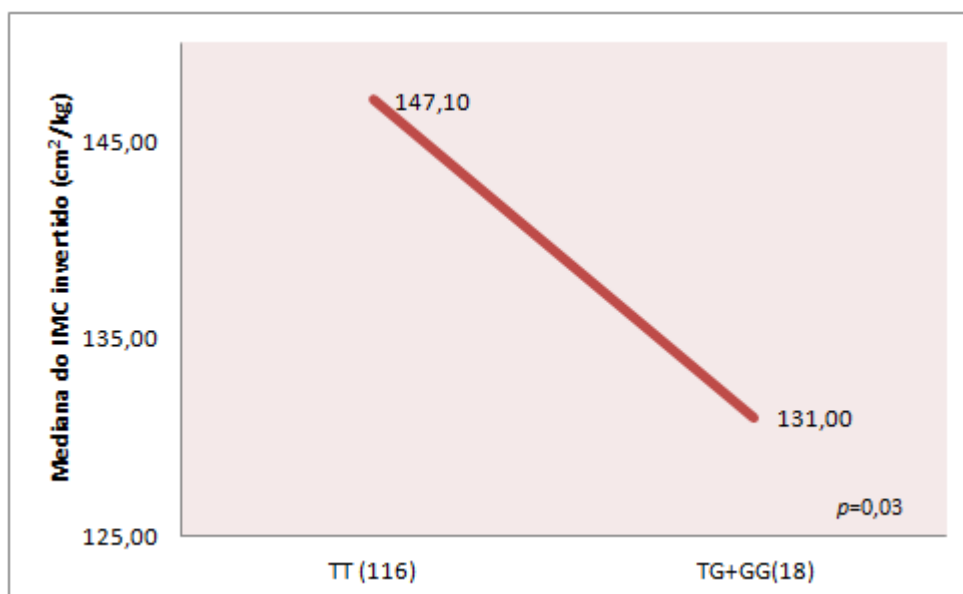


Gráfico 10: Variação do índice de massa corpóreo invertido em relação ao polimorfismo rs17173608 do gene *RARRES2* nos obesos.



Análises do polimorfismo rs17173608 em relação à presença de DT2, hipertensão e SM na amostra de obesos são mostradas na tabela 29. Como podemos observar, não foi encontrada associação destas patologias nos obesos com o polimorfismo estudado.

Tabela 29: Influência do polimorfismo rs17173608 do gene *RARRES2* no desenvolvimento das características clínicas da amostra.

Genótipo	Obesos				P
	<i>Diabetes</i>				
	Sim		Não		
	n	%	N	%	
TT	29	85,3	87	86,1	0,51
TG+GG	5	14,7	14	13,9	
Genótipo	<i>Hipertensão</i>				P
	Sim		Não		
	n	%	N	%	
TT	75	86,2	42	85,7	0,97
TG+GG	12	13,8	7	14,3	
Genótipo	<i>Síndrome Metabólica</i>				P
	Sim		Não		
	n	%	N	%	
TT	67	83,8	28	93,3	0,46
TG+GG	13	16,3	2	6,7	

Nota: Os dados mostram os números de observações e a porcentagem.
O P-valor é referente ao teste χ^2 com dois graus de liberdade.

4.2.2.2 Polimorfismo rs4721 (c.515+281T>G)

As amostras também foram analisadas para o polimorfismo rs4721 do gene *RARRES2*. Este polimorfismo está localizado na região 3'UTR e corresponde a troca de uma timina por guanina. A técnica de PCR em tempo real foi usada para a genotipagem dos indivíduos (Figura 31 e 32).

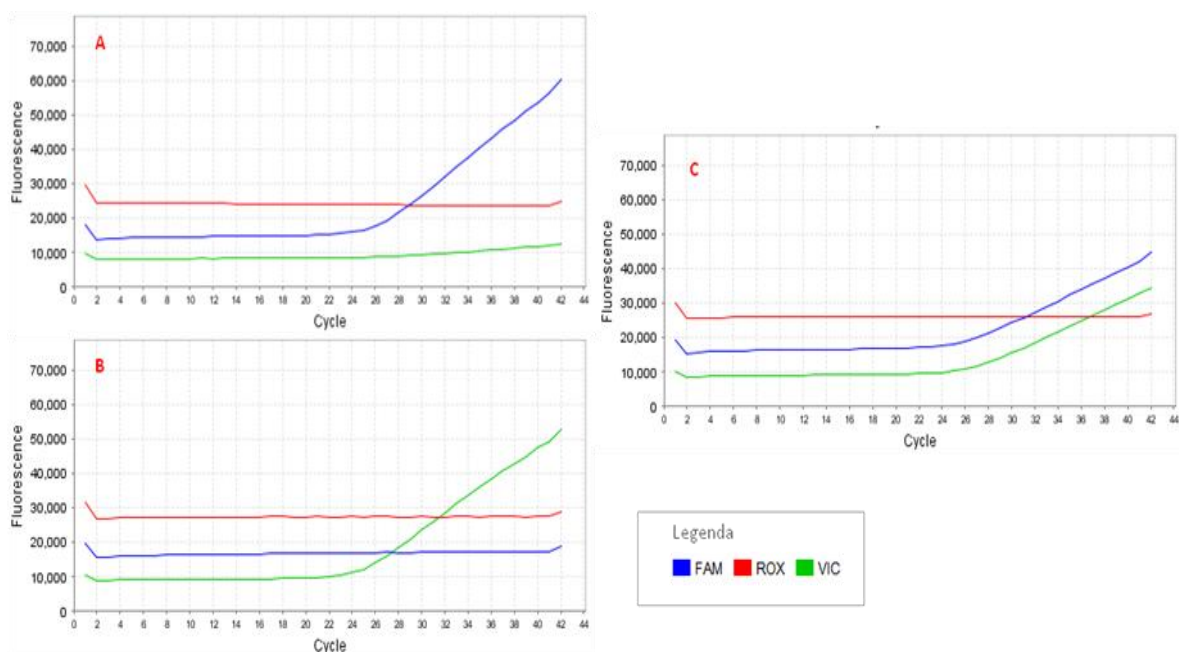


Figura 31: Gráficos Multicomponentes do polimorfismo rs4721 do gene *RARRES2*. O eixo y representa a fluorescência do fluoróforo e o eixo x o número de ciclos. A curva azul é o aumento de fluorescência FAM, que está ligado a uma sonda que anela ao alelo T e o verde é o aumento da fluorescência VIC que está ligado a uma sonda complementar ao alelo G. O gráfico A representa um homocigoto selvagem (TT), o B um homocigoto mutado (GG) e o C representa um heterocigoto (TG).

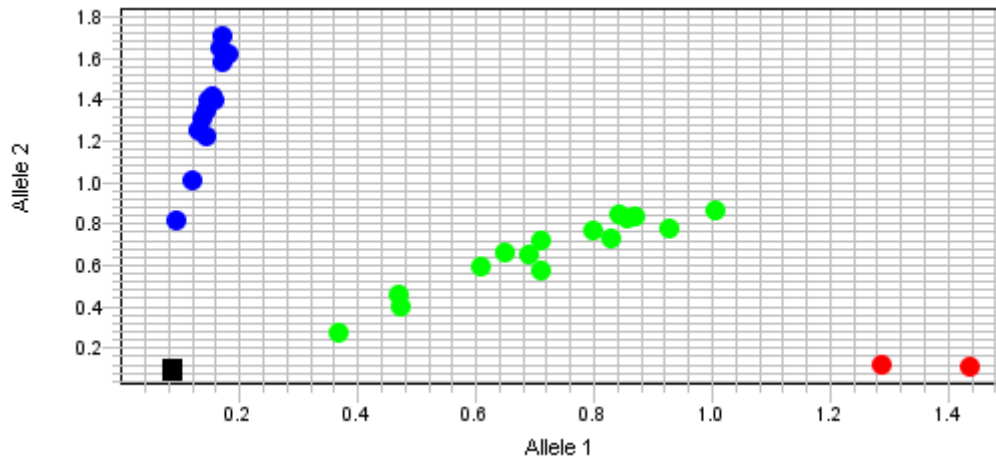


Figura 32: Gráfico de Discriminação Alélica do polimorfismo rs4721 do gene *RARRES2*. Os círculos representam indivíduos e cada “cluster” de uma cor representa os genótipos deles. O “cluster” com círculos azuis são os homozigotos selvagens (TT), os com verde são os heterozigotos (TG) e os com vermelho são os homozigotos mutados (GG). O quadrado é o controle negativo.

As frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo são mostradas na tabela 30. O genótipo do heterozigoto (TG) foi o mais frequente tanto nos eutróficos (46,3%) quanto nos obesos (53,7%). E o alelo mutado (T) também foi o mais frequente com 0,57% e 0,53%, respectivamente. Não encontramos diferenças significativas nas frequências analisadas entre os grupos (genotípicas: $\chi_{(2)}^2 = 2,17$; $p=0,34$ e alélicas $\chi_{(1)}^2 = 1,13$; $p= 0,29$), sugerindo que este polimorfismo não está diretamente associado ao desenvolvimento de obesidade ($p>0,05$). Além disso, cálculos estatísticos foram realizados para verificar se as amostras estavam em equilíbrio genético, sendo observado que ambos estavam de acordo com a teoria (obesos: $\chi_{(2)}^2 = 0,31$; $p=0,86$ e controles $\chi_{(2)}^2 = 0,79$; $p= 0,67$) (Tabela 30).

Tabela 30: Frequência genotípica, alélica e associação do polimorfismo rs4721 do gene *RARRES2* à obesidade.

Genética	Grupos			<i>p</i>
	Total	Eutróficos	Obesos	
Genótipo				
TT	72 (29,5)	37 (34,3)	35 (25,7)	0,34
TG	123 (50,4)	50 (46,3)	73 (53,7)	
GG	49 (20,1)	21 (19,4)	28 (20,6)	
Alelos				
T	0,55	0,57	0,53	0,29
G	0,45	0,43	0,47	

Os valores são apresentados na forma de frequência e porcentagem.

O *p*-valor é referente aos testes de homogeneidade entre os genótipos e alelos dos eutróficos e obesos.

Os valores dos parâmetros antropométricos e hemodinâmicos são mostrados de acordo com os genótipos do polimorfismo rs4721 na amostra como um todo (Tabela 31).

Tabela 31: Variação dos parâmetros antropométricos, pressóricos e bioquímicos em relação ao polimorfismo rs4721 na amostra total.

	Genótipos						p
	n	TT	n	TG	n	GG	
Peso	72	94,28±41,63	123	100,03±38,15	49	96,28±35,09	0,59
IMC (kg/m²)	72	36,1 (24,5; 48,9)	123	36,1 (22,5; 47,2)	49	39,3 (23,1; 48,9)	0,3
Circ. Abdominal (cm)	71	114,0 (86,0; 140,0)	123	110,0 (84,6; 133,6)	48	118,0 (83,0; 142,5)	0,35
Circ. de quadril (cm)	71	128,0 (104,5; 143,0)	123	115,8 (100,9; 142,0)	48	126,0 (102,0; 150,0)	0,24
Razão cintura/quadril (cm)	71	0,94 (0,84; 1,02)	123	0,90 (0,82; 0,96)	48	0,89 (0,83; 0,97)	0,34
iIMC (cm²/kg)	71	129,8 (111,6; 148,4)	123	123,2 (106,5; 146,1)	48	125,0 (105,7; 146,9)	0,59
PAS (mmHg)	56	121,11±19,13	95	129,94±21,30	34	123,29±18,89	0,03
PAD (mmHg)	56	78,75±12,81	95	83,0±15,80	34	80,0±11,98	0,19
Glicose (mg/dL)	61	92,0 (88,0; 103,0)	85	97,0 (88,0; 103,45)	34	96,0 (91,0; 108,0)	0,12
Colesterol total (mg/dL)	66	185,30±36,97	102	195,75±44,20	38	196,39±38,35	0,22
HDL - Colesterol (mg/dL)	66	48,0 (43,0; 56,0)	102	50,0 (45,0; 61,0)	38	46,0 (41,0; 55,0)	0,69
LDL - Colesterol (mg/dL)	65	108,22±34,46	98	115,73±34,59	38	118,51±32,62	0,25
VLD - Colesterol (mg/dL)	65	21,0 (16,0; 29,0)	98	22,0 (16,0; 32,3)	38	20,0 (14,0; 25,0)	0,25
Triglicerídeos (mg/dL)	66	104,0 (80,0; 146,0)	102	111,0 (79,0; 160,0)	38	104,0 (80,0; 146,0)	0,16
Proteína C reativa (mg/dL)	37	0,49 (0,21; 1,71)	75	0,65 (0,26; 1,16)	28	0,95 (0,20; 1,61)	0,76
Hemoglobina Glicada (%)	33	4,94±0,64	61	5,16±0,92	24	4,97±0,78	0,53

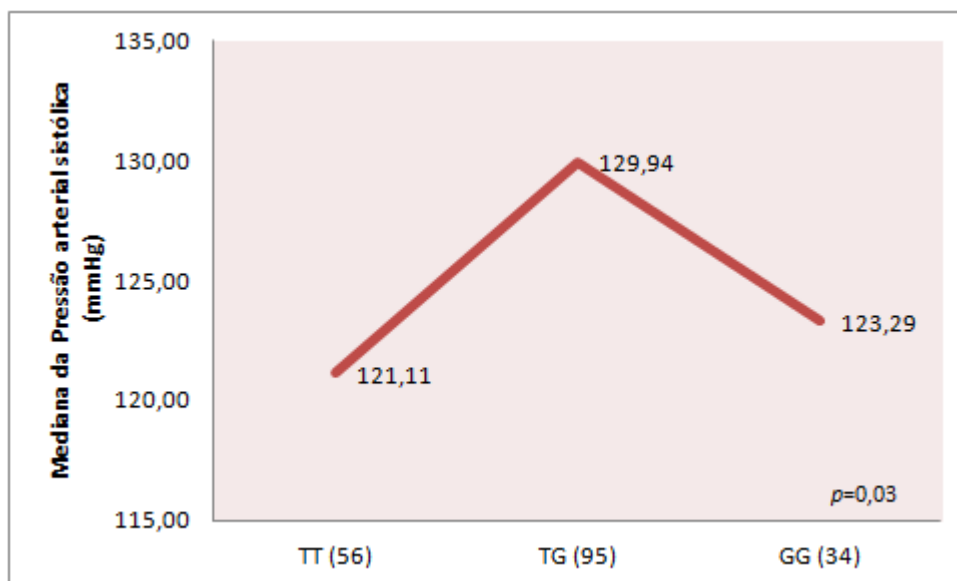
Legenda: PAS – pressão arterial sistólica; PAD – pressão arterial diastólica; IMC – índice de massa corpóreo; iIMC – índice de massa corporal invertido

Nota: Os valores representam média ± desvio padrão para variáveis com distribuição normal ou mediana (percentil 25; percentil 75), para variáveis sem distribuição normal.

O p-valor é referente às diferenças entre as médias (variáveis com distribuição normal) ou medianas (variáveis sem distribuição normal).

Na análise mostrada anteriormente, observamos que os indivíduos heterozigotos (TG) apresentam as maiores medianas da pressão arterial sistólica quando comparado aos homozigotos (TT e GG) (Gráfico 11).

Gráfico 11: Variações nas medianas da pressão arterial sistólica em relação ao polimorfismo rs4721 do gene *RARRES2* na amostra total.



Para avaliações mais aprofundadas utilizando apenas os eutróficos (Tabela 32), não foram encontrados resultados significativos da associação do polimorfismo com as variáveis quantitativas estudadas ($p>0,05$).

Tabela 32: Diferenças dos parâmetros antropométricos e hemodinâmicos em relação ao polimorfismo rs4721 do gene *RARRES2* nos eutróficos.

	Genótipos						<i>p</i>
	N	TT	n	TG	n	GG	
Peso	37	61,99±9,68	50	63,60±9,47	21	62,46±8,26	0,72
IMC (kg/m²)	37	23,1 (22,1; 24,5)	50	22,2 (20,6; 23,1)	21	22,9 (20,7; 23,3)	0,59
Circ. Abdominal (cm)	37	83,8 (75,4; 88,1)	50	82,5 (76,0; 88,5)	21	80,0 (76,0; 84,5)	0,42
Circ. de quadril (cm)	37	100,5 (98,0; 104,6)	50	99,8 (98,3; 104,8)	21	100,3 (93,5; 105,0)	0,28
Razão cintura/quadril (cm)	37	0,84 (0,77; 0,88)	50	0,82 (0,78; 0,84)	21	0,81 (0,77; 0,83)	0,93
iIMC (cm²/kg)	37	109,7 (92,2; 116,9)	50	106,3 (99,0; 112,9)	21	103,1 (92,5; 112,3)	0,64
PAS (mmHg)	35	114,40±14,38	44	117,39±10,27	17	119,06±13,34	0,38
PAD (mmHg)	35	74,34±9,33	44	77,82±11,01	17	77,18±8,85	0,30
Glicose (mg/dL)	36	88,83±8,10	47	90,72±10,34	18	90,50±7,23	0,64
Colesterol total (mg/dL)	36	180,25±36,87	47	182,77±31,48	18	194,94±40,82	0,34
HDL - Colesterol (mg/dL)	36	52,0 (48,8; 73,3)	47	60,0 (46,0; 69,0)	18	55,0 (45,0; 59,0)	0,58
LDL - Colesterol (mg/dL)	36	100,91±35,96	46	104,60±26,24	18	115,24±33,28	0,29
VLDL - Colesterol (mg/dL)	36	18,5 (13,5; 21,3)	46	18,0 (14,0; 25,0)	18	15,0 (12,3; 21,5)	0,69
Triglicerídeos (mg/dL)	36	94,0 (66,5; 105,0)	47	89,5 (70,3; 124,5)	18	76,5 (62,3; 106,5)	0,64
Proteína C reativa (mg/dL)	10	0,22 (0,16; 0,37)	25	0,22 (0,04; 0,39)	8	0,08 (0,02; 0,28)	0,29
Hemoglobina Glicada (%)	10	4,7 (4,4; 5,0)	26	4,6 (4,5; 4,8)	8	4,7 (4,3; 5,0)	0,95

Legenda: PAS – pressão arterial sistólica; PAD – pressão arterial diastólica; IMC – índice de massa corpóreo; iIMC – índice de massa corporal invertido

Nota: Os valores representam média ± desvio padrão para variáveis com distribuição normal ou mediana (percentil 25; percentil 75), para variáveis sem distribuição normal.

O *p*-valor é referente às diferenças entre as médias (variáveis com distribuição normal) ou medianas (variáveis sem distribuição normal).

Na amostra de obesos, também não encontramos resultados estatisticamente significativos na variabilidade dos fatores quantitativos estudados em relação ao polimorfismo rs4721 (Tabela 33). Apenas uma tendência de aumento dos níveis de pressão arterial sistólica nos indivíduos heterozigotos (TG), quando comparado aos homozigotos (TT e GG).

Tabela 33: Parâmetros antropométricos e hemodinâmicos em relação ao polimorfismo rs4721 do gene *RARRES2* na amostra de obesos.

	Genótipos						p
	n	TT	N	TG	n	GG	
Peso	35	128,40±34,45	73	124,98±29,19	28	121,64±24,12	0,67
IMC (kg/m²)	35	40,5 (35,7; 51,4)	73	46,0 (40,4; 51,3)	28	47,3 (39,3; 50,7)	0,9
Circ. Abdominal (cm)	34	127,0 (112,9; 152,8)	73	130,0 (118,3; 143,5)	27	138,0 (118,0; 146,0)	0,76
Circ. de quadril (cm)	34	136,0 (126,9; 151,5)	73	138,0 (124,5; 148,8)	27	141,5 (126,0; 156,0)	0,95
Razão cintura/quadril (cm)	34	0,98 (0,89; 1,04)	73	0,94 (0,89; 1,0)	27	0,92 (0,86; 1,0)	0,34
iIMC (cm²/kg)	34	140,3 (126,8; 158,5)	73	139,8 (125,1; 153,8)	27	142,5 (125,0; 154,2)	0,83
PAS (mmHg)	21	132,29±21,10	51	140,76±22,46	17	127,53±22,80	0,07
PAD (mmHg)	21	86,10±14,57	51	87,47±17,92	17	82,82±14,17	0,61
Glicose (mg/dL)	25	92,0 (88,3; 104,5)	38	98,5 (91,3; 108,3)	16	107,0 (88,0; 112,0)	0,29
Colesterol total (mg/dL)	30	191,37±36,80	55	206,85±50,38	20	197,70±37,01	0,3
HDL - Colesterol (mg/dL)	30	45,5 (40,8; 49,8)	55	47,5 (42,8; 52,3)	20	46,0 (40,0; 52,0)	0,74
LDL - Colesterol (mg/dL)	29	117,28±30,74	52	125,57±38,18	20	121,45±32,59	0,59
VLDL - Colesterol (mg/dL)	29	24,0 (17,0; 32,3)	52	24,5 (18,0; 37,8)	20	24,0 (19,0; 27,0)	0,33
Triglicerídeos (mg/dL)	30	120,0 (85,5; 162,3)	55	122,0 (89,8; 189,5)	20	121,0 (96,0; 136,0)	0,26
Proteína C reativa (mg/dL)	27	0,73 (0,33; 2,09)	50	1,06 (0,73; 1,41)	20	1,45 (0,81; 1,93)	0,7
Hemoglobina Glicada (%)	23	5,0 (4,5; 5,6)	35	5,2 (4,8; 5,8)	16	4,8 (4,5; 5,9)	0,28

Legenda: PAS – pressão arterial sistólica; PAD – pressão arterial diastólica; IMC – índice de massa corpóreo; iIMC – índice de massa corporal invertido

Nota: Os valores representam média ± desvio padrão para variáveis com distribuição normal ou mediana (percentil 25; percentil 75), para variáveis sem distribuição normal.

O p-valor é referente às diferenças entre as médias (variáveis com distribuição normal) ou medianas (variáveis sem distribuição normal).

Este polimorfismo rs4721 também foi analisado em relação à presença da DT2, hipertensão e SM na amostra de obesos, os resultados brutos são mostradas na tabela 34.

Tabela 34: Associação do polimorfismo rs4721 do gene *RARRES2* com as características clínicas da amostra.

Genótipo	Obesos				P
	Diabetes				
	Sim		Não		
	N	%	N	%	
TT	5	14,7	29	28,7	
TG	24	70,6	49	48,5	0,08
GG	5	14,7	23	22,8	
Genótipo	Hipertensão				P
	Hipertensão				
	Sim		Não		
	N	%	N	%	
TT	20	23,0	10	20,4	
TG	49	56,3	24	49,0	0,60
GG	18	20,7	15	30,6	
Genótipo	Síndrome Metabólica				P
	Síndrome Metabólica				
	Sim		Não		
	N	%	N	%	
TT	20	25,0	11	36,7	
TG	43	53,8	15	50,0	0,40
GG	17	21,3	4	13,3	

Nota: Os dados mostram os números de observações e a porcentagem.
O P-valor é referente ao teste χ^2 com dois graus de liberdade.

Na amostra de obesos encontramos uma tendência de aumento de heterozigotos (TG) com diabetes, quando comparados aos homozigotos selvagens (TT) e mutados (GG) (Tabela 35). Análises adicionais, combinando os homozigotos (TT e GG) contra os heterozigotos (TG), mostraram que este último genótipo aumenta mais de duas vezes a probabilidade dos obesos desenvolverem DT2, agindo como um fator de risco (Odd Ratio [OR] = 1,94; intervalo de confiança de 95% [IC] = 1,08-3,49). No entanto, não foram observadas diferenças significativas nas frequências alélicas ($\chi_{(1)}^2=0,18; p= 0,56$).

Tabela 35: Análise do fator de risco dos obesos desenvolverem diabetes com relação.

Fator de risco	Diabetes		Total
	Sim	Não	
TG	24	49	73
TT+GG	10	52	62
Total	34	101	135

Odd Ratio	2,55	
IC 95%	1,14	5,71
χ^2	5,15	
<i>p</i>	0,02	

4.2.2.3 – Haplótipos entre os polimorfismos do gene *RARRES2*

Os polimorfismos rs17173608 e rs4721 do gene *RARRES2* foram analisados em relação à composição haplotípica, e as frequências são mostradas na tabela 36. Os resultados mostraram um aumento do haplótipo TG em obesos (40,9%), quando comparado aos eutróficos (35,4%), mas esta diferença não foi significativa ($\chi_{(3)}^2 = 1,43$; $p = 0,63$). Apesar disto, observamos que os alelos estavam em desequilíbrio de ligação, tendo um aumento do haplótipo TT (eutróficos: $\chi_{(3)}^2 = 14,72$; $p < 0,01$; obesos: $\chi_{(3)}^2 = 9,66$; $p = 0,02$) nas amostras.

Tabela 36: Frequências haplotípicas dos polimorfismos rs17173608 e rs4721 do gene *RARRES2* e associação à obesidade.

Haplótipos	Grupos			P
	Total	Eutróficos	Obesos	
TT	263 (53,9)	122 (56,2)	141 (51,0)	0,63
TG	185 (37,9)	76 (35,4)	111 (40,9)	
GT	3 (0,6)	1 (0,7)	4 (1,6)	
GG	37 (7,6)	17 (7,6)	18 (6,5)	

Os valores são apresentados na forma de frequência e porcentagem.

O *p*-valor é referente ao teste de homogeneidade entre os haplótipos dos eutróficos e obesos.

4.2.3- Gene *PGC1-α*

4.2.3.1- Polimorfismo rs8192678 (c.+1564G>A)

As amostras foram analisadas para o polimorfismo rs8192678, localizado no éxon 8 do gene *PGC1-A*. Este polimorfismo acarreta na troca do nucleotídeo guanina por adenina, produzindo um aminoácido serina ao invés de uma glicina, que tem sido associado a diversas comorbidades. Os genótipos dos indivíduos foram obtidos através do PCR em tempo real e alguns dos resultados podem ser vistos no gráfico de multicomponente (Figura 33) e de discriminação alélica (Figura 34).

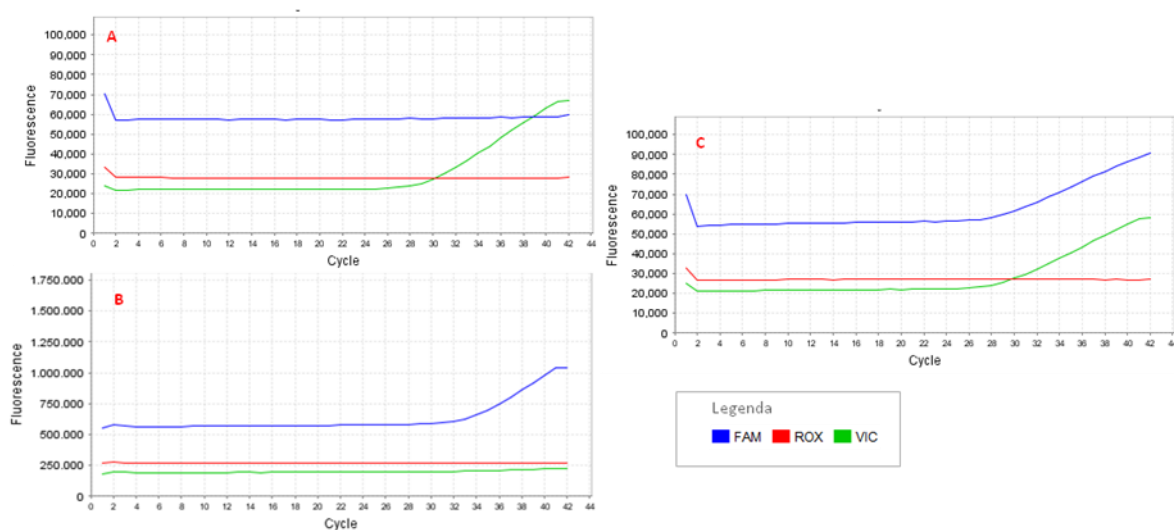


Figura 33: Gráficos Multicomponentes do polimorfismo rs8192678 do gene *PGC1A*. O eixo y indica a fluorescência do fluoróforo e o eixo x o número de ciclos. A curva verde indica a fluorescência do VIC, que está

ligado a uma sonda que anela ao alelo G (selvagem) e a azul é a fluorescência do FAM que está acoplado a uma sonda complementar ao alelo A (mutado). O gráfico A representa um homozigoto selvagem (GG), o B um homozigoto mutado (AA) e o C representa um heterozigoto (GA).

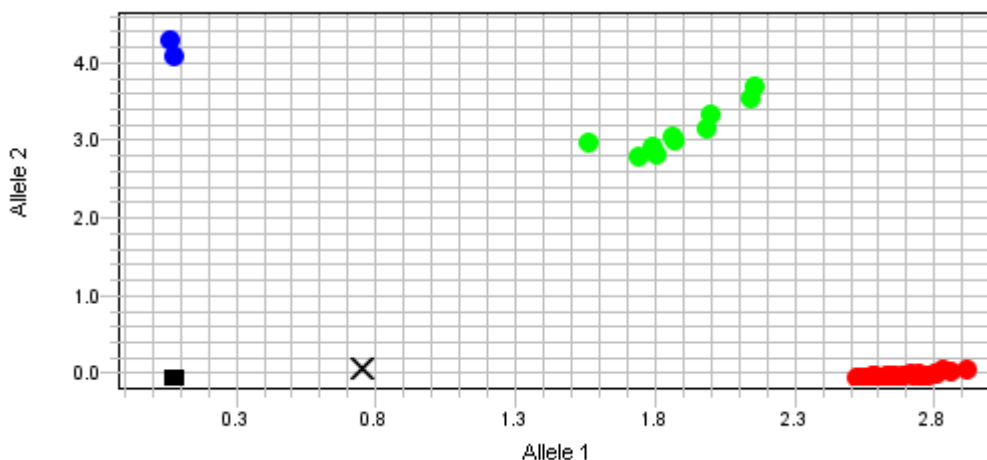


Figura 34: Gráfico de Discriminação Alélica do polimorfismo rs8192678 do gene *PGC1A*. O “cluster” com círculos azuis representa os indivíduos homozigotos mutados (AA), o com círculos verdes indica os heterozigotos (GA) e o com círculos vermelhos são os homozigotos selvagens (GG).

As frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo rs8192678 são mostradas na tabela 37. O grupo de obesos apresentou um aumento na frequência do homozigoto selvagem (GG) em relação aos controles, mas estes valores não foram significativos ($\chi_{(2)}^2 = 1,79$; $p = 0,41$). As frequências dos alelos foram muito similares entre os grupos, mostrando que as amostras são homogêneas ($\chi_{(1)}^2 = 0,11$; $p = 0,73$). Nas análises de equilíbrio de Hardy-Weinberg foram observados que ambos os grupos estavam em equilíbrio, como podemos observar nos resultados dos qui-quadrados para os obesos ($\chi_{(2)}^2 = 0,28$; $p = 0,87$) e eutróficos ($\chi_{(2)}^2 = 1,54$; $p = 0,46$).

Tabela 37: Frequência genotípica, alélica e associação do polimorfismo rs8192678 do gene *PGC1A* ao fenótipo de obesidade.

Genética	Grupos			<i>p</i>
	Total	Eutróficos	Obesos	
Genótipo				
GG	127 (52,0)	53 (49,1)	74 (54,4)	0,41
GA	100 (41,0)	49 (45,4)	51 (37,5)	
AA	17 (7)	6 (5,6)	11 (8,1)	
Alelos				
G	0,73	0,72	0,73	0,73
A	0,27	0,28	0,27	

Os valores são apresentados na forma de frequência e porcentagem.

O *p*-valor é referente aos testes de homogeneidade entre os genótipos e alelos dos eutróficos e obesos.

Os comportamentos das variáveis antropométricas, pressóricas e bioquímicas foram organizados de acordo com o polimorfismo rs8192678, para que possamos analisar a influencia dos genótipos na amostra como um todo (Tabela 38).

Tabela 38: Diferenças dos parâmetros antropométricos e hemodinâmicos em relação ao polimorfismo rs8192678 do gene *PGCIA* na amostra total.

	Genótipos						p
	n	GG	n	GA	n	AA	
Peso	127	97,36±39,34	100	96,98±37,20	17	102,67±42,49	0,85
IMC (kg/m²)	127	35,6 (22,9; 46,3)	100	31,5 (23,1; 46,1)	17	39,1 (21,4; 51,9)	0,85
Circ. Abdominal (cm)	126	111,8 (82,0; 133,6)	99	100,0 (82,0; 138,0)	17	125,0 (83,5; 144,0)	0,81
Circ. de quadril (cm)	126	118,5 (99,9; 142,0)	99	113,0 (99,0; 141,0)	17	130,5 (98,5; 155,0)	0,57
Razão cintura/quadril (cm)	126	0,91 (0,82; 0,97)	99	0,91 (0,83; 0,97)	17	0,89 (0,83; 0,98)	0,88
iIMC (cm²/kg)	126	127,0 (108,8; 147,3)	99	118,5 (103,2; 147,2)	17	133,8 (113,7; 158,0)	0,27
PAS (mmHg)	94	124,39±19,70	76	126,36±20,88	15	124,80±23,04	0,19
PAD (mmHg)	94	80,99±13,29	76	79,47±14,31	15	90,80±17,96	0,02
Glicose (mg/dL)	95	93,0 (87,0; 102,0)	75	92,0 (86,0; 101,0)	10	88,0 (80,0; 99,8)	0,37
Colesterol total (mg/dL)	109	198,85±43,95	83	188,33±37,11	14	168,14±27,65	0,01
HDL - Colesterol (mg/dL)	109	52,0 (44,5; 64,5)	83	50,0 (44,0; 61,0)	14	53,5 (42,3; 63,8)	0,61
LDL - Colesterol (mg/dL)	107	118,68±38,35	81	111,50±27,05	13	88,32±27,09	0,01
VLDL - Colesterol (mg/dL)	107	23,0 (12,0; 39,5)	81	21,0 (15,0; 29,0)	13	25,0 (13,9; 36,5)	0,83
Triglicerídeos (mg/dL)	109	114,0 (58,5; 197,0)	83	108,0 (75,0; 148,0)	14	131,5 (71,3; 191,0)	0,68
Proteína C reativa (mg/dL)	81	0,26 (0,20; 0,57)	49	0,72 (0,26; 1,51)	10	0,48 (0,25; 1,08)	0,83
Hemoglobina Glicada (%)	70	4,8 (4,5; 5,5)	43	4,9 (4,6; 5,6)	5	4,5 (4,3; 4,9)	0,18

Legenda: PAS – pressão arterial sistólica; PAD – pressão arterial diastólica; IMC – índice de massa corpóreo; iIMC – índice de massa corporal invertido; PCR – proteína C reativa

Nota: Os valores representam média ± desvio padrão para variáveis com distribuição normal ou mediana (percentil 25; percentil 75), para variáveis sem distribuição normal.

O *p*-valor é referente às diferenças entre as médias (variáveis com distribuição normal) ou medianas (variáveis sem distribuição normal).

Observou-se que o polimorfismo influencia na variabilidade da pressão arterial diastólica (Gráfico 12), do colesterol total (Gráfico 13) e do LDL colesterol (Gráfico 14). Posteriormente, foi realizado o Post Hoc de Tukey, o que indica que nestes casos a média do genótipo homozigoto mutado (AA) difere do heterozigoto (GA) e do homozigoto selvagem (GG). No caso da PAD, há um aumento dos níveis desta pressão na presença do homozigoto mutado (AA). Enquanto que para o colesterol total e o LDL colesterol, a presença do alelo A diminui as suas concentrações. Para as outras variáveis os resultados não foram estatisticamente significativos ($p > 0,05$).

Gráfico 12: Influência do polimorfismo rs8192678 do gene *PGC1A* na pressão arterial diastólica na amostra total.

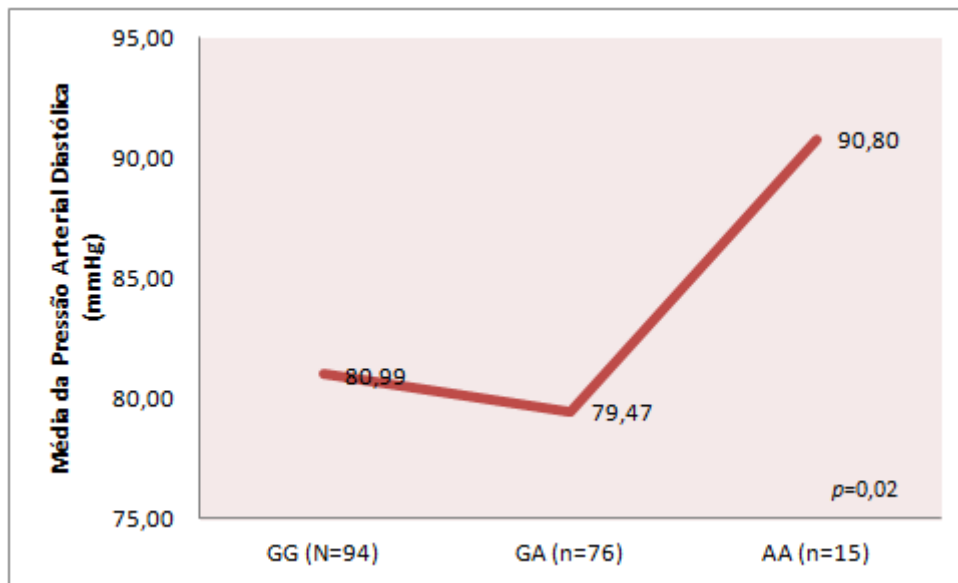


Gráfico 13: Influência do polimorfismo rs8192678 do gene *PGC1A* na variação do colesterol total na amostra total.

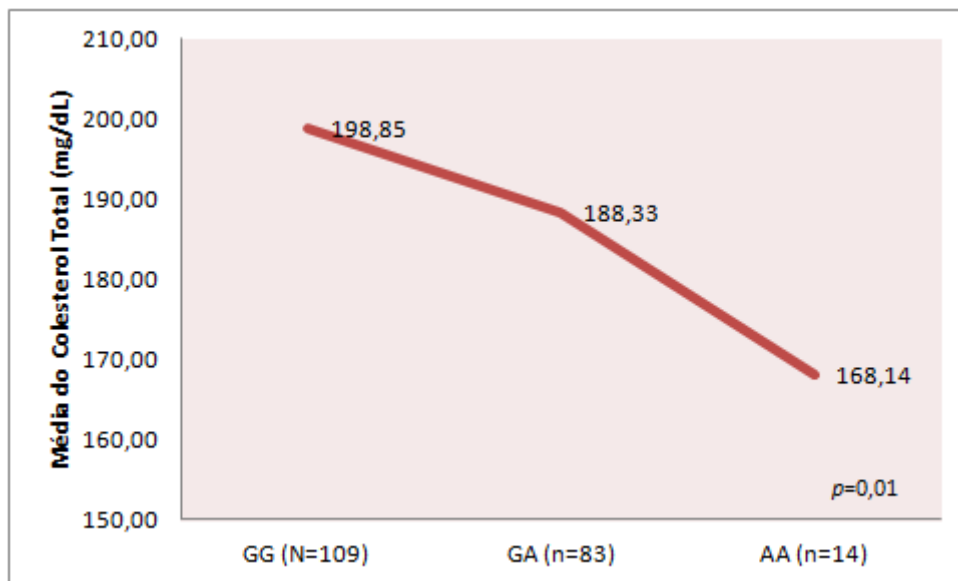
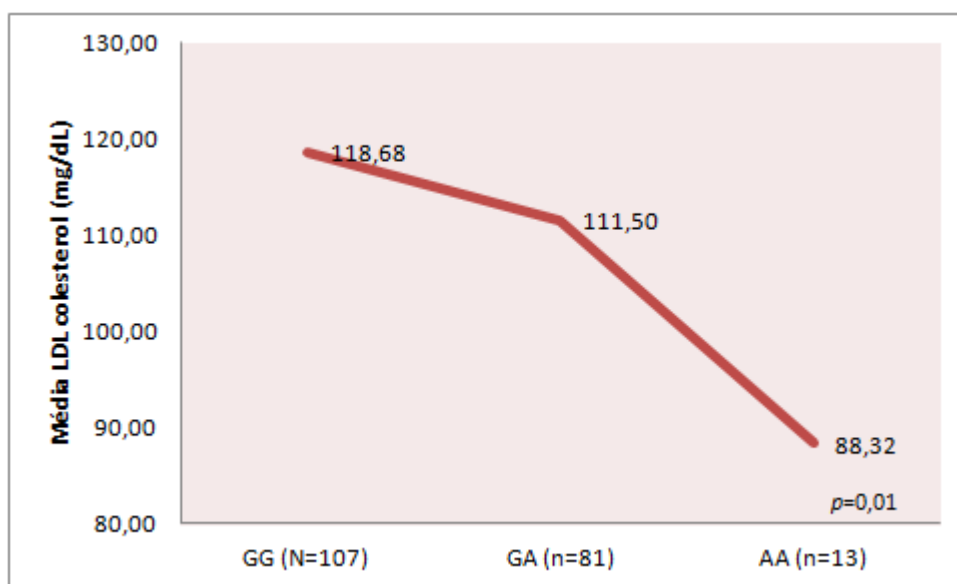


Gráfico 14: Influência do polimorfismo rs8192678 do gene *PGCIA* nas diferenças do LDL colesterol na amostra total.



As variáveis estudadas também foram analisadas com relação aos genótipos no grupo de eutróficos, como mostrado na tabela 39.

Tabela 39: Variações nos parâmetros antropométricos, pressóricos e bioquímicos em relação ao polimorfismo rs8192678 do gene *PGCIA* nos eutróficos.

	Genótipos						<i>p</i>
	n	GG	n	GA	n	AA	
Peso	53	60,78±8,47	49	65,52±9,91	6	58,92±4,02	0,02
IMC (kg/m²)	53	22,5 (20,6; 23,6)	49	23,1 (21,2; 24,2)	6	21,1 (19,7; 22,3)	0,12
Circ. Abdominal (cm)	53	81,0 (74,0; 85,8)	49	82,0 (75,5; 86,3)	6	78,0 (70,5; 85,0)	0,46
Circ. de quadril (cm)	53	99,0 (94,5; 102,5)	49	99,0 (93,3; 102,0)	6	97,0 (92,5; 100,3)	0,69
Razão cintura/quadril (cm)	53	0,81 (0,78; 0,88)	49	0,84 (0,79; 0,90)	6	0,79 (0,79; 0,85)	0,22
iIMC (cm²/kg)	53	107,0 (95,0; 119,5)	49	104,0 (94,0; 110,2)	6	105,6 (105,6; 115,5)	0,31
PAS (mmHg)	46	116,61±14,82	44	116,86±9,57	6	114,50±13,14	0,91
PAD (mmHg)	46	76,76±11,16	44	75,98±8,69	6	77,33±12,64	0,91
Glicose (mg/dL)	48	91,0 (84,0; 96,0)	47	90,0 (85,0; 97,0)	6	82,5 (78,3; 99,8)	0,45
Colesterol total (mg/dL)	48	192,17±37,48	47	177,70±32,90	6	168,67±19,58	0,07
HDL - Colesterol (mg/dL)	48	62,0 (52,0; 72,3)	47	58,0 (43,0; 68,0)	6	63,0 (52,5; 72,8)	0,07
LDL - Colesterol (mg/dL)	47	110,19±35,26	47	102,92±26,59	6	83,83±27,13	0,12
VLDL - Colesterol (mg/dL)	47	15,8 (12,4; 22,0)	47	17,0 (14,0; 22,8)	6	18,4 (12,2; 29,3)	0,62
Triglicerídeos (mg/dL)	48	79,0 (62,3; 108,0)	47	86,0 (69,0; 114,0)	6	91,5 (60,3; 146,0)	0,73
Proteína C reativa (mg/dL)	26	0,21 (0,06; 0,31)	14	0,16 (0,03; 0,41)	3	0,21 (0,05; 0,30)	0,54
Hemoglobina Glicada (%)	25	4,7 (4,5; 5,0)	16	4,7 (4,1; 5,0)	3	4,7 (4,5; 4,9)	0,83

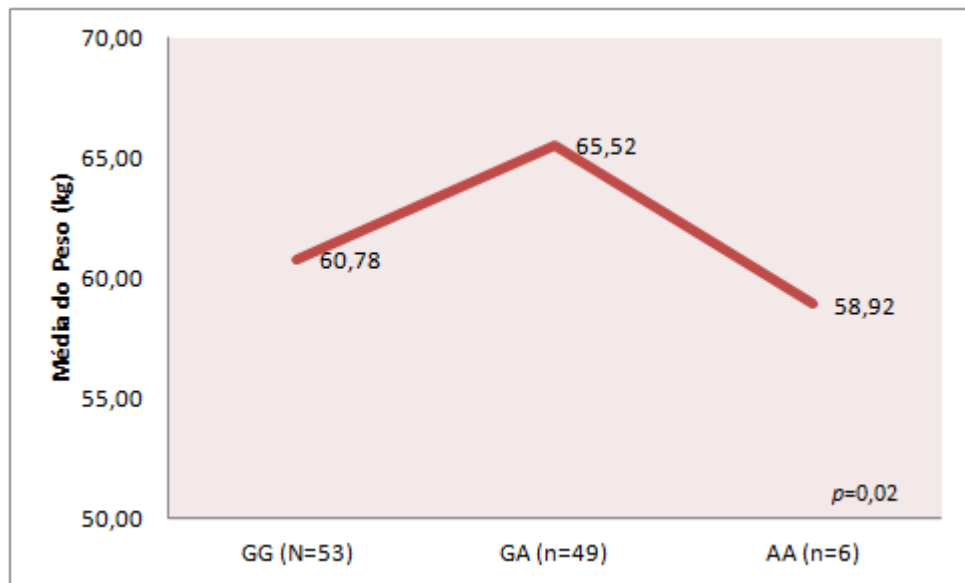
Legenda: PAS – pressão arterial sistólica; PAD – pressão arterial diastólica; IMC – índice de massa corpóreo; iIMC – índice de massa corporal invertido

Nota: Os valores representam média ± desvio padrão para variáveis com distribuição normal ou mediana (percentil 25; percentil 75), para variáveis sem distribuição normal.

O *p*-valor é referente às diferenças entre as médias (variáveis com distribuição normal) ou medianas (variáveis sem distribuição normal).

Nos eutróficos, observamos um aumento de peso na presença do alelo selvagem (G) (Gráfico 15), principalmente nos heterozigotos (GA). Com relação ao colesterol total, encontramos uma clara tendência de diminuição deste lipídeo na presença do alelo mutado (A) quando comparado aos com alelo selvagem (G). Entretanto, para o HDL colesterol foi observado que os heterozigotos (GA) têm uma tendência a ter os menores valores desta lipoproteína boa, quando comparados aos homozigotos selvagens (GG) e mutados (AA). O pós-teste de Tukey não conseguiu discriminar qual ou quais os genótipos apresentam diferenças entre as médias do peso.

Gráfico 15: Comportamento do peso em relação ao polimorfismo rs8192678 do gene *PGC1A* nos eutróficos.



As diferenças das variáveis estudadas entre os genótipos do polimorfismo foram analisadas nos obesos, como mostrado na tabela 40.

Tabela 40: Variação entre os fatores quantitativos em relação ao polimorfismo rs8192678 do gene *PGCIA* no grupo de obesos.

	Genótipos						P
	n	GG	n	GA	n	AA	
Peso	74	123,56±30,85	51	127,21±27,26	11	126,54±33,25	0,79
IMC (kg/m²)	74	45,2 (39,9; 50,6)	51	45,4 (38,7; 51,8)	11	45,0 (39,1; 66,1)	0,84
Circ. Abdominal (cm)	73	130,0 (118,5; 142,8)	50	137,5 (122,7; 148,3)	11	133,0 (125,5; 154,0)	0,29
Circ. de quadril (cm)	73	141,0 (127,3; 150,5)	50	141,0 (130,2; 152,3)	11	138,0 (130,5; 168,0)	0,65
Razão cintura/quadril (cm)	73	0,94 (0,90; 1,01)	50	0,97 (0,92; 1,01)	11	0,95 (0,89; 1,02)	0,7
iIMC (cm²/kg)	73	143,3 (127,8; 158,9)	50	147,0 (132,6; 157,2)	11	149,5 (133,8; 164,5)	0,47
PAS (mmHg)	48	131,85±21,01	32	139,41±24,99	9	148,33±17,49	0,08
PAD (mmHg)	48	85,04±14,0	32	84,28±18,68	9	99,78±15,42	0,03
Glicose (mg/dL)	47	100,7 (89,0; 108,0)	28	93,5 (88,0; 111,3)	4	91,0 (86,5; 165,3)	0,54
Colesterol total (mg/dL)	61	204,11±48,11	36	202,19±38,14	8	167,75±33,84	0,09
HDL - Colesterol (mg/dL)	61	47,0 (41,5; 55,5)	36	48,5 (44,0; 52,8)	8	46,0 (34,8; 55,5)	0,76
LDL - Colesterol (mg/dL)	60	125,33±39,64	34	123,36±23,19	7	92,17±28,58	0,06
VLDL - Colesterol (mg/dL)	60	25,0 (18,0; 34,0)	34	25,5 (18,8; 39,2)	7	29,8 (15,0; 37,0)	0,77
Triglicerídeos (mg/dL)	61	126,5 (90,5; 169,5)	36	134,0 (96,3; 199,5)	8	163,5 (90,0; 273,5)	0,5
Proteína C reativa (mg/dL)	55	1,31 (0,61; 1,76)	35	1,0 (0,60; 1,94)	7	0,51 (0,32; 1,89)	0,37
Hemoglobina Glicada (%)	45	5,1 (4,6; 5,7)	27	5,1 (4,7; 5,8)	2	5,1 (4,5; 5,6)	0,22

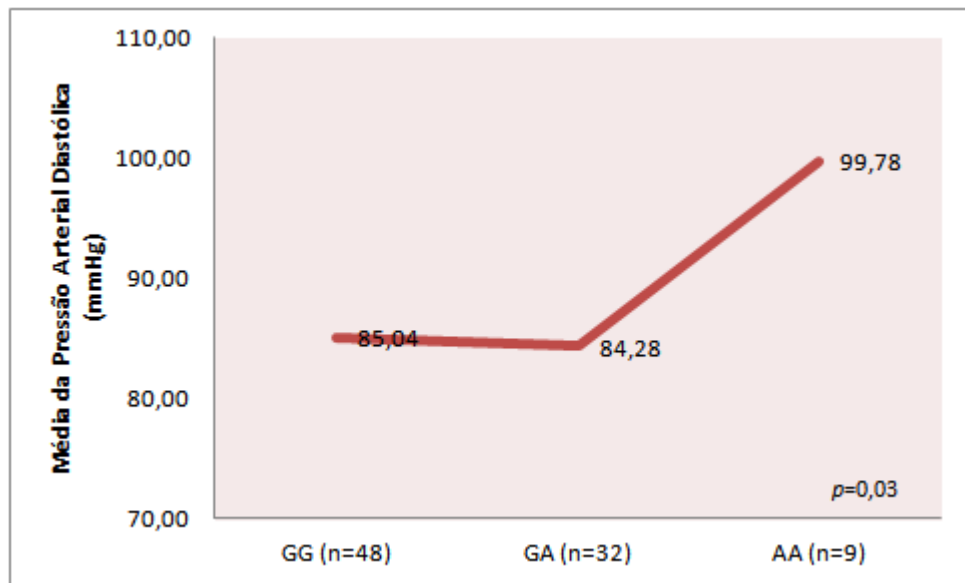
Legenda: PAS – pressão arterial sistólica; PAD – pressão arterial diastólica; IMC – índice de massa corpóreo; iIMC – índice de massa corporal invertido.

Nota: Os valores representam média ± desvio padrão para variáveis com distribuição normal ou mediana (percentil 25; percentil 75), para variáveis sem distribuição normal.

O *p*-valor é referente às diferenças entre as médias (variáveis com distribuição normal) ou medianas (variáveis sem distribuição normal).

Na amostra de obesos, encontramos uma associação deste polimorfismo nas diferenças da pressão arterial diastólica e uma tendência na pressão arterial sistólica, no colesterol total e no LDL colesterol (Tabela 40). O teste Post Hoc de Tukey indica que a média da pressão arterial diastólica nos homocigotos mutados (AA) difere dos heterocigotos (GA) e homocigoto selvagem (GG) (Gráfico 16). Os resultados mostram que tanto a pressão arterial diastólica como a sistólica, estavam aumentadas nos obesos homocigotos mutados (AA). Com relação ao colesterol total e ao LDL colesterol, é visto o inverso, há uma clara tendência de diminuição na presença do alelo selvagem (A), principalmente nos homocigotos (AA).

Gráfico 16: Variação da pressão arterial diastólica em relação ao polimorfismo rs8192678 do gene *PGC1A* nos obesos.



As análises de associação do polimorfismo rs8192678 com a presença de DT2, hipertensão e SM não mostraram resultados significativos, como pode ser observado na tabela 41.

Tabela 41: Correlação do polimorfismo rs8192678 do gene *PGC1A* na prevalência de DT2, hipertensão e SM nos obesos.

Genótipo	Obesos				<i>P</i>
	<i>Diabetes</i>				
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
GG	17	50,0	56	55,4	0,27
GA	12	35,3	39	38,6	
AA	5	14,7	6	5,9	
	<i>Hipertensão</i>				
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
GG	45	51,7	29	59,2	0,43
GA	36	41,4	15	30,6	
AA	6	6,9	5	10,2	
	<i>Síndrome Metabólica</i>				
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
GG	44	55,0	19	63,3	0,56
GA	30	37,5	8	26,7	
AA	6	7,5	3	10,0	

Nota: Os dados mostram os números de observações e a porcentagem.
O *P*-valor é referente ao teste χ^2 com dois graus de liberdade.

4.2.3.2 Polimorfismo rs3736265 (c.+1835G>A)

Todas as amostras foram investigadas para o polimorfismo rs3736265 do gene *PGC1A*. Da mesma forma que os SNPs anteriores, este também foi testado por PCR em tempo real e alguns dos resultados podem ser observados na figura 35 e 36.

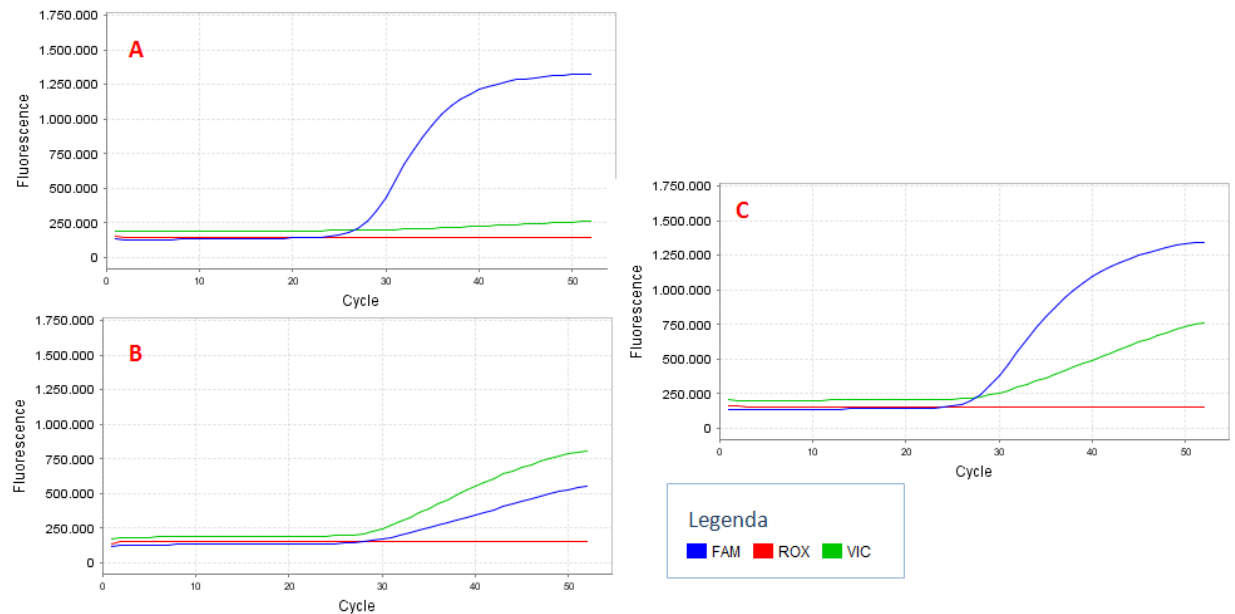


Figura 35: Gráficos Multicomponentes do polimorfismo rs3736265 do gene *PGC1A*. O eixo y indica a fluorescência do fluoróforo e o eixo x o número de ciclos. A curva verde indica a fluorescência do VIC, que está ligado a uma sonda que anela ao alelo G (selvagem) e a azul é a fluorescência do FAM que está acoplado a uma sonda complementar ao alelo A (mutado). O gráfico A representa um homocigoto selvagem (GG), o B um homocigoto mutado (AA) e o C representa um heterocigoto (GA).

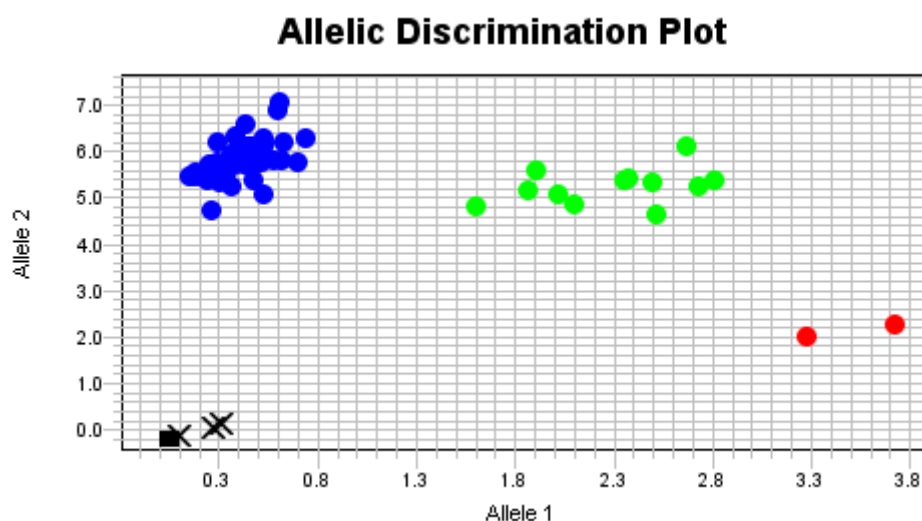


Figura 36: Gráfico de Discriminação Alélica polimorfismo rs3736265 do gene *PGC1A*. O “cluster” com círculos azuis representa os indivíduos homocigotos selvagens (GG), o com círculos verdes indica os heterocigotos (GA) e o com círculos vermelhos são os homocigotos mutados (AA). O quadrado representa o controle negativo e o X são amostras que não amplificaram.

Após a análise dos gráficos, as frequências genotípicas e alélicas foram calculadas (Tabela 42). Foi observado que o homocigoto mutado (AA) é raro, não sendo encontrado em nenhum obeso. Ademais, foi observado um aumento significativo do alelo selvagem (G) nos obesos quando comparados aos eutróficos ($\chi_{(1)}^2=3,89$; $p= 0,05$). Análises posteriores mostraram que os indivíduos que possuem o alelo G apresentam uma probabilidade duas vezes maior de desenvolver obesidade dos que os que possuem o alelo A (Odd Ratio [OR] = 2,12; intervalo de confiança de 95% [CI] = 1,006 - 2,23), sugerindo que o alelo selvagem (G) é um fator de risco para o desenvolvimento da obesidade. De acordo com a Teoria de Hardy-Weinberg, as amostras encontram-se em equilíbrio como podemos observar nos resultados para o grupo de obesos ($\chi_{(2)}^2= 0,24$; $p=0,89$) e controles ($\chi_{(2)}^2= 2,48$; $p= 0,30$).

Tabela 42: Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo rs3736265 do gene *PGC1A* e associação ao fenótipo de obesidade.

Genética	Grupos			<i>p</i>
	Total	Eutróficos	Obesos	
Genótipo				
GG	217 (88,9)	92 (85,2)	125 (91,9)	0,12
GA	25 (10,2)	14 (13,0)	11 (8,1)	
AA	2 (0,8)	2 (1,9)	0 (0,0)	
Alelos				
G	0,94	0,92	0,96	0,48
A	0,06	0,08	0,04	

Os valores são apresentados na forma de frequência e porcentagem.

O *p*-valor é referente ao teste de homogeneidade entre os genótipos e alelos dos eutróficos e obesos.

As variações antropométricas e hemodinâmicas na amostra como um todo, também foram analisadas em relação aos genótipos do polimorfismo rs3736265 (Tabela 43). Devido à pequena frequência do homozigoto mutado (AA) as análises foram baseadas no modelo dominante (GG vs GA+AA).

Tabela 43: Organização das variáveis antropométricas e hemodinâmicas em relação ao polimorfismo rs3736265 do gene *PGC1A* na amostra total.

	Genótipos				p
	n	GG	n	GA+AA	
Peso	217	99,11±38,98	27	85,3±33,2	0,08
IMC (kg/m²)	217	36,1 (23,1; 46,9)	27	24,2 (20,7; 45,3)	0,06
Circ. Abdominal (cm)	215	111,0 (83,5; 137,0)	27	85,5 (77,0; 121,0)	0,04
Circ. de quadril (cm)	215	119,0 (99,0; 141,5)	27	104,5 (99,9; 142,0)	0,46
Razão cintura/quadril (cm)	215	0,91 (0,83; 0,98)	27	0,82 (0,77; 0,89)	0,01
iIMC (cm²/kg)	215	128,3 (108,6; 148,4)	27	110,3 (97,4; 145,6)	0,04
PAS (mmHg)	160	127,17±21,11	24	118,8±14,9	0,06
PAD (mmHg)	160	81,58±14,58	24	78,5±12,8	0,32
Glicose (mg/dL)	157	92,0 (87,0; 102,0)	22	86,5 (83,0; 96,0)	0,06
Colesterol total (mg/dL)	182	193,53±41,64	23	184,9±36,3	0,33
HDL - Colesterol (mg/dL)	182	51,0 (43,8; 63,0)	23	58,5 (46,3; 66,3)	0,13
LDL - Colesterol (mg/dL)	177	114,75±34,50	23	107,0±32,2	0,30
VLD - Colesterol (mg/dL)	177	22,0 (15,0; 31,0)	23	17,6 (15,2; 22,6)	0,11
Triglicerídeos (mg/dL)	182	109,5 (75,0; 159,3)	23	88,0 (74,5; 113,0)	0,07
Proteína C reativa (mg/dL)	124	0,73 (0,30; 1,54)	16	0,45 (0,16; 1,36)	0,32
Hemoglobina Glicada (%)	102	4,9 (4,5; 5,5)	16	4,9 (4,3; 5,3)	0,65

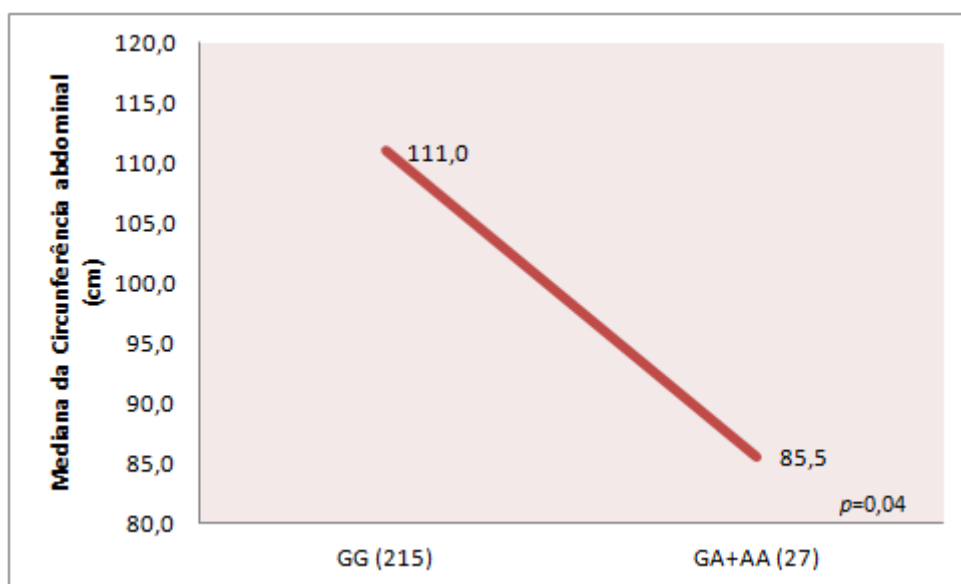
Legenda: PAS – pressão arterial sistólica; PAD – pressão arterial diastólica; IMC – índice de massa corpóreo; iIMC – índice de massa corporal invertido.

Nota: Os valores representam média ± desvio padrão para variáveis com distribuição normal ou mediana (percentil 25; percentil 75), para variáveis sem distribuição normal.

O *p*-valor é referente às diferenças entre as médias (variáveis com distribuição normal) ou medianas (variáveis sem distribuição normal).

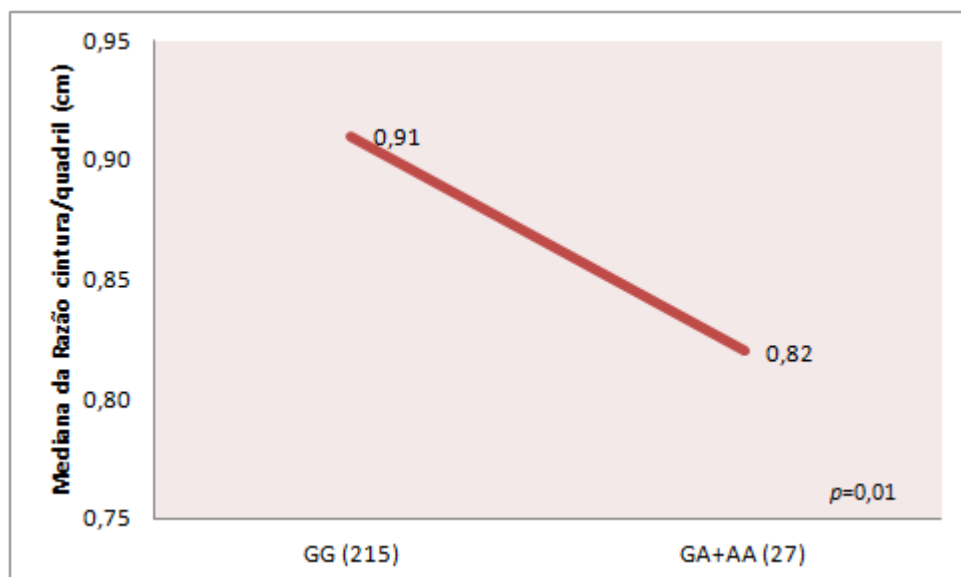
No modelo dominante, a combinação dos heterozigotos (GA) com os homozigotos mutados (AA) está associada à diminuição da circunferência abdominal quando comparado aos homozigotos selvagens (GG) (Gráfico 17).

Gráfico 17: Comportamento da circunferência abdominal em relação ao polimorfismo rs3736265 do gene *PGCIA* na amostra total.



Este modelo também mostrou que os heterozigotos (GA) e homozigotos mutados (AA) estão correlacionados a diminuição da razão cintura/quadril na amostra como um todo, ao ser comparado com os homozigotos selvagens (GG) (Gráfico 18).

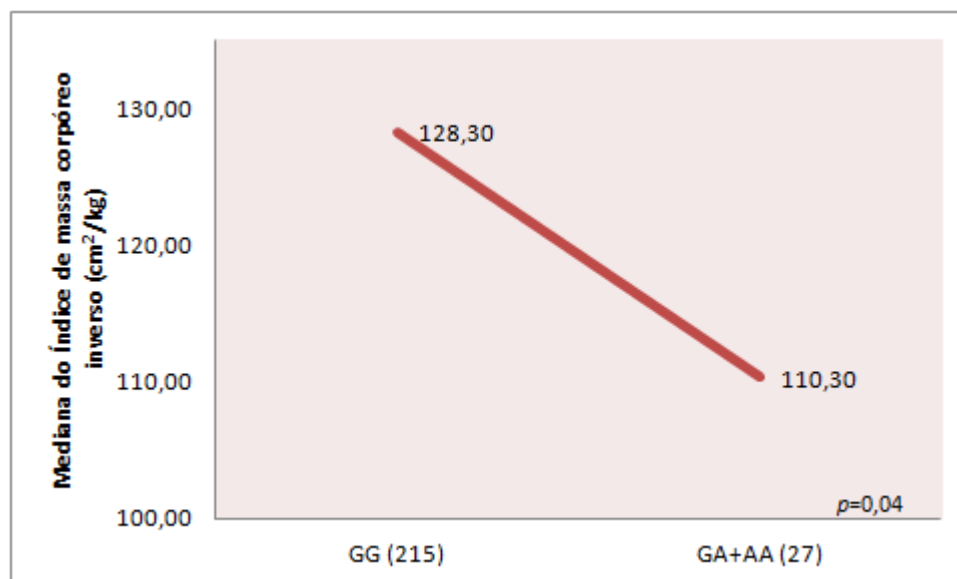
Gráfico 18: Variação da razão cintura/quadril em relação aos genótipos do polimorfismo rs3736265 do gene *PGCIA* na amostra total.



Os resultados também mostraram que o índice de massa corpóreo inverso foi influenciado pelos genótipos do polimorfismo rs3736265, sugerindo que os indivíduos que

apresentam o alelo mutado (A) tem um menor índice do que os homozigotos selvagens (GG) (Gráfico 19). Além disso, os dados também apresentam algumas tendências, como a influência dos genótipos no peso, no IMC, na pressão arterial diastólica, na glicose e nos triglicerídeos. Em todos estes casos foram encontrados que as associações dos heterozigotos (GA) com os homozigotos mutados (AA) estavam correlacionadas as reduções destes parâmetros, quando comparado aos homozigotos selvagens (GG).

Gráfico 19: Comportamento do índice de massa corpóreo inverso em relação ao polimorfismo rs3736265 do gene *PGCIA* na amostra total.



As mesmas variáveis foram investigadas para o grupo de eutróficos (Tabela 44), devido ao número reduzido de homozigotos mutados (AA), também foi utilizado o modelo dominante (GG vs GA+AA).

Tabela 44: Variações antropométricas e hemodinâmicas em relação ao polimorfismo rs3736265 do gene *PGC1A* em eutróficos.

	Genótipos				p
	N	GG	n	GA+AA	
Peso	92	62,98±9,32	16	61,9±9,2	0,68
IMC (kg/m²)	92	22,6 (21,2; 23,9)	16	21,0 (20,2; 24,0)	0,28
Circ. Abdominal (cm)	92	82,0 (74,0; 86,0)	16	77,8 (76,0; 81,8)	0,22
Circ. de quadril (cm)	92	98,3 (94,0; 102,0)	16	99,5 (97,3; 103,8)	0,26
Razão cintura/quadril (cm)	92	0,83 (0,78; 0,86)	16	0,80 (0,75; 0,83)	0,04
iIMC (cm²/kg)	92	105,5 (94,0; 116,2)	16	101,8 (93,3; 109,2)	0,24
PAS (mmHg)	80	117,29±12,84	16	113,1±9,9	0,22
PAD (mmHg)	80	76,60±10,20	16	75,6±9,8	0,73
Glicose (mg/dL)	87	91,0 (84,0; 96,0)	13	85,5 (82,8; 91,0)	0,08
Colesterol total (mg/dL)	87	183,48±35,74	13	187,5±33,0	0,70
HDL - Colesterol (mg/dL)	87	59,0 (47,0; 69,0)	13	62,5 (57,0; 75,2)	0,15
LDL - Colesterol (mg/dL)	86	105,42±21,89	13	103,8±29,2	0,86
VLDL - Colesterol (mg/dL)	86	16,0 (13,2; 22,3)	13	17,1 (13,5; 21,5)	0,74
Triglicerídeos (mg/dL)	87	80,0 (67,0; 114,0)	13	86,0 (67,05 106,5)	0,82
Proteína C reativa (mg/dL)	36	0,21 (0,06; 0,34)	7	0,17 (0,01; 0,24)	0,39
Hemoglobina Glicada (%)	37	4,7 (4,5; 5,1)	7	4,7 (4,1; 4,9)	0,45

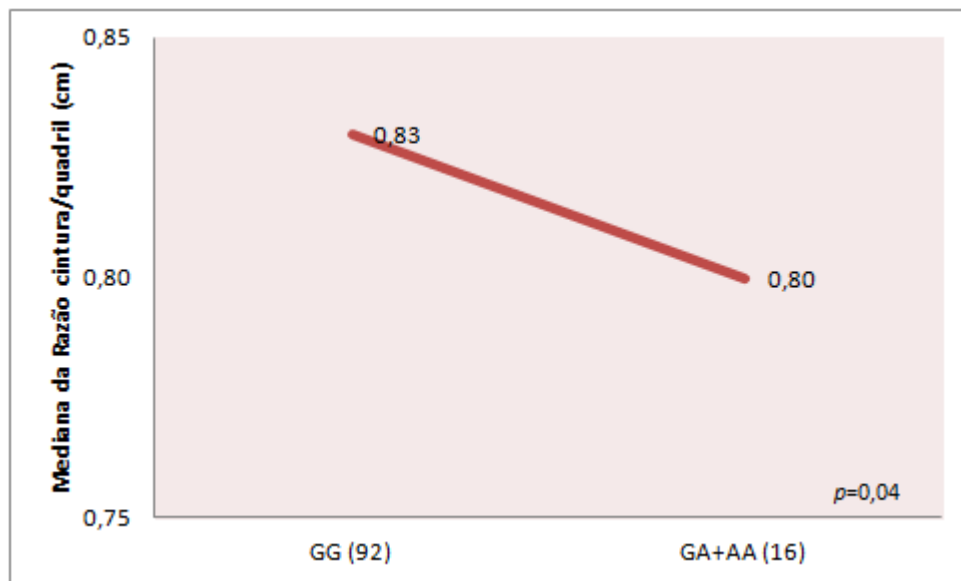
Legenda: PAS – pressão arterial sistólica; PAD – pressão arterial diastólica; IMC – índice de massa corpóreo; iIMC – índice de massa corporal invertido.

Nota: Os valores representam média ± desvio padrão para variáveis com distribuição normal ou mediana (percentil 25; percentil 75), para variáveis sem distribuição normal.

O p-valor é referente às diferenças entre as médias (variáveis com distribuição normal) ou medianas (variáveis sem distribuição normal).

No modelo dominante dos eutróficos, a combinação de heterozigotos (GA) com os homozigotos mutados (AA) associou-se as menores razões da cintura/quadril, quando comparado aos homozigotos selvagens (GG) (Gráfico 20). Os dados também mostram uma tendência de diminuição dos níveis de glicose nesta combinação.

Gráfico 20: Comportamento da razão cintura/quadril em relação ao polimorfismo rs3736265 do gene *PGC1A* nos eutróficos.



No grupo de obesos, as análises de variância foram baseadas apenas nos homozigotos selvagens (GG) e heterozigotos (GA), devido à ausência de homozigotos mutados (AA). Os resultados são mostrados na tabela 45.

Tabela 45: Variações antropométricas e hemodinâmicas em relação ao polimorfismo rs3736265 do gene *PGC1A* em obesos.

	Genótipos				<i>p</i>
	n	GG	n	GA	
Peso	125	125,69±30,03	11	119,26±24,27	0,49
IMC (kg/m²)	125	45,2 (39,7; 51,7)	11	46,3 (36,3; 49,8)	0,78
Circ. Abdominal (cm)	123	133,0 (121,0; 145,0)	11	125,0 (115,0; 146,0)	0,49
Circ. de quadril (cm)	123	140,0 (127,5; 152,0)	11	147,0 (131,0; 150,0)	0,47
Razão cintura/quadril (cm)	123	0,97 (0,91; 1,01)	11	0,92 (0,82; 0,97)	0,08
iIMC (cm²/kg)	123	144,8 (130,9; 160,5)	11	153,5 (115,2; 157,4)	0,84
PAS (mmHg)	80	137,05±23,11	9	129,0±17,31	0,32
PAD (mmHg)	80	86,55±16,54	9	83,67±16,22	0,62
Glicose (mg/dL)	70	97,5 (89,0; 109,0)	9	96,0 (85,5; 107,5)	0,50
Colesterol total (mg/dL)	95	202,74±44,61	10	181,20±42,06	0,15
HDL - Colesterol (mg/dL)	95	48,0 (42,0; 54,0)	10	48,0 (43,3; 57,3)	0,84
LDL - Colesterol (mg/dL)	91	123,58±34,71	10	111,40±37,29	0,30
VLD - Colesterol (mg/dL)	91	28,0 (19,0; 37,0)	10	19,0 (16,4; 24,3)	0,02
Triglicerídeos (mg/dL)	95	140,0 (97,0; 188,0)	10	95,0 (81,3; 122,5)	0,01
Proteína C reativa (mg/dL)	88	1,0 (0,57; 1,92)	10	1,31 (0,90; 1,74)	0,74
Hemoglobina Glicada (%)	65	5,1 (4,6; 5,6)	9	5,3 (4,5; 6,1)	0,78

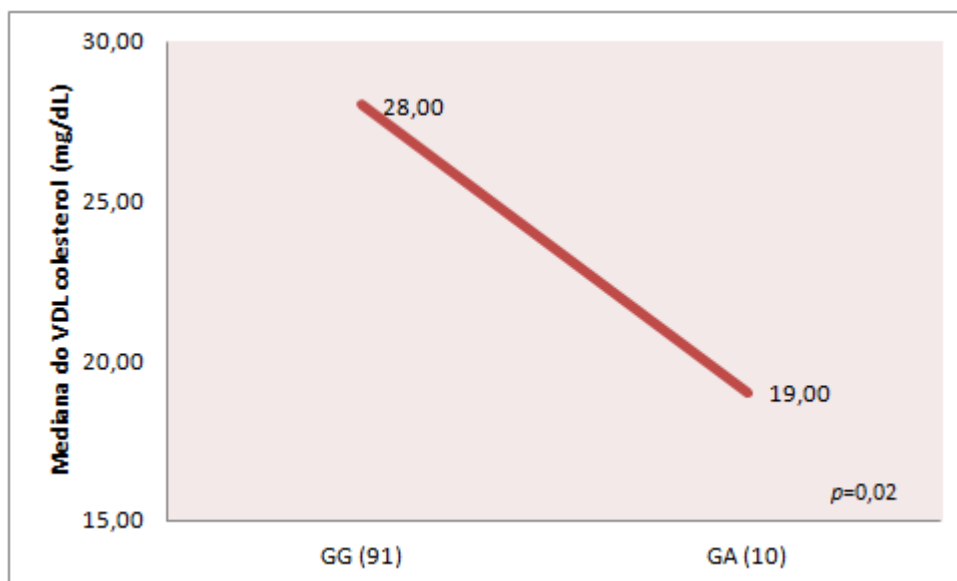
Legenda: PAS – pressão arterial sistólica; PAD – pressão arterial diastólica; IMC – índice de massa corpóreo; iIMC – índice de massa corporal invertido.

Nota: Os valores representam média ± desvio padrão para variáveis com distribuição normal ou mediana (percentil 25; percentil 75), para variáveis sem distribuição normal.

O *p*-valor é referente às diferenças entre as médias (variáveis com distribuição normal) ou medianas (variáveis sem distribuição normal).

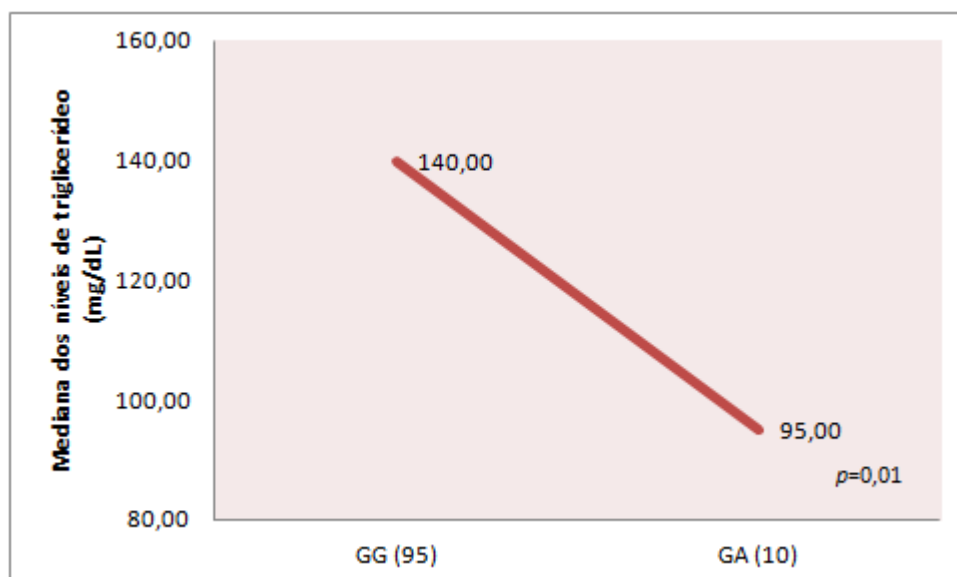
A amostra de obesos mostrou uma associação da diminuição dos níveis de VDL colesterol na presença do alelo mutante (A), representado pelo heterozigoto (GA), quando comparado ao homozigoto selvagem (GG) (Gráfico 21).

Gráfico 21: Variação dos níveis de VDL colesterol em relação ao polimorfismo rs3736265 do gene *PGCIA* na amostra de obesos.



Para finalizar as análises de variância, no grupo de obesos a presença do alelo mutante (A) também foi associado aos menores níveis de triglicerídeos, quando comparados aos homocigotos selvagens (GG), como pode ser visualizado no gráfico 22. E também foi observado uma tendência de redução da razão cintura/quadril nos heterocigotos (GA).

Gráfico 22: Variação dos níveis de triglicerídeos em relação ao polimorfismo rs3736265 do gene *PGCIA* na amostra de obesos.



As análises da associação do polimorfismo rs3736265 com a prevalência das comorbidades nos obesos são mostradas na tabela 46. Para finalizar os resultados deste polimorfismo, o grupo de obesos apresentou uma associação da variação gênica com a SM. Como podemos visualizar nesta tabela, houve um aumento significativo dos genótipos selvagens (GG) nesses indivíduos que apresentavam a patologia ($\chi_{(1)}^2 = 5,94; p=0,02$). Análises posteriores mostraram que os obesos homocigotos selvagens (GG) apresentam uma probabilidade quatro vezes maior de ter esta comorbidade, sugerindo ser um fator de risco de desenvolver esta patologia (Odd Ratio [OR] = 4,51; intervalo de confiança de 95% [CI] = 1,31-15,48). Devido à ausência dos homocigotos mutados (AA) não foram realizadas análises com os alelos.

Tabela 46: Correlação do polimorfismo rs3736265 do gene *PGC1A* na prevalência de DT2, SM e hipertensão em obesos.

Genótipo	Obesos				P
	Diabetes				
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
GG	33	97,1	91	90,1	0,20
GA+AA	1	2,9	10	9,9	
Genótipo	Hipertensão				P
	Hipertensão				
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
GG	82	92,1	43	87,8	0,18
GA+AA	7	7,9	6	12,2	
Genótipo	Síndrome Metabólica				P
	Síndrome Metabólica				
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
GG	76	95,0	24	80,0	0,02
GA+AA	4	5,0	6	20,0	

Nota: Os dados mostram os números de observações e a porcentagem. O P-valor é referente ao teste χ^2 com um grau de liberdade.

4.2.3.3 – Haplótipos entre os polimorfismos do gene *PGC1-α*

Os polimorfismos rs8192678 e rs3736265 do gene *PGC1A* foram analisados em conjunto, formando os haplótipos que podem ser visualizadas na tabela 47. Os resultados mostraram uma diminuição do haplótipo GA nos obesos (4,0%), quando comparado aos eutróficos (8,2%), mas esta diferença não foi significativa ($\chi_{(2)}^2 = 4,26$; $p = 0,12$). Análises posteriores, combinando os haplótipos GG/AG, mostraram que a presença destes aumenta duas vezes a probabilidade de desenvolver obesidade (Tabela 48), quando comparado ao GA (Odd Ratio [OR] = 2,12; intervalo de confiança de 95% [CI] = 1,01-4,47). No entanto, foi observado que os alelos dos polimorfismos estudados não estavam em desequilíbrio de ligação (eutróficos: $\chi_{(3)}^2 = 5,40$; $p = 0,15$; obesos: $\chi_{(3)}^2 = 5,66$; $p = 0,13$).

Tabela 47: Frequências haplotípicas polimorfismos rs8192678 e rs3736265 do gene *PGC1A* e associação à obesidade.

Haplótipos	Grupos			p
	Total	Eutróficos	Obesos	
GG	326 (66,80)	138 (64,0)	188 (69,1)	
GA	29 (5,9)	18 (8,2)	11 (4,0)	0,12
AG	133 (27,3)	60 (27,6)	73 (26,8)	

Os valores são apresentados na forma de frequência e porcentagem.

O p-valor é referente ao teste de homogeneidade entre os haplótipos dos eutróficos e obesos.

Tabela 48: Análise de fator de risco dos haplótipos do gene *PGC1A*.

Fator de risco	Grupo		Total
	Obesos	Eutróficos	
GG+AG	261	198	459
GA	11	18	29
Total	272	216	488

Odd Ratio	2,12	
IC 95%	1,01	4,47
χ^2	3,90	
P	0,05	

4.2.3- Gene *FNDC5*

Estudos apresentados na literatura ainda são raros relativos ao gene *FNDC5*, principalmente relacionados à variabilidade em sua sequência. O presente estudo avaliou as sequências das junções íntron-éxon e dos éxons 3, 4 e 5, através do sequenciamento automático. A realização desta técnica requer um PCR inicial para cada região de interesse e posterior purificação destes produtos de PCR. Todos os fragmentos selecionados para a amplificação do gene *FNDC5* exibiram o tamanho esperado, pois não observamos deleções, inserções e rearranjos. Nas análises das sequências foram identificadas quatro variações previamente descritas, sendo três nas regiões não codificantes e uma na codificante, como apresentado nos eletroferogramas (Figura 37) e na tabela 49. Além disso, nenhuma mutação foi detectada nas regiões de junção intron-éxon 3 e no éxon 3.

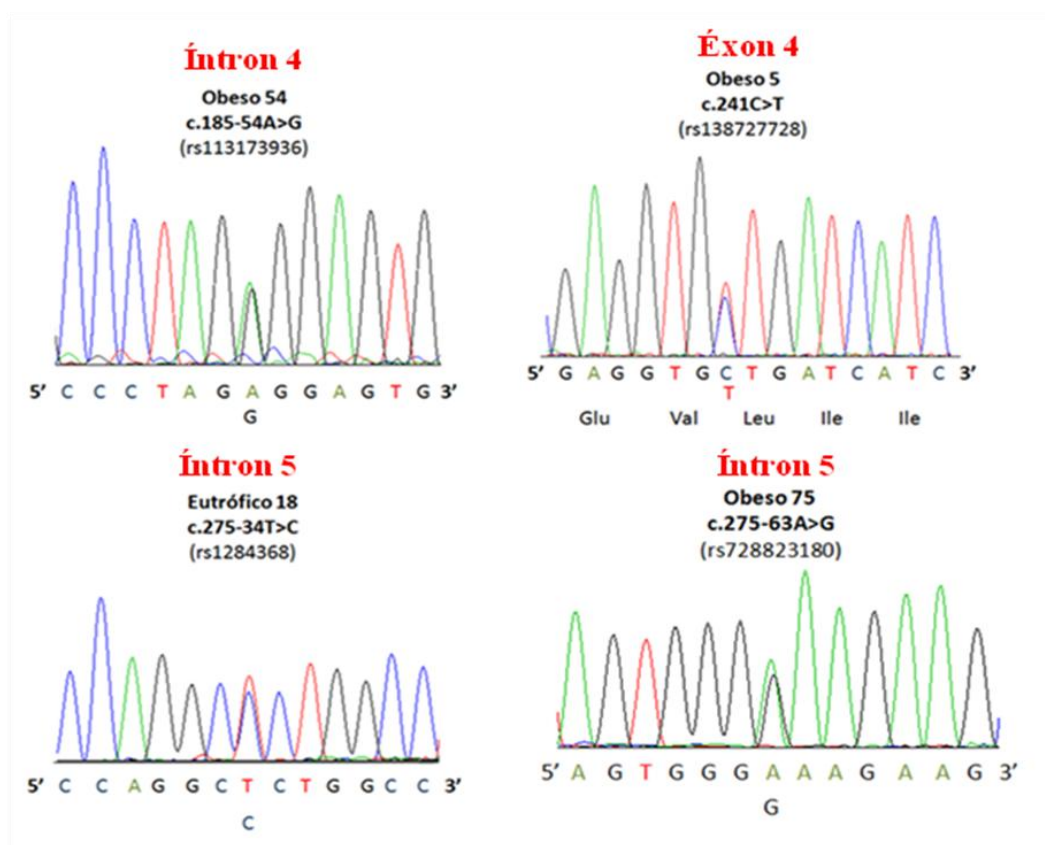


Figura 37: Eletroferogramas dos polimorfismos do gene *FNDC5* identificados neste estudo.

Tabela 49: Informações genéticas dos polimorfismos do gene *FNDC5*.

Código	Referência (NCBI)	Posição	Tipo de mutação
c.185-54A>G	rs113173936	Intron 4	-
c.241C>T	rs138727728	Éxon 4	Sinônima (p.Leu81=)
c.275-63A>G	rs72882318	Intron 5	-
c.275-34T>C	rs1284368	Intron 5	-

As frequências genótípicas e alélicas das variações encontradas no gene *FNDC5*, são mostradas na tabela 50. Há uma ausência dos homozigotos mutados em todas as mutações encontradas. Ademais, observamos que as frequências genótípicas e alélicas dos SNP estudados entre os grupos de obesos e eutróficos são similares, não encontrando diferenças significativas. Entretanto, no polimorfismo rs72882318 foi observada uma tendência de associação do alelo mutado com o desenvolvimento de obesidade ($\chi_{(1)}^2 = 3,08$; $p = 0,08$).

Tabela 50: Frequências genóticas e alélicas do gene *FNDC5* e associação ao fenótipo de obesidade.

Polimorfismos	Genótipos	Total		Eutróficos		Obesos		<i>p</i>	Alelos	Total		Eutróficos		Obesos		<i>p</i>
		N	%	N	%	n	%			n	%	N	%	n	%	
rs113173936 (c.185-54A>G)	AA	235	96,3	106	98,1	129	94,9	0,18	A	479	98,2	214	99,1	265	97,4	0,18
	AG	9	3,7	2	1,9	7	5,1		G	9	1,8	2	0,9	7	2,6	
Total		244	100	108	100	136	100		Total	488	100	216	100	272	100	
rs138727728 (c.241C>T)	CC	243	99,6	108	100	135	99,3	0,37	C	487	99,8	216	100	271	99,6	0,37
	CT	1	0,4	0	0	1	0,7		T	1	0,2	0	0	1	0,4	
Total		244	100	108	100	136	100		Total	488	100	216	100	272	100	
rs72882318 (c.275-63A>G)	AA	237	97,1	107	99,1	130	95,6	0,11	A	481	98,6	215	99,5	266	97,8	0,11
	AG	7	2,9	1	0,9	6	4,4		G	7	1,4	1	0,5	6	2,2	
Total		244	100	108	100	136	100		Total	488	100	216	100	242	100	
rs1284368 (c.275-34T>C)	TT	240	98,4	106	98,1	134	98,5	0,82	T	484	99,2	214	98,1	270	99,3	0,82
	TC	4	1,6	2	1,9	2	1,5		C	4	0,8	2	1,9	2	0,7	
Total		244	100	108	100	136	100		Total	488	100	216	100	272	100	

O *p*-valor é do teste de qui-quadrado realizado entre os genótipos dos eutróficos e obesos.

4.2.4.1 Influência do polimorfismo rs113173936 nos parâmetros estudados

As variações dos parâmetros antropométricos, pressóricos e bioquímicos foram analisadas em relação aos genótipos do polimorfismo rs113173936 na amostra de obesos (Tabela 51). Em virtude da ausência do homozigoto mutado (AA), as análises foram baseadas no homozigoto selvagem (GG) e heterozigoto (GA).

Tabela 51: Variáveis em relação ao polimorfismo rs113173936 do gene *FNDC5* na amostra de obesos.

	Genótipos				P
	n	GG	n	GA	
Peso	129	124,3±29,0	7	140,9±37,8	0,15
IMC (kg/m²)	129	45,2 (39,5; 50,9)	7	50,1 (40,1; 68,2)	0,17
Circ. Abdominal (cm)	127	133,0 (119,0; 145,0)	7	128,5 (127,0; 165,0)	0,49
Circ. de quadril (cm)	127	141,0 (128,0; 151,0)	7	154,0 (129,5; 181,0)	0,26
Razão cintura/quadril (cm)	127	0,96 (0,91; 1,01)	7	0,95 (0,86; 0,99)	0,66
iIMC (cm²/kg)	127	145,1 (131,5; 160,5)	7	148,4 (128,3; 155,8)	0,94
PAS (mmHg)	84	136,3±22,2	5	135,8±31,8	0,97
PAD (mmHg)	84	87,5±14,5	5	64,8±31,3	<0,01
Glicose (mg/dL)	73	96,0 (89,0; 108,0)	6	103,0 (95,5; 157,8)	0,35
Colesterol total (mg/dL)	98	200,2±45,5	7	208,0±31,5	0,66
HDL - Colesterol (mg/dL)	98	47,5 (41,8; 54,0)	7	50,0 (43,0; 56,0)	0,37
LDL - Colesterol (mg/dL)	94	121,9±35,7	7	128,6±24,9	0,63
VLD - Colesterol (mg/dL)	94	27,5 (18,0; 36,0)	7	25,0 (22,0; 32,0)	0,92
Triglicerídeos (mg/dL)	98	139,0 (89,8; 185,3)	7	123,0 (112,0; 160,0)	0,91
Proteína C reativa (mg/dL)	91	1,15 (0,60; 1,93)	6	0,74 (0,34; 2,0)	0,30
Hemoglobina Glicada (%)	68	5,1 (4,6; 5,6)	6	5,1 (4,3; 6,7)	0,96

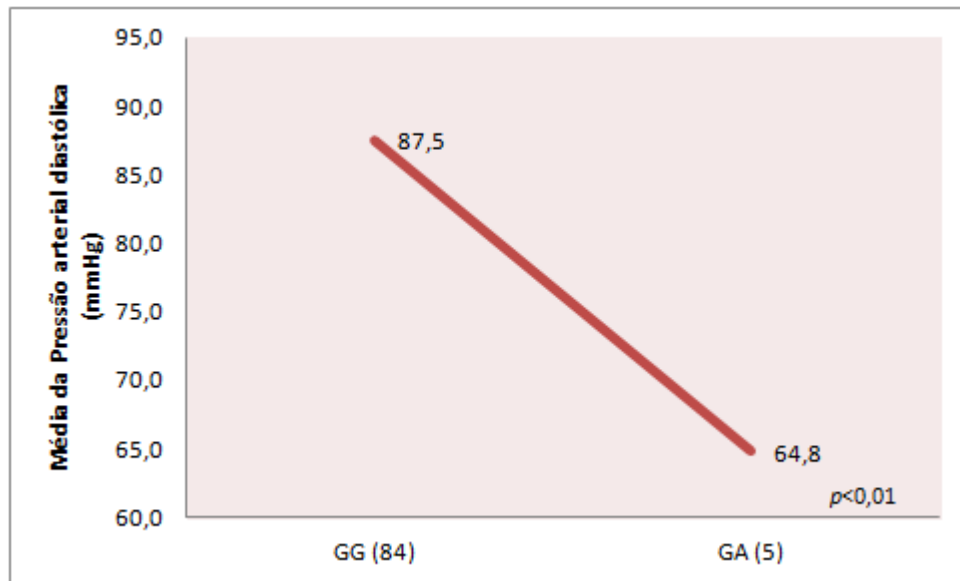
Legenda: PAS – pressão arterial sistólica; PAD – pressão arterial diastólica; IMC – índice de massa corpóreo; iIMC – índice de massa corporal invertido.

Nota: Os valores representam média ± desvio padrão para variáveis com distribuição normal ou mediana (percentil 25; percentil 75), para variáveis sem distribuição normal.

O *p*-valor é referente às diferenças entre as médias (variáveis com distribuição normal) ou medianas (variáveis sem distribuição normal).

Os resultados mostraram uma diminuição significativa da média da PAD na presença do alelo mutado (A) na amostra de obesos (Gráfico 23).

Gráfico 23: Influência do polimorfismo rs113173936 do gene *FNDC5* nas diferenças da PAD no grupo de obesos.



Como há poucos eutróficos heterozigotos (GA) e nenhum homozigoto mutado (AA), as variáveis dos fatores quantitativos não foram investigadas para este grupo.

4.2.4.2 Influência do polimorfismo rs72882318 nos parâmetros estudados

As variações dos parâmetros antropométricos e hemodinâmicos foram analisadas em relação aos genótipos do polimorfismo rs72882318 nos obesos (Tabela 52). Devido à ausência do homozigoto mutado (GG), as análises foram baseadas no homozigoto selvagem (AA) e heterozigoto (AG). Como há poucos eutróficos heterozigotos (AG) e nenhum homozigoto mutado (GG), as variáveis dos fatores quantitativos não foram investigadas para este grupo.

Tabela 52: Variáveis em relação ao polimorfismo rs72882318 do gene *FNDC5* na amostra de obesos.

	Genótipos				<i>p</i>
	n	AA	n	AG	
Peso	130	125,8±30,1	6	112,0±10,45	0,27
IMC (kg/m²)	130	45,4 (39,6; 51,3)	6	42,5 (38,4; 49,3)	0,53
Circ. Abdominal (cm)	129	133,0 (119,0; 145,8)	5	126,0 (121,5; 139,5)	0,55
Circ. de quadril (cm)	129	141,0 (128,0; 152,0)	5	141,0 (129,3; 147,5)	0,97
Razão cintura/quadril (cm)	129	0,96 (0,91; 1,01)	5	0,98 (0,87; 0,99)	0,89
iIMC (cm²/kg)	129	145,7 (130,4; 158,9)	5	143,0 (127,6; 179,9)	0,74
PAS (mmHg)	84	86,6±16,3	5	142,4±22,6	0,53
PAD (mmHg)	84	86,6±16,3	5	142,4±22,57	0,47
Glicose (mg/dL)	74	97,0 (89,0; 109,0)	5	99,0 (90,5; 105,0)	0,98
Colesterol total (mg/dL)	100	199,4±45,3	5	226,2±12,52	0,19
HDL - Colesterol (mg/dL)	100	48,0 (41,3; 54,8)	5	49,0 (46,0; 52,5)	0,67
LDL - Colesterol (mg/dL)	96	121,5±35,4	5	139,4±21,8	0,27
VLD - Colesterol (mg/dL)	96	25,0 (18,0; 34,8)	5	32,0 (30,0; 48,0)	0,05
Triglicerídeos (mg/dL)	100	128,0 (90,5; 183,5)	5	159,0 (149,5; 238,5)	0,09
Proteína C reativa (mg/dL)	92	1,1 (0,56; 1,92)	5	1,15 (0,89; 1,76)	0,73
Hemoglobina Glicada (%)	69	5,0 (4,6; 5,8)	5	5,3 (5,1; 5,5)	0,45

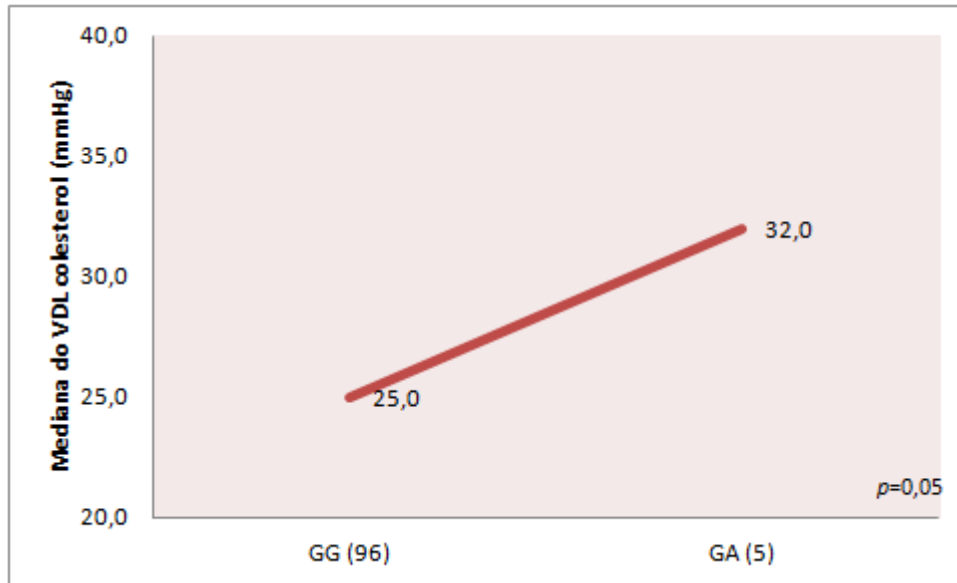
Legenda: PAS – pressão arterial sistólica; PAD – pressão arterial diastólica; IMC – índice de massa corpóreo; iIMC – índice de massa corporal invertido.

Nota: Os valores representam média ± desvio padrão para variáveis com distribuição normal ou mediana (percentil 25; percentil 75), para variáveis sem distribuição normal.

O *p*-valor é referente às diferenças entre as médias (variáveis com distribuição normal) ou medianas (variáveis sem distribuição normal).

No grupo de obesos, também há diferenças significativas entre as medianas do VDL colesterol e uma tendência no triglicerídeo em relação aos genótipos, apresentando um perfil de aumento destes níveis bioquímicos na presença do alelo mutante (G) (Gráfico 24).

Gráfico 24: Relação dos níveis de VDL colesterol com os genótipos do polimorfismo rs72882318 do gene *FNDC5*.



4.2.4.3 Haplótipos entre os polimorfismos do gene *FNDC5*

Os polimorfismos rs113173936 e rs72882318 encontrados no gene *FNDC5* foram combinados para análise haplotípica onde podemos observar as frequências na tabela 53. Em virtude da ausência do homocigoto mutado em ambos os polimorfismos, foram observados apenas três haplótipos (AA, AG e GA). Nossos resultados mostraram as frequências haplotípicas similares entre os grupos ($\chi_{(2)}^2 = 3,08$; $p = 0,21$). Análises de desequilíbrio de ligação mostraram que os alelos de ambos os grupos não estão ligados (eutróficos: $\chi_{(2)}^2 = 0,00$; $p = 1,00$; obesos: $\chi_{(2)}^2 = 0,00$; $p = 1,00$).

Tabela 53: Frequências haplotípicas dos polimorfismos rs113173936 e rs72882318 no gene *FNDC5* e associação ao fenótipo obesidade.

Haplótipos	Grupos			p
	Total	Eutróficos	Obesos	
AA	471 (96,5)	259 (95,2)	212 (98,1)	
AG	8 (1,6)	6 (2,2)	2 (0,9)	0,21
GA	9 (1,8)	7 (2,6)	2 (0,9)	

Os valores são apresentados na forma de frequência e porcentagem.
O p-valor é referente ao teste de homogeneidade entre os haplótipos dos eutróficos e obesos.

5 Discussão

A industrialização e suas consequências econômicas levaram a uma força de trabalho cada vez mais urbanizada e sedentária. Este cenário associado à diminuição do tempo gasto para a alimentação possibilitou a globalização de um mercado de alimentos processados, com alto teor de gordura, baixo custo e rapidamente consumíveis. A redução no gasto de energia e o aumento da ingestão calórica tem contribuído para o conhecido ambiente obsogênico (UNGER, 2003; SWINBURN *et al.*, 2011). Apesar da população habitar ambientes cada vez mais obsogênicos, uma parte tem mantido e uma grande parte tem aumentado o seu peso. Este fato evidencia que essas diferenças não podem ser explicadas apenas por mudanças no estilo de vida, econômicas ou fatores ambientais, indicando um importante papel genético neste aumento de peso (BELL *et al.*, 2005). Além disso, a obesidade está associada ao surgimento de inúmeras comorbidades que prejudicam a qualidade de vida e agravam o prognóstico dos pacientes. Entre elas destacam-se a DT2, SM, o câncer e doenças cardiovasculares (LEITE *et al.*, 2009). O presente estudo analisou variações em genes relacionados à adipogênese, ao metabolismo de glicose e lipídeos e ao balanço energético, que poderiam estar relacionadas ao desenvolvimento de obesidade e patologias associadas.

5.1 Gene *ADIPOQ*

O gene *ADIPOQ* codifica uma proteína denominada adiponectina, produzida exclusivamente pelos adipócitos. Ela apresenta uma alta concentração plasmática, mas baixos níveis desta adipocina têm sido encontrados nos indivíduos com obesidade, SM, DT2 e hipertensão (KERN *et al.*, 2003; ADAMCZAK & WIECEK, 2013). Estudos anteriores mostraram que variações no gene *ADIPOQ* estão associadas a diferenças nos níveis da adiponectina no plasma (HEGENER *et al.*, 2006). Ambos os polimorfismos estudados estão localizados no intron 1 e podem afetar a atividade transcricional deste gene (HEGENER *et al.*, 2006; GU, 2009).

Em nosso estudo o primeiro polimorfismo do gene *ADIPOQ* analisado foi o rs17366568 que corresponde à troca de uma guanina por adenina. Segundo o HapMap, a prevalência do alelo mutado (A) na população mundial é de 5%, sendo a maior frequência encontrada no continente europeu (11%) e a menor no asiático (2%). Na nossa população

encontramos uma prevalência de 11%, similar à observada na Europa. Este polimorfismo foi encontrado em desequilíbrio de HW na amostra de controles e obesos. Uma possível razão seria a baixa frequência do alelo mutado (A) e o pequeno tamanho amostral.

Em estudo de dados da literatura nos quais foram analisados níveis plasmáticos de adiponectina mostraram que o alelo selvagem do polimorfismo rs17366568 está associado a maiores níveis desta proteína em populações europeias (HIVERT *et al.*, 2008; SITTONEN *et al.*, 2011; HEID *et al.*, 2011). Entretanto, não foram encontradas associações em mulheres afro-americanas (COHEN *et al.*, 2009), sugerindo que o patrimônio genético de diferentes populações pode exercer influências no fenótipo analisado. Nossos resultados baseados em genotipagem mostraram que este polimorfismo não apresentou resultados significativos em ambas as amostras. Apesar de poucos trabalhos analisarem o SNP, todos os resultados encontrados corroboram os nossos resultados. Entre os trabalhos publicados podemos destacar o de Hivert e colaboradores (2008), que também não observaram associação deste polimorfismo com o IMC, com a circunferência abdominal e na influência da prevalência de diabetes na população de obesos com descendência exclusivamente europeia. Em adição, o trabalho realizado por Siitonen e colaboradores (2011) também não demonstrou associação com o IMC e diabetes em europeus da Finlândia. Até o momento, não foram estabelecidas associações entre o polimorfismo rs17366568 e os níveis de adiponectina na população brasileira. Estudos posteriores poderão elucidar a relação desse polimorfismo com os níveis da proteína na nossa população e os fenótipos associados à obesidade e comorbidades.

Outro polimorfismo do mesmo gene o rs182052, que corresponde à troca do nucleotídeo adenina por guanina, foi objeto de estudo do nosso trabalho. Segundo o HapMap, o alelo mutado (A) tem uma prevalência mundial de 41% e varia bastante entre as populações (Tabela 54).

Tabela 54: Frequências alélicas do polimorfismo rs182052 do gene *ADIPOQ* em diferentes estudos.

Autor	Ano	População	n	Alelos	
				G	A
Kong <i>et al</i>	2013	Coréia do sul	237	47,0	53,0
Hegener <i>et al</i>	2006	EUA (Boston)	600	66,0	34,0
AlSaleh <i>et al</i>	2011	Inglaterra	448	62,0	38,0
Henneman <i>et al</i>	2010	Holanda	2256	68,0	32,0
Ong <i>et al</i>	2010	China	1616	58,0	42,0
Presente estudo	2014	Brasil (RJ)	244	67,0	33,0

As frequências estão representadas na forma de porcentagem.

Os resultados encontrados mostraram que embora este polimorfismo não mostrasse associação ao fenótipo obesidade, o alelo mutado (A) estava associado ao aumento de diversos traços da obesidade na nossa amostra, como a circunferência do quadril e tendências no IMC e circunferência abdominal. Posteriormente, estratificamos a população por IMC e observamos que nos eutróficos, este alelo está associado ao aumento da circunferência abdominal, do quadril e uma tendência no peso. Não encontramos resultados similares nos obesos totais, mas analisando apenas os de grau 3, observamos que este alelo associou-se ao aumento do peso, do IMC e uma tendência na circunferência do quadril. Nesses casos, os homozigotos mutados (AA) representaram os maiores níveis desses parâmetros.

Diversos estudos em diferentes populações mostraram que os níveis de adiponectina se encontravam diminuídos na presença do alelo mutado (A), quando comparado ao alelo selvagem (G) (KYRIAKOU *et al.*, 2008; WASSEL *et al.*, 2010; ONG *et al.*, 2010). Os nossos resultados aliados ao que foi observado na literatura nos permitem sugerir que o polimorfismo rs182052 possa estar afetando os níveis da adiponectina na nossa amostra, causando uma desregulação do equilíbrio energético por diminuir o gasto calórico. Este quadro associado a um ambiente obesogênico acaba resultando no aumento da adiposidade corporal tanto em indivíduos eutróficos como obesos. Nosso raciocínio está na mesma linha do estudo de Kern e colaboradores (2003), que observaram que todos os indivíduos de sua amostra (eutróficos e obesos), apresentavam uma associação inversa entre o IMC e a adiponectina plasmática, ou seja, quando aumentava a gordura do corpo, diminuía significativamente a concentração desta adipocina (vice-versa). Além disso, nossos resultados são corroborados por Sutton e colaboradores (2005), que observaram correlação deste polimorfismo com o IMC e medidas

de obesidade, como a circunferência abdominal em americanos hispânicos. Resultados similares também foram observados em mulheres coreanas, no qual o alelo mutado (A) estava associado ao aumento do peso e IMC da amostra composta por eutróficos e obesos (DOO & KIM, 2010). Em caucasianos americanos, os pesquisadores observaram uma interessante interação entre o polimorfismo e a circunferência da cintura associada ao nível plasmático da adiponectina. Os indivíduos com o genótipo AA tinham 15,6% a menos da proteína na circulação e apresentavam um aumento da circunferência abdominal (WASSEL *et al.*, 2010). Acreditamos que não encontramos associação destas características clínicas no grupo de obeso total e sim apenas nos obesos mórbidos, por questões amostrais.

Até o presente momento, há alguns artigos que associam e outros não, o gene *ADIPOQ* com o risco de SM, DT2, obesidade e hipertensão (SCHWARZ *et al.*, 2006; HIVERT *et al.*, 2008; BÖSTROM *et al.*, 2009; KERN *et al.*, 2003; DU *et al.*, 2009). O nosso estudo não encontrou uma associação do polimorfismo rs182052 com estas patologias, porém, apenas com alguns traços de aumento da adiposidade corporal. Este resultado é diferente do observado por Böstrom e colaboradores (2009), que encontraram associação do alelo mutado (A), tanto heterozigotos (GA) como homozigotos (AA), com a DT2 em afro-americanos. No entanto, Hivert e colaboradores (2008), estudaram a associação deste SNP em 2543 indivíduos com descendência exclusivamente europeia e não observaram associação. Uma possível explicação para essas diferenças entre os trabalhos seria em virtude dos afro-americanos apresentarem uma quantidade significativamente menor de adiponectina, quando comparado aos caucasianos (WASSEL *et al.*, 2010). Tal fato combinado com o polimorfismo rs182052 diminuiria ainda mais os níveis desta proteína, aumentando o risco de desenvolver DT2. Com relação ao nosso trabalho, as diferenças podem ser explicadas em função do tamanho amostral, critérios de inclusão da amostra e diversidade genética, uma vez que a população brasileira é altamente miscigenada. Já com relação a SM, o nosso resultado é corroborado pelos estudos realizados na população da China e da Holanda, no qual também não observaram associação deste SNP com esta comorbidade (DU *et al.*, 2009; HENNEMAN *et al.*, 2010). Com relação à hipertensão, Ong e colaboradores (2010) também não encontraram associação deste polimorfismo com a pressão alta em Hong Kong.

No nosso estudo também realizamos a análise haplotípica dos polimorfismos rs17366568 e rs182052 na amostra. Os resultados mostraram que o haplótipo AG é um fator de proteção da obesidade, uma vez que houve um aumento da frequência nos eutróficos quando comparados aos obesos. Entretanto, estes alelos não estão ligados. Este resultado é corroborado por Heid e colaboradores (2011), que através de estudos GWA utilizando 4659

européus, verificaram que o polimorfismo rs17366568 não está ligado a nenhum outro SNP do gene *ADIPOQ*. Ademais, Cohen e colaboradores (2009) também encontraram que este polimorfismo não está ligado a nenhum outro da região, incluindo o rs182052. Alguns haplótipos formados no gene *ADIPOQ* têm sido associados com fenótipos relacionados à obesidade (BOUATIA-NAJI *et al.*, 2006) e a variação nos níveis de adiponectina (KYRIAKOU *et al.*, 2008). No entanto, até o presente momento, nenhum estudo prévio mostrou associação do haplótipo entre estes dois polimorfismos.

5.2 Gene *RARRES2*

O gene *RARRES2* codifica uma proteína que teve seu papel de adipocina reconhecido há pouco anos (BOZAOGLU *et al.*, 2007). Esta proteína, chamada quemerina, tem mostrado uma atuação importante na adipogênese, processos inflamatórios e metabolismo da glicose e lipídeo (BOZAOGLU *et al.*, 2007; GORALSKI *et al.*, 2007; ERNST & SINAL, 2010), podendo ser esta adipocina a chave para o desenvolvimento de desordens metabólicas (ERNST & SINAL, 2010). Apesar da interessante ação da quemerina no corpo, poucos grupos de cientistas tem investigado a influência das variações nucleotídicas deste gene nos níveis de circulação da quemerina (BOZAOGLU *et al.*, 2010). E dado o seu potencial em processos que possam desenvolver complicações metabólicas, o presente estudo investigou a associação de dois polimorfismos (rs17173608 e rs4721) localizados no intron 3 e na região 3'UTR. A função destes polimorfismos ainda não foi totalmente esclarecida, mas sabe-se que podem afetar a expressão do gene e não a atividade da proteína (MÜSSIG *et al.*, 2009).

Entre as variantes genéticas estudadas do gene *RARRES2*, o polimorfismo rs17173608 que corresponde à troca de uma timina por guanina, mostrou ter seu alelo mutado (G) com uma prevalência de 8%. Na população sudoeste do Irã, este alelo tem uma prevalência de 16,7% (HASHEMI *et al.*, 2012). Segundo o HapMap, a frequência deste alelo na população mundial é 6%, com a sua maior frequência encontrada na África (21%) e a menor na Europa (5%). Com relação as nossas análises, devida a raridade e a ausência do homozigoto mutado nos eutróficos, os cálculos estatísticos foram baseados no modelo dominante (TT vs TG+GG).

Inicialmente, observamos que o polimorfismo rs1717608 encontra-se em desequilíbrio de HW na amostra obesos. Não há uma explicação clara para este desequilíbrio, mas uma possível razão seria a baixa frequência do alelo mutado (G) e o pequeno tamanho amostral.

Visto que a quemerina atua na adipogênese do corpo (BOZAOGLU *et al.*, 2007), investigamos se a presença do polimorfismo rs17173608 exerce algum efeito na adiposidade corporal. Apesar dos nossos resultados não mostrarem uma associação do polimorfismo com o fenótipo obesidade, encontramos que o alelo mutado (G) está associado à diminuição da razão cintura-quadril na amostra. Para aumentar o poder estatístico, estratificamos nossa amostra por IMC, dividindo em eutróficos e obesos. Desta forma permitiu-nos observar que nos eutróficos a presença deste alelo mutado também está associada ao aumento da circunferência do quadril. Nos obesos, os resultados mostraram que este mesmo alelo se associou a diminuição da razão cintura-quadril e iIMC. Este quadro sugere que o polimorfismo rs17173608 tem uma influência na adiposidade corporal. Há poucos relatos na literatura relacionados a este polimorfismo, no entanto, MÜSSIG e colaboradores (2009) encontraram associação da diminuição da razão cintura-quadril e da gordura visceral em eutróficos na presença do alelo mutado (G). Mas, não observaram associação nos indivíduos obesos. Este resultado foi diferente do observado na nossa amostra de controles, uma vez que não encontramos influência deste SNP na obesidade visceral. Uma possível razão seria as diferenças técnicas entre os estudos, uma vez que eles utilizaram imagem de ressonância magnética nuclear (MRI), enquanto usamos uma quantificação mais relativa baseada na circunferência abdominal. Além disso, eles também não utilizaram a circunferência do quadril como um dado, mostrando apenas a razão cintura-quadril. Por esta razão apesar de serem feitas da mesma forma, não observamos os mesmos resultados, que poderia indicar a influência de fatores individuais e ambientais, ou ainda um possível efeito da interação com outras variantes genéticas que não foram investigadas no estudo. Com relação à amostra de obesos, observamos que o rs17173608 está associado com a diminuição da gordura corporal. Apesar deste resultado não ter sido encontrado no estudo anterior, nossos achados estão na mesma linha do estudo realizado por Bozaoglu e colaboradores (2007), que mostraram um efeito positivo entre a concentração plasmática da quemerina e medidas de adiposidade corporal, como o IMC, massa de gordura, peso e razão cintura-quadril. Com base neste quadro, pode-se sugerir que de alguma forma ainda não elucidada, o alelo mutado (G) do polimorfismo rs17173608 poderia estar influenciando nos níveis plasmáticos da quemerina, causando uma redução desta proteína, que estaria associado à diminuição da adiposidade do corpo, principalmente a visceral nos obesos.

Os níveis de quemerina também têm sido relacionados aos fenótipos da síndrome metabólica (glicemia, insulinemia, HDL colesterol, triglicerídeos e pressão arterial) (BOZAOGLU *et al.*, 2007). Nossos resultados mostraram que a presença do alelo mutado (G)

nos eutróficos está associada ao aumento da glicemia no corpo. Estudos realizados por Goralski e colaboradores (2007), mostraram que camundongos knockdown para quemerina em adipócitos maduros, reduziam a expressão de genes relacionados ao metabolismo de glicose corporal, entre estes podemos destacar o transportador de glicose, conhecido como GLUT4. Este transportador está presente no tecido adiposo, músculo esquelético e músculo cardíaco; e é responsável por captar glicose para estes tecidos (BRYANT *et al.*, 2002). Tal fato nos permite sugerir que o polimorfismo rs17173608 possa diminuir a expressão da quemerina e conseqüentemente a do GLUT4, o que diminuiria a captação de glicose, fazendo com que se tivessem maiores níveis deste açúcar no sangue. Apesar de não encontrarmos resultados similares em obesos, diversos estudos mostraram que os níveis de quemerina são elevados neste grupo quando comparados a eutróficos (BOZAOGLU *et al.*, 2007), sendo possível que esta diminuição não seja forte o suficiente para interferir no metabolismo de glicose. Ou ainda, que existam outras variações genéticas que possam estar influenciando neste resultado.

Ainda em relação aos obesos avaliados no estudo, não encontramos associação deste polimorfismo com a presença de DT2, hipertensão e SM. No entanto, estudos prévios mostraram que carreadores do alelo mutado (heterozigotos – TG; e homozigotos mutados – GG) relacionaram-se com o desenvolvimento da SM na população do Irã (HASHEMI *et al.*, 2012). As diferenças entre os nossos trabalhos podem ser explicadas pela seleção do critério de inclusão da amostra, uma vez que utilizaram basicamente indivíduos com peso normal, enquanto usamos somente obesos.

O rs4721 foi a segunda variante genética que estudamos do gene *RARRES2*, que corresponde a troca de uma timina por guanina na região 3' UTR. Com base nos dados fornecidos pelo Ensemble, obtivemos que o alelo mutado tem uma frequência de 47% na população mundial. Sendo a maior frequência encontrada na Nigéria com 68% e a menor na Península Ibérica com 29%. Como podemos observar, este polimorfismo apresenta uma grande variação nas frequências entre as populações, no entanto, na nossa amostra a frequência foi similar à encontrada na população mundial.

Inicialmente, analisamos a influência deste polimorfismo no fenótipo da obesidade. Entretanto, ambos os grupos estudados apresentaram frequências semelhantes, não sendo correlacionado à adiposidade corporal. Além disso, também não encontramos associação com os parâmetros antropométricos utilizados para medir de forma relativa à gordura do corpo. Até o momento há apenas dois trabalhos na literatura científica com o SNP rs4721. O primeiro foi realizado por Müssig e colaboradores (2009) que encontraram que os carreadores

do alelo mutado estavam associados à diminuição do IMC e gordura visceral na população de Tübingen, na Alemanha. Após estratificarem a amostra por IMC, observaram que a adiposidade visceral estava associada aos indivíduos não obesos (eutróficos e sobrepeso), não sendo encontrados resultados semelhantes no grupo de obesos. O segundo trabalho foi um GWA, realizado na população do Reino Unido (MIN *et al.*, 2012). Através da detecção dos polimorfismos alvos e RNAm, observaram que o rs4721 está associado com IMC, circunferência do quadril e com os níveis de expressão da quemerina. Os resultados diferentes podem ser explicados pelo distinto background étnico dos participantes, uma vez que nossa amostra apresenta uma alta mistura étnica, enquanto que os dois estudos foram realizados em países da Europa, que possuem uma mistura significativamente menor de diferentes etnias. Além disso, pode estar também relacionado ao tamanho amostral do nosso estudo e os critérios de inclusão de indivíduos, uma vez que estes estudos selecionaram indivíduos sem ser baseado no IMC, enquanto este índice fez parte da nossa seleção.

Posteriormente, investigamos o efeito deste polimorfismo nos parâmetros pressóricos e bioquímicos estabelecidos previamente pelo estudo. Nossos resultados mostraram que o SNP rs4721 está correlacionado com a pressão arterial sistólica na nossa amostra total. Quando estratificamos a amostra com base no IMC, observamos que apenas os obesos ainda apresentavam uma tendência com relação a esta pressão, tendo os portadores do alelo selvagem (T) os maiores níveis pressóricos. Há apenas um relato na literatura que associa o polimorfismo com a pressão arterial. Este trabalho foi realizado por Min e colaboradores (2012), citado anteriormente, que encontraram um efeito do alelo mutado apenas na pressão arterial diastólica. Nos últimos anos, estudos em humanos tem mostrado uma associação positiva entre a circulação da quemerina e a pressão arterial em diversas amostras, como DT2, obesos e SM (CHU *et al.*, 2012; BOZAOGLU *et al.*, 2007). No entanto, ainda não foi elucidado de que forma esta proteína poderia controlar a pressão, mas é sugerido que seu efeito esteja relacionado à alta expressão nos rins, que é um sítio de regulação da pressão arterial. Com base na literatura, encontramos que os obesos apresentam maiores níveis de quemerina, quando comparado aos eutróficos (BOZAOGLU *et al.*, 2007). Tal fato associado aos maiores níveis desta proteína na presença do alelo selvagem (T) indica uma possível implicação do aumento da pressão arterial sistólica.

Ainda com relação aos obesos, encontramos um efeito deste polimorfismo na presença de DT2. Nossos resultados mostraram que a presença do heterozigoto (TG) é um fator de risco da prevalência de DT2 na nossa amostra, enquanto que o homozigoto selvagem (TT) e mutado (GG) são fatores de proteção. Não encontramos na literatura nenhuma associação

deste polimorfismo com esta comorbidade para que pudéssemos comparar e também não temos uma explicação para este resultado. Um fato bem curioso é que se repararmos nossas análises dos parâmetros quantitativos, a maior parte delas mostram os heterozigotos responsáveis pelos maiores níveis de medidas de adiposidade, pressóricos e bioquímicos, tanto na amostra de obesos como na de eutróficos. Sugerindo que na nossa população miscigenada o genótipo heterozigoto (TG) pode estar relacionado aos piores fenótipos, mas seria necessário aumentarmos nosso tamanho amostral para maiores conclusões.

As análises de haplótipos entre os rs17173608 e rs4721 mostraram que existe um desequilíbrio de ligação entre seus alelos selvagens. Nossos resultados indicaram uma frequência do haplótipo TT maior que a esperada em ambos os grupos. As frequências foram similares entre os grupos, não mostrando influência no fenótipo obesidade. Este fato pode sugerir que estes alelos estão sendo segregados juntos talvez associados a algum outro fator que não a obesidade e que merece análises mais apuradas para sua elucidação.

5.3 Gene *PGC1- α*

O gene *PGC1- α* codifica um coativador transcricional que é crucial para o metabolismo de energia na célula, pois atua na regulação da biogênese mitocondrial, na respiração celular, no desenvolvimento de células adiposas e no metabolismo de lipídeos e glicose. Os dois polimorfismos mais comuns da região codificante são rs8192678 e rs3736265, localizados no éxon 8 e 9, que acarretam a mudança de aminoácido Gly482Ser e Thr612Met (NITZ *et al.*, 2007). Devido este gene estar envolvido com o metabolismo do corpo e a sua desregulação estar associada ao desenvolvimento de complicações metabólicas em algumas populações, incluímos ambos os polimorfismos no nosso estudo da amostra do Rio de Janeiro.

Na análise do SNP rs8192678, que apresenta uma ampla variação na frequência do alelo mutado (A) na população mundial (Figura 38) observamos uma frequência de 27%, enquanto que a média mundial é de 29%. Segundo o HapMap, a maior prevalência deste alelo são nos países asiáticos (média de 45%) e europeus (média de 36%); e a menor são nos países africanos (média de 5%). As altas frequências do aminoácido serina nas ilhas do pacífico têm sido explicadas como se o alelo mutado (A) tivesse sido positivamente selecionado ou tivessem tido um efeito neutro nos ancestrais e aumentado por deriva genética, especialmente o efeito gargalo de garrafa (MYLES *et al.*, 2011)



Figura 38: Distribuição da frequência mundial do polimorfismo rs8192678 do gene *PGC1A*. A frequência do aminoácido serina codificado pelo alelo mutado (A) em cada população está indicada em preto. WSN, Samoa ocidental; TON, Tonga; COK, Ilha Cook; MRI, Maori.

Fonte: Adaptado de Myles *et al.*, 2011 pp. 4

Uma vez que o *PGC1- α* atua no metabolismo do corpo, investigamos o efeito do polimorfismo rs8192678 no desenvolvimento da obesidade. Nossos resultados mostraram que ambos os grupos estudados apresentaram frequências semelhantes, não sendo associado à adiposidade corporal. No entanto, observamos que eutróficos heterozigotos, apresentam um aumento do peso. Interessantemente, um estudo realizado em brancos europeus mostrou que o genótipo heterozigoto estava associado a diminuição do IMC, circunferência do quadril, gordura corporal e com aumento do HDL colesterol em mulheres. Ao dividirem a amostra por IMC, observaram que o heterozigoto era um fator de proteção de desenvolver obesidade (ESTERBAUER *et al.*, 2002). Não temos uma explicação clara do porquê encontramos apenas nos eutróficos o aumento de peso ou qual mudança na função fisiológica do corpo que o genótipo heterozigoto pode acarretar. Entretanto, outros estudos da literatura com genes que são coativados por *PGC1- α* , também encontraram efeitos surpreendentes do heterozigoto, atuando na hipertrofia do adipócito, na obesidade e na resistência à insulina (YAMAUCHI *et al.*, 2001a; YAMAUCHI *et al.*, 2001b; MILES *et al.*, 2000).

Anteriormente, analisamos o efeito do polimorfismo rs8192678 nos parâmetros pressóricos e bioquímicos na amostra como um todo. Os resultados indicaram uma relação do

alelo mutado (A) com o aumento da pressão arterial diastólica e com a diminuição do colesterol total e LDL colesterol. Um fato interessante é que os níveis da pressão arterial diastólica aumentaram significativamente nos homozigotos mutados (AA), quando comparado aos heterozigotos (GA) e homozigotos selvagens (GG). Para uma melhor compreensão destes resultados, avaliamos os eutróficos e obesos separadamente. Não encontramos diferenças nos níveis da pressão arterial nos eutróficos, contudo no grupo de obesos observamos que há um aumento da pressão arterial diastólica e uma tendência na pressão arterial sistólica nos homozigotos mutados (AA). Estes resultados nos permitem sugerir que a codificação apenas do aminoácido serina em indivíduos com alta adiposidade, age como fator de risco para maiores níveis pressóricos na nossa amostra.

Dentre os artigos interessantes que encontramos sobre o tema, destacamos o estudo de Vimalaswaran e colaboradores (2008). Estes pesquisadores realizaram uma meta-análise dos dados disponíveis na literatura até abril de 2007 (apenas autores que autorizaram), com intuito de aumentar o tamanho amostral e conseqüentemente o poder estatístico. Desta forma conseguiram obter informações de 13,949 indivíduos adultos, de ambos os sexos e com diferentes IMC. Suas análises mostraram que homozigotos mutados (AA) com menos de 50 anos, apresentam maiores níveis de pressão arterial sistólica e diastólica, quando comparados aos homozigotos selvagens (GG). Estes resultados foram diferentes do encontrado por Andersen e colaboradores (2005) em dinamarqueses brancos. Neste estudo demonstraram que o alelo que codifica serina, quando em homozigose se associa a redução dos níveis de pressão arterial sistólica e diastólica. Além disso, este alelo mutado (A) diminui o risco da hipertensão arterial na sua amostra. Nossos resultados não mostraram uma influência do polimorfismo rs8192678 na prevalência da hipertensão nos obesos, apenas no aumento da pressão arterial. Esta diferença pode ser explicada pela hipertensão ser uma doença multifatorial e poligênica, sugerindo que fatores ambientais e/ou outros fatores genéticos podem contribuir para o desenvolvimento desta patogênese na nossa população.

Apesar dos diferentes resultados encontrados entre os estudos, os nossos estão de acordo com os mecanismos previamente referidos do PGC1- α . Já foi descrito na literatura que o PGC1- α atua como coativador do PPAR- γ e outros receptores nucleares, incluindo os receptores de estrogênio (RE) α e β , os quais estão envolvidos no controle da pressão arterial. Atualmente se sabe que o PGC1- α é expresso nas células endoteliais e interagem com os RE- α e - β expressos no endotélio vascular e nas células da musculatura lisa (ESTERBAUER *et al.*, 1999; OBERKOFER *et al.*, 2003). Estes receptores ativados causam um relaxamento no vaso (vasodilatação) causando uma menor resistência para a passagem do sangue e

consequentemente reduzindo os valores da pressão arterial (MENDELSON, 2002). Tal fato associado à diminuição da expressão do PGC1- α nos indivíduos com o aminoácido serina (MYLES *et al.*, 2011; WENG *et al.*, 2010), nos permite sugerir que os obesos homocigotos mutados (AA) da nossa amostra tem uma quantidade menor deste coativador, ocasionando uma menor atividade transcricional do RE. Esta menor atividade poderia causar a vasoconstrição que é associada ao aumento da pressão arterial.

Na nossa amostra de obesos também avaliamos a influência deste polimorfismo na presença de DT2 e SM, mas não obtivemos resultados significativos. Na literatura há apenas um trabalho com o polimorfismo rs8192678 e a SM. Este estudo foi realizado por Ambye e colaboradores (2005) e corroboram nossos resultados, uma vez que também não encontraram associação deste polimorfismo com esta patogênese em dinamarqueses. Com relação a DT2, os resultados encontrados na literatura sobre o efeito do polimorfismo rs8192678 nesta patogênese são muito distintos entre as populações. Na Dinamarca o alelo mutado (A), codificador da serina, foi mostrado como o fator de risco para esta patogênese (EK *et al.*, 2001). Ademais, resultados semelhantes foram encontrados na Eslovênia (KUNEJ *et al.*, 2004). No entanto, Barroso e colaboradores (2003) mostraram que este mesmo alelo mutado (A) diminuía o risco da sua amostra do Reino Unido desenvolver diabetes. Além destes resultados, Muller e colaboradores (2003) não associaram este polimorfismo a diabetes em índios Pima, que residem na fronteira dos Estados Unidos com o México. Esses distintos resultados encontrados podem ser explicadas pelo tamanho amostral utilizados nos estudos e também em virtude das populações apresentarem distintos pools genéticos, sugerindo que a associação gene-doença possam variar por causa das diferenças na complexidade do background genético.

A segunda variante estudada do gene *PGC1- α* é codificada como rs3736265, e o seu alelo mutado (A) tem uma frequência de 11% na população mundial. Na nossa amostra a sua frequência foi mais rara, tendo uma prevalência de apenas 6%. Segundo o HapMap, a menor frequência deste alelo é encontrada na África e na Europa, ambos com 7%, sendo que são os ingleses os que apresentam a menor prevalência (4%). As maiores frequências são encontradas no continente asiático (19%), sendo os chineses os que obtêm a maior prevalência mundial (22%). Com relação às nossas análises, em virtude do homocigoto mutado (AA) estar ausente nos obesos e serem raros nos eutróficos, os cálculos estatísticos foram baseados no modelo dominante (GG vs GA+AA).

Até o presente momento não se sabe qual ou se há mudanças na função da proteína na troca do aminoácido metionina, ou ainda se causa uma alteração na expressão. No entanto,

por ser altamente conservados entre as espécies de mamíferos, acredita-se que possam causar uma mudança funcional ou ainda uma modificação na quantidade do PGC1- α (NITZ *et al.*, 2007). Nossos resultados para este polimorfismo mostraram que há um aumento significativo do alelo selvagem (G) nos obesos, quando comparado aos controles. O que nos permite sugerir através de cálculos estatísticos que este alelo é um fator de risco de obesidade na nossa amostra. Além disso, observamos que os carreadores do alelo mutado (A) tinham uma diminuição da circunferência abdominal, na razão cintura-quadril e no iIMC, indicando que este polimorfismo afeta a região abdominal. Posteriormente, estratificamos a amostra por IMC, separando em eutróficos e obesos, o que nos permitiu observar que a presença do alelo mutado (A) está associada à diminuição da razão cintura-quadril nos eutróficos e também foi encontrada uma tendência nos obesos. Estes resultados sugerem que o polimorfismo rs3736265 influencia na susceptibilidade da obesidade e também na distribuição da gordura corporal.

Acreditamos que a relação do polimorfismo rs3736265 com a diminuição da adiposidade corporal possa ser explicada através das vias metabólicas que o PGC1- α atua e que já foram compreendidas. Com base na literatura sugerimos que possa haver uma diminuição da atividade do PGC1- α , resultando numa menor coativação do PPAR γ . Este quadro resultaria numa menor diferenciação de pré-adipócitos (adipogênese) e no acúmulo de triglicérido nas células adiposas maduras. Apesar de ter uma possível diminuição da atividade deste coativador, inclusive nos processos de gasto calórico, atualmente se sabe que o PGC1- β compensa essa deficiência (ausência ou redução) por induzir a transcrição normal dos genes relacionados à biogênese mitocondrial e ao metabolismo oxidativo. Esta continuação da atividade de gasto energético e a diminuição da adipogênese permitem-nos sugerir que esteja correlacionado à diminuição da adiposidade corporal e também a dos níveis de triglicérido e VLDL na nossa amostra (LIN & SPLIGELMAN, 2005; LIN *et al.*, 2003; MEDINA-GOMEZ *et al.*, 2007).

Até o presente momento, não há muitos trabalhos sobre este polimorfismo, principalmente em relação ao efeito no fenótipo obesidade. Entretanto, encontramos na literatura o trabalho de Franks e colaboradores (2010), que analisaram amostras vindas de multicentros que controlam a triagem do efeito de metformina e de modificações no estilo de vida com a incidência da diabetes. Desta forma, obtiveram amostras de várias populações incluindo afro-americanos, espanhóis, americanos brancos e asiáticos, todos não diabéticos, mas com altos níveis de glicose. Neste estudo, acompanharam os indivíduos por um ano e os dividiram em três amostras, os que se trataram com metformina, os que receberam placebo e

os que apenas modificaram o estilo de vida. Após um ano, analisaram se as variabilidades das mensurações da gordura corporal e das análises bioquímicas eram influenciadas pelo polimorfismo rs3736265, mas não obtiveram resultados significativos. Outro trabalho encontrado na literatura é do tipo caso-controle na população coreana. Apesar da seleção de amostras também serem baseadas no IMC, não observaram resultados significativos da influência deste polimorfismo na obesidade (HONG *et al.*, 2008). As distinções entre os resultados podem ser explicadas pelo diferente background étnico dos participantes, tamanho amostral e o diferente tipo do estudo, no caso do trabalho longitudinal.

Ainda com relação ao polimorfismo rs3736265, encontramos uma influência na prevalência de SM nos obesos. Este resultado mostrou que indivíduos homozigotos selvagens (GG) apresentavam um risco maior de ter esta complicação metabólica. Nossos achados estão na mesma linha dos apresentados anteriormente, uma vez que os maiores níveis de triglicerídeo e da região abdominal (fatores que compõe a SM) são encontrados nos homozigotos mutados (GG). Até o momento, não há relatos na literatura sobre este polimorfismo e a SM, sendo o nosso estudo o pioneiro no assunto. Apesar de encontrarmos uma associação com esta síndrome, acreditamos que seria necessário aumentar o tamanho amostral para confirmar nossos resultados.

Na literatura encontramos poucos trabalhos sobre o polimorfismo rs3736265 e a DT2. Dentre estes podemos destacar o de Ek e colaboradores (2001), que analisaram indivíduos dinamarqueses com DT2, e encontraram que o alelo selvagem (G), codificador da treonina, é um fator de risco à diabetes. Um resultado diferente no qual foi feita uma meta-análise, realizada por Yang e colaboradores (2011), que recolherem dados de estudos publicados até abril de 2010 (apenas os de autores que concordaram em participar). Desta forma, obtiveram uma amostra de 2942 diabéticos e 1289 controles (não diabéticos), todos adultos e de ambos os sexos. Neste estudo não foi encontrada associação do polimorfismo com a DT2. Nossos resultados não mostraram associação com a DT2 em obesos, similar ao estudo da meta-análise.

As análises de haplótipos entre os rs8192678 e rs3736265 indicaram que não possuem seus alelos ligados, ou seja, não estão associados. Além disso, encontramos que o haplótipo GA é um fator de proteção, quando comparado à combinação dos haplótipos GG/AG. Refletindo sobre os resultados dos genótipos e entendendo melhor os haplótipos, podemos sugerir que basta a presença do alelo mutado (A) do polimorfismo rs3736265, independente do SNP rs8102678, para diminuir o risco de obesidade na nossa amostra.

5.4 Gene *FNDC5*

O papel do gene *FNDC5* na fisiologia endócrina foi descoberto recentemente, por Boström e colaboradores (2012). Este gene codifica uma proteína transmembranar, que é clivada no hormônio irisina durante o exercício físico. Este hormônio atua nas células do tecido adiposo branco, ativando genes relacionados à termogênese do corpo. Nós realizamos o rastreamento das regiões de junção íntron-éxon e dos éxon 3, 4 e 5 para identificar as variações encontradas na nossa amostra do Rio de Janeiro, além disso, aumentar o conhecimento da influência dos polimorfismos de base única nos fenótipos de obesidade e desenvolvimento de diabetes, síndrome metabólica e hipertensão em obesos.

Nossos resultados de sequenciamento mostraram 4 variações, sendo três na região não codificante e 1 na codificante. Estas modificações de sequência são codificadas como rs113173936 (c.185-54A>G), rs138727728 (c.241C>T), rs72882318 (c.275-63A>G) e rs1284368 (c.275-34T>C). Todas as variações identificadas são raras, como podemos observar pelas frequências da nossa população e da mundial mostradas na tabela 55. Apenas o rs113173936 e rs72882318 são considerados polimorfismos, pois tem uma frequência maior que 1% na população.

Tabela 55: Frequência das mutações encontradas do gene *FNDC5*.

Polimorfismos	Frequência	
	Mundial	Presente estudo
rs113173936	1%	1,8%
rs138727728	<0,1%	0,4%
rs72882318	1%	1,4%
rs1284368	0,8%	0,8%

Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Apesar de identificarmos 4 mutações, as análises foram realizadas apenas nos polimorfismos rs113173936 e rs72882318. Além disso, em virtude da pequena quantidade de heterozigotos (ausência dos homozigotos mutados) nos eutróficos, todos os cálculos estatísticos relacionados aos parâmetros antropométricos, pressóricos e bioquímicos foram feitos usando apenas os obesos.

Uma vez que o *FNDC5* atua no metabolismo energético, investigamos o efeito do polimorfismo rs113173936 no desenvolvimento de obesidade. Nossos resultados mostraram que houve um aumento nos heterozigotos obesos, quando comparado aos eutróficos, mas não foi significativo, ou seja, não observamos uma influência do polimorfismo na adiposidade corporal. Com relação aos parâmetros estudados nos obesos, observamos que a presença do alelo mutado (A) está associada à diminuição da PAD neste grupo. É a primeira vez que este polimorfismo está sendo estudado e ainda não há uma compreensão de como este polimorfismo pode afetar a expressão do gene *FNDC5* e a pressão arterial.

Nós também estudamos o polimorfismo rs72882318 localizado no intron 5, e até o momento não foi esclarecido se há ou não efeito deste SNP no gene *FNDC5*. Nossos resultados mostraram que houve um aumento da frequência do heterozigoto nos obesos, quando comparado aos eutróficos, mas não foi significativo. Com relação aos parâmetros, encontramos um aumento do VLDL e uma tendência de triglicerídeos nos obesos heterozigotos. Esta também é a primeira vez que este polimorfismo está sendo estudado, e como ainda não é totalmente compreendida a ação deste gene e do polimorfismo no metabolismo, é preciso maiores estudos para sugerir uma influência no corpo. Mesmo esses polimorfismos sendo raros na nossa amostra, é importante estudarmos seus efeitos nos indivíduos, uma vez que a “hipótese da variante rara” tem sido cada vez mais encontrada em trabalhos na literatura. Esta hipótese propõe que uma proporção significativa da susceptibilidade hereditária para doenças crônicas comuns em humanos podem ser devida a soma dos efeitos de uma série de variantes com baixa frequência na população de uma variedade de genes. Cada variante rara atribui de uma forma predominante e independente agindo num aumento moderado da susceptibilidade dessas doenças e são facilmente detectáveis no risco relativo. Tais variantes são majoritariamente específicas da população por causa do efeito fundador resultante da deriva genética (BODMER & BONILLA, 2008).

As análises dos haplótipos dos polimorfismos rs113173936 e rs72882318 mostraram que seus alelos não estão ligados. Além disso, não encontramos influência dos haplótipos no fenótipo obesidade.

6 Conclusões

- ✓ Neste estudo foram avaliados indivíduos eutróficos ($IMC \leq 24,9$) e obesos ($IMC \geq 30,0$), mostrando que o aumento da adiposidade corporal está associado aos maiores valores do peso, IMC, circunferência abdominal, circunferência de quadril, pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica, glicemia, VDL colesterol, triglicerídeo, proteína C reativa e hemoglobina glicada, enquanto que o HDL colesterol, que é o colesterol bom, esses indivíduos apresentam menores quantidades. Além disso, esses indivíduos acima do peso são mais susceptíveis a DT2, SM e hipertensão.
- ✓ Nosso estudo mostrou que o alelo mutado (A) do polimorfismo rs3736265 localizado no gene *PGC1A* e o haplótipo AG formado entre os polimorfismos rs17366568 e rs182052 do gene *ADIPOQ* se associaram com o fenótipo obeso, agindo como fatores de proteção. Além disso, o alelo mutado (A) do polimorfismo rs182052 do gene *ADIPOQ* estava influenciando diversos traços da obesidade, como circunferência abdominal e do quadril nos obesos mórbidos ($IMC \geq 40,0$). O polimorfismo rs17173608 do gene *RARRES2* também mostrou efeito na adiposidade corporal, uma vez que seu alelo mutado estava associado ao aumento da circunferência do quadril nos eutróficos; e diminuição da razão cintura-quadril e iIMC nos obesos. Nós também encontramos influência do polimorfismo rs8192678 do gene *PGC1A* no peso de eutróficos, tendo os heterozigotos os maiores valores.
- ✓ Com relação aos parâmetros pressóricos e bioquímicos, observamos que a presença do alelo mutado (G) do polimorfismo rs17173608 do gene *RARRES2* aumenta os níveis de glicose nos indivíduos com peso normal. Já o SNP rs8192678 do gene *PGC1A* apresentou um efeito de aumento da pressão arterial diastólica e uma tendência na pressão arterial sistólica nos obesos homozigotos mutados (AA). Entretanto no polimorfismo rs3736265 do mesmo gene, encontramos que a presença do alelo mutado diminui os níveis de VDL colesterol e triglicerídeo nos obesos. E finalizamos estas análises, encontrado uma associação do alelo mutado (G) do polimorfismo rs113173936 localizado no gene *FNDC5* com a diminuição da pressão arterial diastólica e o SNP rs72882318 também teve seu alelo mutado associado ao aumento de VDL colesterol e triglicerídeo nos obesos.

- ✓ Nossos resultados também mostraram que os obesos homocigotos selvagens (GG) do polimorfismo rs3736265 do gene *PGCIA* apresentavam um risco maior de ter síndrome metabólica. E também que os homocigotos selvagens (TT) e mutados (GG) do polimorfismo rs4721 do gene *RARRES2* são fatores de proteção dos obesos desenvolverem DT2.

7 Referências Bibliográficas

- Adamczak, M., & Wiecek, A. (2013). The adipose tissue as an endocrine organ. *Seminars in Nephrology*, 33(1), 2–13.
- Alsaleh, A., Dell, S. D. O., Frost, G. S., Griffin, B. A., Lovegrove, J. A., Jebb, S. A., & Sanders, T. A. B. (2011). Single nucleotide polymorphisms at the ADIPOQ gene locus interact with age and dietary intake of fat to determine serum adiponectin in subjects at risk of the metabolic syndrome 1 – 4. *Am J Clin Nutr*, 94, 262–269.
- Ambye, L., Rasmussen, S., Fenger, M., Jørgensen, T., Borch-Johnsen, K., Madsbad, S., & Urhammer, S. a. (2005). Studies of the Gly482Ser polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha) gene in Danish subjects with the metabolic syndrome. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 67(2), 175–9.
- Andersen, G., Wegner, L., Jensen, D. P., Glümer, C., Tarnow, L., Drivsholm, T., Pedersen, O. (2005). PGC-1alpha Gly482Ser polymorphism associates with hypertension among Danish whites. *Hypertension*, 45(4), 565–70.
- Barroso, I., Luan, J., Middelberg, R. P. S., Harding, A.-H., Franks, P. W., Jakes, R. W., Wareham, N. J. (2003). Candidate gene association study in type 2 diabetes indicates a role for genes involved in beta-cell function as well as insulin action. *PLoS Biology*, 1(1), 41-55.
- Basterra-Gortari, F. J., Beunza, J. J., Bes-Rastrollo, M., Toledo, E., García-López, M., & Martínez-González, M. a. (2011). Increasing trend in the prevalence of morbid obesity in Spain: from 1.8 to 6.1 per thousand in 14 years. *Revista Española de Cardiología*, 64(5), 424–6.
- Bastien, M., Poirier, P., Lemieux, I., & Després, J.-P. (2014). Overview of epidemiology and contribution of obesity to cardiovascular disease. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 56(4), 369–81.
- Bell, C. G., Walley, A. J., & Froguel, P. (2005). The genetics of human obesity. *Nature Reviews. Genetics*, 6(3), 221–34.
- Bodmer, W., & Bonilla, C. (2008). Common and rare variants in multifactorial susceptibility to common diseases. *Nature Genetics*, 40(6), 695–701. doi:10.1038/ng.f.136
- Böstrom, M. A., Freedman, B. I., Langefeld, C. D., Liu, L., & Hicks, P. J. (2009). Association of Adiponectin Gene Polymorphisms With Type 2 Diabetes in an African American Population Enriched for Nephropathy. *Diabetes*, 58(February), 499–504.
- Böström, P., Wu, J., Jedrychowski, M. P., Korde, A., Ye, L., Lo, J. C., Spiegelman, B. M. (2012). A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*, 481(7382), 463–8.

- Bouatia-Naji, N., Meyre, D., Lobbens, S., Séron, K., Fumeron, F., Balkau, B., Froguel, P. (2006). ACDC/adiponectin polymorphisms are associated with severe childhood and adult obesity. *Diabetes*, 55(2), 545–50.
- Bouchard, C., Tremblay, a, Després, J. P., Thériault, G., Nadeau, a, Lupien, P. J., Fournier, G. (1994). The response to exercise with constant energy intake in identical twins. *Obesity Research*, 2(5), 400–410.
- Bouchard, C., Tremblay, A., Després, J. P., Nadeau, A., & Lupien, P. J. (1990). The response to long-term overfeeding in identical twins. *The New England Journal of Medicine*, 322(21), 1477–1482.
- Bozaoglu, K., Bolton, K., McMillan, J., Zimmet, P., Jowett, J., Collier, G., Segal, D. (2007). Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome. *Endocrinology*, 148(10), 4687–4694.
- Bozaoglu, K., Curran, J. E., Stocker, C. J., Zaibi, M. S., Segal, D., Konstantopoulos, N., Jowett, J. B. M. (2010). Chemerin, a novel adipokine in the regulation of angiogenesis. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 95(5), 2476–85.
- Bozaoglu, K., Segal, D., Shields, K. a, Cummings, N., Curran, J. E., Comuzzie, A. G., Jowett, J. B. M. (2009). Chemerin is associated with metabolic syndrome phenotypes in a Mexican-American population. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 94(8), 3085–8.
- Breitfeld, J., Stumvoll, M., & Kovacs, P. (2012). Genetics of adiponectin. *Biochimie*, 94(10), 2157–63.
- Bromley, C. & Given, L., Scottish. (2011) *Health Survey 2010– Volume 1: Main Report: Scottish Centre for Social Research*.
- Bryant, N. J., Govers, R., & James, D. E. (2002). Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 3(4), 267–277.
- Chakaroun, R., Raschpichler, M., Klötting, N., Oberbach, A., Flehmig, G., Kern, M., Blüher, M. (2012). Effects of weight loss and exercise on chemerin serum concentrations and adipose tissue expression in human obesity. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 61(5), 706–14.
- Chandran, M., Phillips, S. a, Ciaraldi, T., & Henry, R. R. (2003). Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care*, 26(8), 2442–50.
- Choi, Y.-S., Hong, J.-M., Lim, S., Ko, K. S., & Pak, Y. K. (2006). Impaired coactivator activity of the Gly482 variant of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha (PGC-1alpha) on mitochondrial transcription factor A (Tfam) promoter. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 344(3), 708–12.
- Chu, S. H., Lee, M. K., Ahn, K. Y., Im, J.-A., Park, M. S., Lee, D.-C., Lee, J. W. (2012). Chemerin and adiponectin contribute reciprocally to metabolic syndrome. *PloS One*, 7(4), 1-6.

- Clément, K., & Ferré, P. (2003). Genetics and the pathophysiology of obesity. *Pediatric Research*, 53(5), 721–725.
- Clément, K., Vaisse, C., Lahlou, N., Cabrol, S., Pelloux, V., Cassuto, D., Guy-Grand, B. (1998). A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature*, 392(6674), 398–401.
- Cohen, S. S., Gammon, M. D., North, K. E., Millikan, R. C., Lange, E. M., Williams, S. M., Matthews, C. E. (2009). Polymorphisms in Relation to Serum Adiponectin Levels and BMI in Black and White Women. *Obesity*, 19(10), 2053–2062.
- Cummings, D. E., & Schwartz, M. W. (2003). Genetics and pathophysiology of human obesity. *Annual Review of Medicine*, 54(5), 453–71.
- Cusi, K. (2012). Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: pathophysiology and clinical implications. *Gastroenterology*, 142(4), 711–725.
- Das, U. N. (2010). Obesity: genes, brain, gut, and environment. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 26(5), 459–73.
- Defoort, C., Helal, O., Ferguson, J. F., Phillips, C. M., Tierney, A. C., Pe, P., Roche, H. M. (2010). Gene-nutrient interactions in the metabolic syndrome: single nucleotide polymorphisms in ADIPOQ and ADIPOR1 interact with plasma saturated fatty acids to modulate insulin resistance 1 – 3. *American Journal Clinical Nutrition*, 91, 794–801.
- Deng, Y., & Scherer, P. E. (2010). Adipokines as novel biomarkers and regulators of the metabolic syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1212, E1–E19. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05875.x
- Devarakonda, S., Gupta, K., Chalmers, M. J., Hunt, J. F., Griffin, P. R., Van Duyne, G. D., & Spiegelman, B. M. (2011). Disorder-to-order transition underlies the structural basis for the assembly of a transcriptionally active PGC-1 α /ERR γ complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(46), 18678–83.
- Doo, M & Kim Y. (2010). Association between ADIPOQ Gene Polymorphism rs182052 and Obesity in Korean Women. *Genomics Inform*, 8(3), 116-121.
- Du, X., & Leung, L. L. K. (2009). Proteolytic regulatory mechanism of chemerin bioactivity Structure of Chemerin. *Acta Biochim Biophys Sin*, 41(12), 973–979.
- Eckel, R. H., Alberti, K. G. M. M., Grundy, S. M., & Zimmet, P. Z. (2010). The metabolic syndrome. *Lancet*, 375(9710), 181–3.
- Ek, J., Andersen, G., Urhammer, S. a, Gaede, P. H., Drivsholm, T., Borch-Johnsen, K., Pedersen, O. (2001). Mutation analysis of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 (PGC-1) and relationships of identified amino acid polymorphisms to Type II diabetes mellitus. *Diabetologia*, 44(12), 2220–6.

- Ernst, M. C., & Sinal, C. J. (2010). Chemerin: At the crossroads of inflammation and obesity. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 21(11), 660–667.
- Esterbauer, H., Oberkofler, H., Krempler, F., & Patsch, W. (1999). Human peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 (PPARGC1) gene: cDNA sequence, genomic organization, chromosomal localization, and tissue expression. *Genomics*, 62(1), 98–102.
- Esterbauer, H., Oberkofler, H., Linnemayr, V., Iglseider, B., Hedegger, M., Wolfsgruber, P., Patsch, W. (2002). Peroxisome Proliferator-Activated receptor-gama coativator-1 gene locus: Associations with obesity indices in middle-aged women. *Diabetes*, 51, 1281–1286.
- Farooqi, I. S., Yeo, G. S., Keogh, J. M., Aminian, S., Jebb, S. a, Butler, G., O’Rahilly, S. (2000). Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with melanocortin 4 receptor deficiency. *The Journal of Clinical Investigation*, 106(2), 271–279.
- Finkelstein, E. a, Khavjou, O. a, Thompson, H., Trogon, J. G., Pan, L., Sherry, B., & Dietz, W. (2012). Obesity and severe obesity forecasts through 2030. *American Journal of Preventive Medicine*, 42(6), 563–70.
- Franks, P. W., Jablonski, K. a, McAteer, J. B., de Bakker, P. I. W., Pollin, T. I., Hanson, R. L., Florez, J. C. (2010). Common variants in 40 genes assessed for diabetes incidence and response to metformin and lifestyle intervention in the diabetes prevention program. *Diabetes*, 59(10), 2672–81.
- Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) /UNICEF. Perfil Estatístico de crianças e mães no Brasil: aspectos nutricionais, 1989. Rio de Janeiro, Brazil: IBGE; 1992.
- Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) /Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão, Ministério da Saúde. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2002–2003. Análise da disponibilidade domiciliar de alimentos e do estado nutricional no Brasil. Rio de Janeiro, Brazil: IBGE; 2004.
- Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)/UNICEF. Perfil estatístico de crianças e mães no Brasil: aspectos nutricionais, 1974–75. Rio de Janeiro, Brazil: IBGE; 1982.
- Gesta, S., Tseng, Y. H., & Kahn, C. R. (2007). Developmental Origin of Fat: Tracking Obesity to Its Source. *Cell*, 131(2), 242–256.
- Goralski, K. B., McCarthy, T. C., Hanniman, E. a, Zabel, B. a, Butcher, E. C., Parlee, S. D., Sinal, C. J. (2007). Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(38), 28175–88.
- Gottlieb, V., Gabriela, M., Beatrice, I., Da, M., & Bodanese, L. C. (2008). Origem da síndrome metabólica: aspectos genético-evolutivos e nutricionais. *Scientia Medica*, 18(1), 31–38.

- Grundy, S. M. (2000). Metabolic complications of obesity. *Endocrine*, *13*(2), 155–65.
- Grundy, S. M., Brewer, H. B., Cleeman, J. I., Smith, S. C., & Lenfant, C. (2004). Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation*, *109*(3), 433–8.
- Gu, H. F. (2009). Biomarker Insights Biomarkers of Adiponectin : Plasma Protein Variation and Genomic DNA Polymorphisms. *Biomarker Insights*, *4*, 123–133.
- Guillet, C., Masgrau, a, Walrand, S., & Boirie, Y. (2012). Impaired protein metabolism: interlinks between obesity, insulin resistance and inflammation. *Obesity Reviews : An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity*, *13*, 51–7.
- Hashemi, M., Rezaei, H., Eskandari-Nasab, E., Kaykhaei, M. A., Zakeri, Z., & Taheri, M. (2012). Association between chemerin rs17173608 and vaspin rs2236242 gene polymorphisms and the metabolic syndrome, a preliminary report. *Gene*, *510*(2), 113–7.
- Hassan, M., Latif, N., & Yacoub, M. (2012). Adipose tissue: friend or foe? *Nature Reviews. Cardiology*, *9*(12), 689–702.
- Hegener, H. H., Lee, I.M., Cook, N. R., Ridker, P. M., & Zee, R. Y. L. (2006). Association of adiponectin gene variations with risk of incident myocardial infarction and ischemic stroke: a nested case-control study. *Clinical Chemistry*, *52*(11), 2021–7.
- Heid, I. M., Henneman, P., Hicks, A., Coassin, S., Winkler, T., Aulchenko, Y. S., Evans, D. M. (2011). Clear detection of ADIPOQ locus as the major gene for plasma adiponectin: results of genome-wide association analyses including 4659 European individuals. *Atherosclerosis*, *208*(2), 412–420.
- Henneman, P., Aulchenko, Y., & Frants, R. (2010). Genetic Architecture of Plasma Adiponectin Overlaps With the Genetics of Metabolic Syndrome – Related Traits. *Diabetes Care*, *33*(4), 908–913.
- Hivert, M., Manning, A. K., Mcateer, J. B., & Florez, J. C. (2008). Common variants in the Adiponectin gene (ADIPOQ) associated with plasma adiponectin levels, type 2 diabetes, and diabetes-related quantitative traits. *Diabetes*, *57*(December), 3353–3359.
- Hong, M. S., Kim, H. K., Shin, D. H., Song, D. K., Ban, J. Y., Kim, B. S., & Chung, J. (2008). Integrative Study on PPARGC1A : Hypothalamic Expression of Ppargc1a in ob / ob Mice and Association between PPARGC1A and Obesity in Korean Population. *Mol. Cell. Toxicol.*, *4*(4), 318–322.
- Huh, J. Y., Panagiotou, G., Mougios, V., Brinkoetter, M., Vamvini, M. T., Schneider, B., & Mantzoros, C. S. (2013). FNDC5 and irisin in humans: I. Predictors of circulating concentrations in serum and plasma and II. mRNA expression and circulating concentrations in response to weight loss and exercises. *Metabolism*, *61*(12), 1725–1738.

- Hung, J., McQuillan, B. M., Thompson, P. L., & Beilby, J. P. (2008). Circulating adiponectin levels associate with inflammatory markers, insulin resistance and metabolic syndrome independent of obesity. *International Journal of Obesity*, 32(5), 772–9.
- Kadowaki, T., Yamauchi, T., Kubota, N., Hara, K., Ueki, K., & Tobe, K. (2006). Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *Endocrine Reviews*, 116(7), 439–450.
- Kahn, B. B., & Flier, J. S. (2000). Obesity and insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 106(4), 473–81.
- Kelly, D. P. (2012). Medicine. Irisin, light my fire. *Science (New York, N.Y.)*, 336(6077), 42–3.
- Kern, P. A., Gregorio, G. B. Di, Lu, T., Rassouli, N., & Ranganathan, G. (2003). Adiponectin Expression From Human Adipose Tissue. *Diabetes*, 52(17), 1779–1785.
- Kershaw, E. E., & Flier, J. S. (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(6), 2548–56.
- Khandekar, M. J., Cohen, P., & Spiegelman, B. M. (2011). Molecular mechanisms of cancer development in obesity. *Nature Reviews. Cancer*, 11(12), 886–95.
- Kim, J. H., Shin, H. D., Park, B. L., Cho, Y. M., Kim, S. Y., Lee, H. K., & Park, K. S. (2005). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha promoter polymorphisms are associated with early-onset type 2 diabetes mellitus in the Korean population. *Diabetologia*, 48(7), 1323–30.
- Knutti, D., & Kralli, A. (2001). PGC-1, a versatile coactivator. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 12(8), 360–5.
- Kondo, H., Shimomura, I., Matsukawa, Y., Kumada, M., Takahashi, M., Matsuda, M., Matsuzawa, Y. (2002). Association of Adiponectin Mutation With Type 2 Diabetes. *Diabetes*, 51, 2325–2328.
- Kong, K. A., Suh, Y. J., Cho, S. J., Park, E. A., Park, M. H., & Kim, Y. J. (2013). Association of adiponectin gene polymorphism with birth weight in Korean neonates. *Twin Research and Human Genetics : The Official Journal of the International Society for Twin Studies*, 16(3), 732–8.
- Kopelman, P. G. (2000). Obesity as a medical problem. *Nature*, 404(6778), 635–643.
- Kubota, N., Terauchi, Y., Yamauchi, T., Kubota, T., Moroi, M., Matsui, J., Noda, T. (2002). Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(29), 25863–6.
- Kubota, N., Yano, W., Kubota, T., Yamauchi, T., Itoh, S., Kumagai, H., Kadowaki, T. (2007). Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake. *Cell Metabolism*, 6(1), 55–68.

- Kukla, M., Mazur, W., Bułdak, R. J., & Zwirska-Korczała, K. (2011). Potential role of leptin, adiponectin and three novel adipokines--visfatin, chemerin and vaspin--in chronic hepatitis. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, 17(11-12), 1397–410.
- Kunej, T., Globocnik Petrovic, M., Dovc, P., Peterlin, B., & Petrovic, D. (2004). A Gly482Ser polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 (PGC-1) gene is associated with type 2 diabetes in Caucasians. *Folia Biologica*, 50(5), 157–8.
- Kyriakou, T., Collins, L. J., Spencer-jones, N. J., Malcolm, C., Wang, X., Snieder, H., Dell, S. D. O. (2008). Adiponectin gene ADIPOQ SNP associations with serum adiponectin in two female populations and effects of SNPs on promoter activity. *Journal Human Genetics*, 53(8), 718–727.
- Lee, E. J., Kang, Y. C., Park, W.-H., Jeong, J. H., & Pak, Y. K. (2014). Negative transcriptional regulation of mitochondrial transcription factor A (TFAM) by nuclear TFAM. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1–6.
- Leite, D., Revis, A. D. E., & Rocha, D. D. M. (2009). Obesidade : uma doença inflamatória Obesity : an inflammatory disease. *Ciência & Saúde*, 2(2), 85–95.
- Leu, H.-B., Chung, C.-M., Lin, S.-J., Jong, Y.-S., Pan, W.-H., & Chen, J.-W. (2011). Adiponectin gene polymorphism is selectively associated with the concomitant presence of metabolic syndrome and essential hypertension. *PloS One*, 6(5), 1-8.
- Lidell, M. E., Betz, M. J., Leinhard, O. D., Heglind, M., Elander, L., Slawik, M., Enerbäck, S. (2013). Evidence for two types of brown adipose tissue in humans Evidence for Two Types of Brown Adipose Tissue in Humans. *Nature*, 19(19), 631–634.
- Lin, J., Handschin, C., & Spiegelman, B. M. (2005). Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metabolism*, 1(6), 361–70.
- Lin, J., Tarr, P. T., Yang, R., Rhee, J., Puigserver, P., Newgard, C. B., & Spiegelman, B. M. (2003). PGC-1beta in the regulation of hepatic glucose and energy metabolism. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(33), 30843–8.
- Loos, R. J. F. (2009). Recent progress in the genetics of common obesity. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 68(6), 811–29.
- Loos, R. J. F., & Bouchard, C. (2003). Obesity - Is it a genetic disorder? *Journal of Internal Medicine*, 254(5), 401–425.
- Malik, V. S., Willett, W. C., & Hu, F. B. (2013). Global obesity: trends, risk factors and policy implications. *Nature Reviews. Endocrinology*, 9(1), 13–27.
- Mancia, G., Fagard, R., Narkiewicz, K., Redon, J., Zanchetti, A., Böhm, M., Wood, D. a. (2013). 2013 ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal*, 34(28), 2159–219.

- Marra, F., & Bertolani, C. (2009). Adipokines in liver diseases. *Hepatology*, 50(3), 957–969.
- Medina-Gomez, G., Gray, S., & Vidal-Puig, A. (2007). Adipogenesis and lipotoxicity: role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and PPARgammacoactivator-1 (PGC1). *Public Health Nutrition*, 10(10A), 1132–7.
- Mendelsohn, M. E. (2002). Protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *The American Journal of Cardiology*, 89(12A), 12E–17E;
- Miles, P. D., Barak, Y., He, W., Evans, R. M., & Olefsky, J. M. (2000). Improved insulin-sensitivity in mice heterozygous for PPAR-gamma deficiency. *The Journal of Clinical Investigation*, 105(3), 287–92.
- Min, J. L., Nicholson, G., Halgrimsdottir, I., Almstrup, K., Petri, A., Barrett, A., Zondervan, K. T. (2012). Coexpression network analysis in abdominal and gluteal adipose tissue reveals regulatory genetic loci for metabolic syndrome and related phenotypes. *PLoS Genetics*, 8(2), 1-18.
- Ministério da Saúde. (2006). Diabetes mellitus. *Cadernos de Atenção Básica*, 1(16), 1–56.
- Ministério da Saúde. VIGITEL Brasil. Short term trends of obesity using data of the telephone based surveillanc system of risk and protective factors for chronic disease (VIGITEL), Brazil, 2006 to 2009. *J Epidemiol Community Health*, Vol 65 (2011).
- Ministry of Health. VIGITEL Brasil; vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília, Brazil 2007.
- Montague, C. T., Farooqi, I. S., Wareham, N. J., Sewter, C. P., Cheetham, C. H., Earley, A. R., Rahilly, S. O. (1997). Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature*, 387(June), 903–908.
- Muller, Y. L., Bogardus, C., Pedersen, O., & Baier, L. (2003). A Gly482Ser missense mutation in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 is associated with altered lipid oxidation and early insulin secretion in Pima Indians. *Diabetes*, 52(3), 895–8.
- Müssig, K., Staiger, H., Machicao, F., Thamer, C., Machann, J., Schick, F., ... Häring, H.-U. (2009). RARRES2, encoding the novel adipokine chemerin, is a genetic determinant of disproportionate regional body fat distribution: a comparative magnetic resonance imaging study. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 58(4), 519–24.
- Myles, S., Lea, R. A., Ohashi, J., Chambers, G. K., Weiss, J. G., Hardouin, E., Stoneking, M. (2011). Testing the thrifty gene hypothesis: the Gly482Ser variant in PPARGC1A is associated with BMI in Tongans. *BMC Medical Genetics*, 12(1), 10.
- Naves, A. (2007). Regulação funcional da obesidade. *ConScientiae Saúde*, 6(1), 189–199.
- Nguyen, Dang M. MD and Hashem B. El-Serag, MD, M. (2010). The Epidemiology of Obesity. *Gastroenterol Clin North Am*, 39(1), 1–7.

- Nitz, I., Ewert, A., Klapper, M., & Döring, F. (2007). Analysis of PGC-1alpha variants Gly482Ser and Thr612Met concerning their PPARgamma2-coactivation function. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 353(2), 481–6.
- Novelle, M. G., Contreras, C., Romero-Picó, A., López, M., & Diéguez, C. (2013). Irisin, two years later. *International Journal of Endocrinology*, 2013, 1-8.
- O’Rahilly, S. (2009). Human genetics illuminates the paths to metabolic disease. *Nature*, 462(7271), 307–14.
- Oberkofler, H., Holzl, B., Esterbauer, H., Xie, M., Iglseider, B., Krempler, F., Patsch, W. (2003). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- Coactivator-1 Gene Locus: Associations with Hypertension in Middle-Aged Men. *Hypertension*, 41(2), 368–372.
- Ong, K. L., Li, M., Tso, A. W. K., Xu, A., Cherny, S. S., Sham, P. C., Lam, K. S. L. (2010). Association of genetic variants in the adiponectin gene with adiponectin level and hypertension in Hong Kong Chinese. *European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, 163(2), 251–257.
- Pasco, J. a, Brennan, S. L., & Kotowicz, M. a. (2013). Morbid obesity in women on the rise: an observational, population-based study. *BMC Public Health*, 13(1), 290.
- Poirier P, Alpert MA, Fleisher LA, (2009) Cardiovascular evaluation and management of severely obese patients undergoing surgery: a science advisory from the American Heart Association. *Circulation*, 120(1), 86-95.
- Poirier P, Cornier MA, Mazzone T. (2011) Bariatric surgery and cardiovascular risk factors: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*,123(15), 1683-1701.
- Puigserver, P., & Spiegelman, B. M. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocrine Reviews*, 24(1), 78–90.
- Qi, Y., Takahashi, N., Hileman, S. M., Patel, H. R., Berg, A. H., Pajvani, U. B., Ahima, R. S. (2004). Adiponectin acts in the brain to decrease body weight. *Nature Medicine*, 10(5), 524–9.
- Qiao, L., Maclean, P. S., Schaack, J., Orlicky, D. J., Darimont, C., Pagliassotti, M., Shao, J. (2005). C/EBPalpha regulates human adiponectin gene transcription through an intronic enhancer. *Diabetes*, 54, 1744–1754.
- Queiroz, J. C. ., Alonso-Vale, M. I. ., Curi, R., & Lima, F. B. (2009). Controle da adipogênese por ácidos graxos. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 53(5), 582–594.
- Rabe, K., Lehrke, M., Parhofer, K. G., & Broedl, U. C. (2008). Adipokines and insulin resistance. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, 14(11-12), 741–51.

- Ràfols, M. E. (2014). Adipose tissue: cell heterogeneity and functional diversity. *Endocrinología Y Nutrición : Órgano de La Sociedad Española de Endocrinología Y Nutrición*, 61(2), 100–12.
- Ramachandrappa, S., & Farooqi, I. S. (2011). Genetic approaches to understanding human obesity. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(6).
- Rasouli, N., & Kern, P. a. (2008). Adipocytokines and the metabolic complications of obesity. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93(11), S64–S73.
- Raucci, R., Rusolo, F., Sharma, a, Colonna, G., Castello, G., & Costantini, S. (2013). Functional and structural features of adipokine family. *Cytokine*, 61(1), 1–14.
- Reitman, M. L., Arioglu, E., Gavrilova, O., & Taylor, S. I. (2000). Lipoatrophy revisited. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 11(10), 410–416.
- Roman, A. a, Parlee, S. D., & Sinal, C. J. (2012). Chemerin: a potential endocrine link between obesity and type 2 diabetes. *Endocrine*, 42(2), 243–51.
- Roux, J. a. F., Benaiges Boix, D., & Botet Montoya, J. P. (2011). Quemerina: una nueva adipocina. *Clínica E Investigación En Arteriosclerosis*, 23(4), 175–182.
- Sánchez, J. C., López, D. ., Pinzón, O. ., & Sepúlveda, J. . (2010). Adipocinas y síndrome metabólico: múltiples facetas de un proceso fisiopatológico complejo Adipokines and metabolic syndrome : multiple aspects of a complex pathophysiological process. *Revista Colombiana de Cardiología*, 17(4), 167–176.
- Santos, L. M. P., de Oliveira, I. V., Peters, L. R., & Conde, W. L. (2010). Trends in morbid obesity and in bariatric surgeries covered by the Brazilian public health system. *Obesity Surgery*, 20(7), 943–8.
- Schaffer, J. E. (2003). Lipotoxicity: when tissues overeat. *Current Opinion in Lipidology*, 14(3), 281–287.
- Schwarz, P. E. H., Towers, G. W., Fischer, S., Govindarajalu, S., Schulze, J., Bornstein, S. R., Vasseur, F. (2006). Hypoadiponectinemia is associated with progression toward type 2 diabetes and genetic variation in the ADIPOQ gene promoter. *Diabetes Care*, 29(7), 1645–1650.
- Sell, H., Laurencikiene, J., Taube, A., Eckardt, K., Cramer, A., Horrigs, A., & Arner, P. (2009). Chemerin Is a Novel Adipocyte-Derived Factor Inducing Insulin Resistance in Primary Human Skeletal Muscle. *Diabetes*, 58(December), 2731–2740.
- Sheng, T., & Yang, K. (2008). Adiponectin and its association with insulin resistance and type 2 diabetes. *Journal of Genetics and Genomics*, 35(6), 321–6.
- Siitonen, N., Pulkkinen, L., Lindström, J., Kolehmainen, M., Eriksson, J. G., Venojärvi, M., Uusitupa, M. (2011). Association of ADIPOQ gene variants with body weight, type 2 diabetes and serum adiponectin concentrations: the Finnish Diabetes Prevention Study. *BMC Medical Genetics*, 12(1), 5.

- Silveira, L. R., Hermano, C., Zoppi, C. C., Hirabara, S. M., Vitzel, K. F., Bassit, R. A., Melo, I. H. P. (2011). Regulação do metabolismo de glicose e ácido graxo no músculo esquelético durante exercício físico. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 55(5), 303–313.
- Singh, B., Arora, S., Goswami, B., & Mallika, V. (2009). Metabolic syndrome: A review of emerging markers and management. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 3(4), 240–254.
- Sørensen, T. I., Holst, C., & Stunkard, a J. (1998). Adoption study of environmental modifications of the genetic influences on obesity. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders : Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 22(1), 73–81.
- Spiegelman, B. M. (2013). Banting Lecture 2012: Regulation of adipogenesis: toward new therapeutics for metabolic disease. *Diabetes*, 62(6), 1774–82.
- Staiger, H., Böhm, A., Scheler, M., Berti, L., Machann, J., Schick, F., de Angelis, M. H. (2013). Common genetic variation in the human FNDC5 locus, encoding the novel muscle-derived “browning” factor irisin, determines insulin sensitivity. *PLoS One*, 8(4), e61903.
- Stejskal, D., Karpisek, M., Hanulova, Z., & Svestak, M. (2008). Chemerin is an independent marker of the metabolic syndrome in a Caucasian population--a pilot study. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia*, 152(2), 217–21.
- Stunkard, a J., Sorensen, T. I. ., Hanis, C., & Teasdale, T. . (1986). An adoption study of human obesity. *The New England Journal of Medicine*, 314(4), 193–198.
- Sturm, R. & Hattor, A. (2013) Morbid obesity rates continue to rise rapidly in the United States. *International Journal of Obesity*, 37, 889-891
- Sutton, B. S., Weinert, S., Langefeld, C. D., Williams, A. H., Campbell, J. K., Saad, M. F., Bowden, D. W. (2005). Genetic analysis of adiponectin and obesity in Hispanic families: the IRAS Family Study. *Human Genetics*, 117(2-3), 107–18.
- Swinburn, B. A, Sacks, G., Hall, K. D., McPherson, K., Finegood, D. T., Moodie, M. L., & Gortmaker, S. L. (2011). The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. *Lancet*, 378(9793), 804–14.
- Tanisawa, K., Taniguchi, H., Sun, X., Ito, T., Cao, Z.-B., Sakamoto, S., & Higuchi, M. (2014). Common single nucleotide polymorphisms in the FNDC5 gene are associated with glucose metabolism but do not affect serum irisin levels in Japanese men with low fitness levels. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 63(4), 574–83.
- Trayhurn, P., & Wood, I. S. (2007). Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *British Journal of Nutrition*, 92(03), 347.
- Unger, R. H. (2003). Minireview: weapons of lean body mass destruction: the role of ectopic lipids in the metabolic syndrome. *Endocrinology*, 144(12), 5159–65.

- Vázquez-Vela, M. E. F., Torres, N., & Tovar, A. R. (2008). White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Archives of Medical Research*, 39(8), 715–28.
- Vendramini, M. F., Pereira, A. C., Ferreira, S. R., Kasamatsu, T. S., & Moisés, R. S. (2010). Association of genetic variants in the adiponectin encoding gene (ADIPOQ) with type 2 diabetes in Japanese Brazilians. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 24(2), 115–120.
- Vimaleswaran, K. S., Luan, J., Andersen, G., Muller, Y. L., Wheeler, E., Brito, E. C., Franks, P. W. (2008). The Gly482Ser genotype at the PPARGC1A gene and elevated blood pressure: a meta-analysis involving 13,949 individuals. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 105(4), 1352–8.
- Virtue, S., & Vidal-Puig, A. (2010). Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome - An allostatic perspective. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1801(3), 338–349.
- Walley, A. J., Asher, J. E., & Froguel, P. (2009). The genetic contribution to non-syndromic human obesity. *Nature Reviews. Genetics*, 10(7), 431–442.
- Wassel, C. L., Pankow, J. S., Jacobs, D. R., Steffes, M. W., Li, N., & Schreiner, P. J. (2010). Variants in the adiponectin gene and serum adiponectin: the Coronary Artery Development in Young Adults (CARDIA) Study. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 18(12), 2333–2338.
- Weng, S.-W., Lin, T.-K., Wang, P.-W., Chen, I.-Y., Lee, H.-C., Chen, S.-D., ... Liou, C.-W. (2010). Gly482Ser polymorphism in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha gene is associated with oxidative stress and abdominal obesity. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 59(4), 581–6.
- World Health Organization - International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension. (2003). *Journal of Hypertension*, 21(11), 1983 – 1992.
- World Health Organization (WHO). (2008). Waist Circumference and Waist-Hip Ratio Report of a WHO Expert Consultation. *World Health*, (December), 8–11.
- World Health Organization (WHO). (2013). Obesity and overweight. What are overweight and obesity? Acessado em 04/07/2014. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/print.html>
- Wu, J., Boström, P., Sparks, L. M., Ye, L., Choi, J. H., Giang, A. H., Spiegelman, B. M. (2012). Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*, 150(2), 366–376. doi:10.1016/j.cell.2012.05.016
- Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., Spiegelman, B. M. (1999). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*, 98(1), 115–24.
- Xia, Q., & Grant, S. F. (2013). The genetics of human obesity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1281, 178–90.

- Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Murakami, K., Motojima, K., Komeda, K., Kadowaki, T. (2001). The mechanisms by which both heterozygous peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) deficiency and PPARgamma agonist improve insulin resistance. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(44), 41245–54.
- Yamauchi, T., Waki, H., Kamon, J., Murakami, K., Motojima, K., Komeda, K., Kagechika, H. (2001). Inhibition of RXR and PPAR γ ameliorates diet-induced obesity and type 2 diabetes. *The Journal of Clinical Investigation*, 108(7), 1001–1013.
- Yang, W.S & Chuang, L.M. (2006). Human genetics of adiponectin in the metabolic syndrome. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 84(2), 112–21.
- Yang, Y., Chen, S., & Lu, X. (2011). Association of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha (PPARGC1A) gene polymorphisms and type 2 diabetes mellitus : a meta-analysis. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 27, 177–184.
- Zabel, B. a, Zuniga, L., Ohyama, T., Allen, S. J., Cichy, J., Handel, T. M., & Butcher, E. C. (2006). Chemoattractants, extracellular proteases, and the integrated host defense response. *Experimental Hematology*, 34(8), 1021–32.
- Zecchin, H., Carvalheira, J. B., & Saad, M. J. (2004). Mecanismos Moleculares de resistência à insulina na Síndrome Metabólica. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo*, 14(4), 574–589.

8 Apêndice – 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 predis põem 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 sadios, 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.

Termo de Consentimento Livre Esclarecido

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