Ariana Ester Fernandes

Efeito das variações alélicas no gene do receptor tipo 4 de
melanocortina sobre o comportamento alimentar em crianças e
adolescentes obesos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientador: Dr. Marcio Corrêa Mancini

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Fernandes, Ariana Ester

Efeito das variações alélicas no gene do receptor tipo 4 de melanocortina sobre o comportamento alimentar em crianças e adolescentes obesos / Ariana Ester Fernandes. -- São Paulo, 2014.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Endocrinologia.

Orientador: Marcio Corrêa Mancini.

Descritores: 1.Obesidade pediátrica/genética 2.Receptor tipo 4 de melanocortina/genética 3.Poliformismo de nucleotídeo único/genética 4.Obesidade/metabolismo 5.Criança 6.Adolescente

USP/FM/DBD-260/14

Este trabalho foi desenvolvido com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos nº 2011/05320-8 e 2011/23340-6.

DEDICATÓRIA

*Dedico esse trabalho a duas grandes
mulheres, Mary e Edna.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Marcio Mancini, pela confiança, apoio, respeito, além de toda a oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

À Edna, obrigada pela paciência, incentivo, amizade, força e principalmente pelo carinho. Essa conquista também é sua!

Às queridas amigas e companheiras dessa jornada, Clarissa, Mara, Nídia e Marina, por todo incentivo, compartilhamento, almoços, cafés e todo apoio e carinho.

Ao Prof. Sergio Mاتيolli, sempre atencioso e receptivo, pelo inestimável auxílio na análise dos haplótipos.

À Eliana e Roseli, pessoas fundamentais na organização dos atendimentos na Liga de Obesidade Infantil.

À Aritânia, pelo auxílio nas etapas de genotipagem e sequenciamento.

Às estagiárias Fernanda, Denise, Caroline e Mariana, que passaram pela Triagem da Liga de Obesidade Infantil e ajudaram muito na coleta de dados.

Às queridas amigas Dione, Priscila e Renata, que me acompanharam em toda a trajetória da faculdade e certamente continuarão sempre presentes em meu caminho.

Ao querido amigo Elber, que me proporcionou momentos de paz nos dias tensos.

À Rita, minha irmã, e Camila, irmã de coração, que me ajudaram muito nessa fase, dos mais diversos modos, e com quem sempre posso contar.

Ao meu irmão Marcelo, pela ajuda na ilustração dessa dissertação e pela ótima companhia de sempre!

À minha florzinha Marissol, que com sua pureza de criança e seu bom humor me traz alegrias todos os dias desde que entrou em minha vida!

À Mary, minha mãe, um exemplo de perseverança e superação! Uma grande mulher que, de forma especial e carinhosa, sempre me deu força e coragem, me apoiando nos momentos de dificuldades. Com você ao meu lado valeu a pena toda distância, todo sofrimento, todas as renúncias... Hoje estamos colhendo, juntas, os frutos do nosso empenho! Amo você!

À minha família: meus irmãos, pais, avó, com quem as convivências saudáveis na infância, desde as brincadeiras mais criativas, até as broncas e os bolinhos de chuva, foram responsáveis por grande parte da pessoa que sou hoje e por quem guardo muito amor e respeito.

Ao meu amor Tiago, pelo companheirismo e apoio, também pelos jantares e vinhos.

EPÍGRAFE

Do atrito de duas pedras chispam faíscas; das faíscas
vem o fogo; do fogo brota a luz.

Victor Hugo

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)*.

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTAS DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1	INTRODUÇÃO.....	2
1.1	OBESIDADE	2
1.2	TRANSTORNO DA COMPULSÃO ALIMENTAR PERIÓDICA.....	4
1.3	PREFERÊNCIA E CONSUMO ALIMENTAR.....	6
1.4	BALANÇO ENERGÉTICO	7
1.4.1	Regulação homeostática e vias de sinalização	7
1.5	GENE <i>MC4R</i> E OBESIDADE.....	10
1.6	JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	13
2	OBJETIVO.....	16
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3	SUJEITOS E MÉTODOS	18
3.1	CASUÍSTICA	18
3.1.1	Grupo de obesos.....	18
3.1.2	Grupo controle	19
3.1.3	Composição dos grupos.....	19
3.2	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	20
3.3	AVALIAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL	21
3.3.1	Variáveis antropométricas e clínicas	21
3.3.2	Variáveis laboratoriais e metabólicas	23
3.4	AVALIAÇÃO DA COMPULSÃO ALIMENTAR PERIÓDICA.....	25
3.5	AVALIAÇÃO DO CONSUMO ALIMENTAR.....	26
3.5.1	Análise do consumo alimentar.....	27
3.5.2	Padronização de medidas caseiras.....	28
3.6	ESTUDO MOLECULAR	29
3.6.1	Extração do DNA genômico	29
3.7	GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS.....	30
3.8	SEQUENCIAMENTO DO GENE <i>MC4R</i>	31
3.8.1	Reação em cadeia da polimerase	31

3.8.2	Purificação enzimática e sequenciamento automático	33
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
4	RESULTADOS	37
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO	37
4.1.1	Características antropométricas, clínicas e metabólicas.....	37
4.1.2	Avaliação do consumo e compulsão alimentar	39
4.2	ESTUDO DOS SNPS rs17782313 E rs12970134	44
4.2.1	Avaliação das variantes quanto à obesidade.....	46
4.2.2	Avaliação do SNP rs17782313 quanto às características antropométricas, clínicas e metabólicas no grupo de obesos.....	46
4.2.3	Avaliação do SNP rs17782313 quanto ao consumo alimentar no grupo de obesos.....	48
4.2.4	Avaliação do SNP rs12970134 quanto às características antropométricas, clínicas e metabólicas no grupo de obesos.....	49
4.2.5	Avaliação do SNP rs12970134 quanto ao consumo alimentar no grupo de obesos	51
4.3	ANÁLISE DO DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO	52
4.3.1	Frequência estimada dos diplótipos	53
4.3.1	Avaliação dos diplótipos quanto às características antropométricas, clínicas, metabólicas e dados de consumo alimentar no grupo obeso	54
4.4	GENE <i>MC4R</i>	55
5	DISCUSSÃO.....	61
5.1	rs17782313.....	65
5.2	rs12970134.....	67
5.3	GENE <i>MC4R</i>	68
6	CONCLUSÃO.....	73
	ANEXOS	75
	ANEXO A. Escala de Compulsão Alimentar Periódica.....	75
	ANEXO B. Protocolo para coleta de amostra de saliva Oragene DNA G-500®	79
	ANEXO C, Tabela 21.....	80
	ANEXO D, Tabela 22.....	81
	ANEXO E, Tabela 23.....	82
	ANEXO F, Tabela 24.....	83
	REFERÊNCIAS	87

LISTAS DE FIGURAS

FIGURA 1 – Via leptina-melanocortina	9
FIGURA 2 – Organograma representativo da amostra final de crianças e adolescentes no grupo de obesos e no grupo controle (eutrófico)	20
FIGURA 3 – Frequência de omissão das principais refeições nos grupos obeso e controle	41
FIGURA 4 – Frequência do consumo inadequado de frações lipídicas e colesterol nos grupos obeso e controle.....	41
FIGURA 5 – Frequência do consumo de fibras nos grupos obesos e controle	41
FIGURA 6 – Frequência do consumo percentual de macronutrientes nos grupos obeso e controle	42
FIGURA 7 – Posição das mutações missenses identificadas nesse estudo	55
FIGURA 8 – Eletroferograma de regiões do gene <i>MC4R</i> com e sem as variantes identificadas	58

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Valores críticos de diagnóstico nutricional para crianças de 5 a 19 anos	3
TABELA 2 - Características dos SNPs rs17782313 e rs12970134	12
TABELA 3 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para o sequenciamento do gene <i>MC4R</i>	32
TABELA 4 - Características antropométricas, clínicas e metabólicas do grupo obeso e antropométricas do grupo controle	38
TABELA 5 - Comparação do valor energético total , valor energético percentual por refeição e características do consumo percentual de macronutrientes, colesterol, frações lipídicas e fibras entre grupo obeso e controle	40
TABELA 6 - Comparação entre a frequência de consumo de alimentos ou grupo alimentares nos grupos obeso e controle	43
TABELA 7 - Comparação do consumo de alimentos e grupos alimentares entre os grupos obeso e controle	44
TABELA 8 - Frequências alélicas e genótípicas dos SNPs rs17782313 e rs12970134 no grupo obeso	45
TABELA 9 - Frequências alélicas e genótípicas dos SNPs rs17782313 e rs12970134 no grupo controle	45
TABELA 10 – Comparação da frequência genotípica dos SNPs rs17782313 e rs12970134 entre os grupos obeso e controle.....	46
TABELA 11 – Comparação entre os dados clínicos e metabólicos segundo a presença ou não do alelo polimórfico do rs17782313 no grupo obeso .	47
TABELA 12 – Frequência dos fatores de risco cardiometabólicos e CAP segundo a presença ou não do alelo polimórfico do rs17782313 nos obesos.....	48
TABELA 13 – Comparação entre os dados de consumo alimentar segundo a presença ou não do alelo polimórfico do rs17782313 no grupo obeso .	49
TABELA 14 – Comparação entre os dados clínicos e metabólicos segundo a presença ou não do alelo polimórfico do rs12970134 no grupo obeso .	50
TABELA 15 – Frequência dos fatores de risco cardiometabólicos e CAP segundo a presença ou não do alelo polimórfico do rs12970134 nos obesos.....	51
TABELA 16 – Comparação entre os dados de consumo alimentar segundo a presença ou não do alelo polimórfico do rs12970134 no grupo obeso .	52
TABELA 17 – Análise do desequilíbrio de ligação nos grupos obeso e controle	53

TABELA 18 – Frequência dos diplótipos nos grupos obeso e controle	53
TABELA 19 – Características das variantes encontradas no gene <i>MC4R</i>	56
TABELA 20 – Frequência das variantes identificadas no gene <i>MC4R</i> nos grupos obeso e controle	57
TABELA 21 – Comparação entre os dados clínicos, metabólicos e consumo alimentar segundo a presença ou não dos diplótipos AT_GT e GC_GT no grupo obeso	80
TABELA 22 – Comparação entre os dados clínicos, metabólicos e consumo alimentar segundo a presença ou não dos diplótipos GT_GT e AC_GT no grupo obeso	81
TABELA 23 – Frequência dos fatores de risco cardiometabólicos, CAP e inadequação da dieta segundo a presença ou não dos diplótipos no grupo obeso	82
TABELA 24 – Características antropométricas, clínica, metabólica e dados do consumo alimentar dos indivíduos portadores de variações alélicas no gene <i>MC4R</i>	83

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AgRP	Proteína relacionada ao agout
ALT	Alanina aminotransferase
AMDR	Acceptable Macronutrient Distribution Range
AST	Aspartato aminotransferase
Arg	Arginina
Asn	Aspargina
C	Citosina
CAP	Compulsão alimentar periódica
CART	Transcrito regulado por cocaína e anfetamina
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
Cys	Cisteína
DRIs	Dietary Reference Intakes
DSM-V	Manual de Diagnóstico e Estatística de Doenças Mentais - V
ECAP	Escala de Compulsão Alimentar Periódica
EDTA	Ácido etileno diaminotetracético
ENDEF	Estudo Nacional de Despesa Familiar
F	Foward
FC	Frequência cardíaca
FVL	Frutas, verduras e legumes
G	Guanina
Gln	Glutamina

Gly	Glicina
GM	Gordura monoinsaturada
GP	Gordura poli-insaturada
GS	Gordura saturada
GWAS	Genome-wide association studies
HDL-c	Colesterol HDL
Hys	Histidina
HOMA-IR	Homeostatic model assessment of insulin resistance
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
Ile	Isoleucina
IMC	Índice de massa corpórea
LDL-c	Colesterol LDL
Leu	Leucina
MC1R	Receptor tipo 1 de melanocortina
MC2R	Receptor tipo 2 de melanocortina
MC3R	Receptor tipo 3 de melanocortina
<i>MC4R</i>	Gene do receptor tipo 4 de melanocortina
MC4R	Receptor tipo 4 de melanocortina
MC5R	Receptor tipo 5 de melanocortina
MG	Massa gorda
MLG	Massa livre de gordura
NPY	Neuropeptídeo Y
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAD	Pressão arterial diastólica
PAS	Pressão arterial sistólica
PC	Pró-hormônio convertase

PCR	Reação em cadeia da polimerase
Phe	Fenilalanina
POF	Pesquisa de Orçamentos Familiares
POMC	Pró-opiomelanocortina
Pro	Prolina
R	Reverse
R24h	Recordatório de 24 horas
Ser	Serina
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
T	Tirosina
TACO	Tabela Brasileira de Composição de Alimentos
TCAP	Transtorno da compulsão alimentar periódica
TG	Triglicérides
USDA	Departamento de Agricultura dos Estados Unidos
Val	Valina
VET	Valor energético total
Z-IMC	Escore Z do Índice de Massa corpórea
α -MSH	Hormônio alfa estimulador de melanócitos
β -MSH	Hormônio beta estimulador de melanócitos
γ -MSH	Hormônio gama estimulador de melanócitos

RESUMO

Fernandes AE. *Efeito das variações alélicas no gene do receptor tipo 4 de melanocortina sobre o comportamento alimentar em crianças e adolescentes obesos* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

INTRODUÇÃO: O aumento mundial da prevalência de obesidade atribui-se principalmente a mudanças nos hábitos alimentares e na prática de atividade física, que afetam indivíduos predispostos geneticamente. Alterações genéticas podem provocar desequilíbrio na regulação homeostática afetando sinalizadores periféricos e centrais. Um componente do controle central fica no núcleo arqueado hipotalâmico, sendo o receptor tipo 4 de melanocortina (MC4R) de suma importância. Mutações no MC4R têm sido relatadas como causa mais frequente de obesidade monogênica. Há evidência de que polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) localizados próximos ao MC4R possam estar relacionados ao aumento do risco para obesidade, porém estudos de variantes nesse gene avaliando o consumo alimentar são escassos e controversos. **OBJETIVO:** Avaliar a influência de variantes alélicas no *MC4R* sobre consumo alimentar, presença de compulsão alimentar periódica (CAP), composição corporal e perfil clínico e metabólico em crianças e adolescentes obesos. **MÉTODOS:** Trata-se de um estudo transversal realizado com crianças e adolescentes obesos. Foram avaliados parâmetros antropométricos, metabólicos e fatores de risco cardiometabólicos, incluindo hipertensão arterial sistêmica, glicemia de jejum alterada, hipertrigliceridemia e HDL-colesterol baixo. A CAP foi avaliada utilizando a Escala de Compulsão Alimentar Periódica e o consumo alimentar por meio do Recordatório de 24 horas, analisando consumo calórico total, percentual de macronutrientes e fibras, além da frequência na omissão do café da manhã, adequação de macronutrientes, frações lipídicas e colesterol. Para verificar o efeito dos SNPs no risco para a obesidade foi incluído um grupo controle composto por 137 crianças e adolescentes eutróficos. Foi realizado o sequenciamento do gene MC4R e a genotipagem por PCR em tempo real das variantes rs17782313 e rs12970134, adotando-se o modelo recessivo para a análise. A análise estatística para comparação dos grupos foi conduzida por meio dos Testes T de Student ou Mann-Whitney U. Para avaliar a magnitude do risco, foi realizada regressão logística ajustada para Z-IMC, idade e gênero, com o nível de significância fixado em 0,05. **RESULTADOS:** Foram incluídos no estudo 536 obesos (52,1% meninas; 12,7 ± 2,7 anos; Z-IMC 3,24 ± 0,57). A frequência dos SNPs foi semelhante entre os grupos de obesos e controle. Os portadores do polimorfismo rs17782313 apresentaram maior nível de triglicérides (108 ± 48 vs. 119 ± 54, p=0,034) e maior risco para hipertrigliceridemia (OR=1,985; IC95% 1,288-3,057; p=0,002). Não houve associação do rs12970134 com os parâmetros clínicos, metabólicos ou alimentares. No gene MC4R foram identificados 10 polimorfismos já descritos e uma variante nova, Asn72Ser (A/G), sendo 8 mutações do tipo missense e 3 sinônimas. **CONCLUSÕES:** Os SNPs rs17782313 e rs12970134 não influenciam o consumo alimentar nem a presença da CAP. O SNP rs17782313 está associado a maior risco de hipertrigliceridemia e maior nível sérico de triglicérides em crianças e adolescentes obesos. A presença de mutações que resultem na perda de função no gene *MC4R* é rara nessa coorte.

Descritores: Obesidade infantil/genética, Receptor Tipo 4 de Melanocortina/genética, Polimorfismo de Nucleotídeo Único/genética, Obesidade/metabolismo, Criança, Adolescente.

ABSTRACT

Fernandes AE. *Effect of allelic variations in the melanocortin type 4 receptor gene on feeding behavior in obese children and adolescents* [Dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

INTRODUCTION: The global increase in the prevalence of obesity is attributed mainly to changes in dietary habits and physical activity, which affects genetically predisposed individuals. Genetic alterations can cause imbalance in the homeostatic regulation affecting peripheral and central signals. One component of the central control is the arcuate nucleus of the hypothalamus, and the melanocortin type 4 receptor (MC4R) is of outstanding importance. Mutations in *MC4R* have been reported as the most frequent cause of monogenic obesity. Studies indicate that polymorphisms located near the *MC4R* may be related to increased risk for obesity, but the studies of variations in this gene and its relation to food intake are scarce and controversial. **OBJECTIVE:** To evaluate the influence of allelic variants of *MC4R* in food intake, binge eating behavior (BE), body composition, clinical and metabolic profile in obese children and adolescents. **METHODS:** This is a cross-sectional study with obese children and adolescents. Anthropometric, metabolic parameters and cardiometabolic risk factors including hypertension, impaired fasting glucose, hypertriglyceridemia and low HDL-cholesterol were evaluated. The BE was evaluated through the Binge Eating Scale, and to analyze the dietary intake 24 hour recall was used, evaluating total caloric intake, percentage of macronutrients, fiber, omission of breakfast, adequacy of macronutrients, lipid fractions and cholesterol. To investigate the effect of SNPs on obesity risk, a control group of 137 eutrophic children and adolescents was enrolled. The *MC4R* gene was sequenced and genotyping was performed by real-time PCR of the variants rs17782313 and rs12970134, adopting the recessive model for the analysis. Statistical analysis for group comparison was conducted using the Student T test or Mann-Whitney U test. To assess the magnitude of risk, logistic regression adjusted for Z-BMI, age and gender was performed, with the significance level of 0.05. **RESULTS:** The study included 536 subjects (52.1% girls, 12.7 ± 2.7 years-old, $Z\text{-BMI} = 3.24 \pm 0.57$). The frequency of SNPs was similar between the obese and control groups. The C allele carriers for the rs17782313 polymorphism had increased triglyceride levels (108 ± 48 vs. 119 ± 54 , $p = 0.034$) and increased risk of hypertriglyceridemia (OR = 1.985, 95% CI 1.288-3.057, $p = 0.002$). There was no association of the SNP rs12970134 with clinical, metabolic or nutritional parameters. Ten polymorphisms already described and a new variant, Arg72Ser (A/G), were identified in the *MC4R* gene, with 8 missense mutations and 3 synonymous. **CONCLUSIONS:** The SNPs rs17782313 and rs12970134 did not influence food intake or the presence of BE. The SNP rs17782313 is associated with increased risk of elevated triglycerides and higher serum triglyceride levels in obese children and adolescents. The presence of mutations resulting in loss of function in the MC4R gene is rare in this cohort.

Descriptors: Pediatric Obesity/genetics; Polymorphism, Single Nucleotide/genetics; Receptor, Melanocortin, Type 4/genetics, Obesity/metabolism, Child, Adolescent.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 OBESIDADE

A obesidade é um problema de saúde pública mundial com prevalência crescente em diversos países, incluindo o Brasil, particularmente nas últimas décadas (1). Segundo os resultados do inquérito Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2008-2009, realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 49% da população adulta brasileira está acima do peso. Um dado preocupante é que mesmo entre crianças de 5 a 9 anos a prevalência de sobrepeso também é alta, afetando 36,6% delas. Os índices de obesidade também estão num patamar elevado e crescente. Em 1974-75, segundo o inquérito também realizado pelo IBGE, Estudo Nacional de Despesa Familiar, apenas 1,4% das crianças eram obesas, aumentando para 16,6% em 2008-2009. Em relação à população adolescente, os resultados não são diferentes, tendo a prevalência da obesidade aumentado de 0,4% para 5,9% no mesmo período (2).

O método utilizado universalmente para avaliar e classificar a obesidade em adultos é o índice de massa corpórea (IMC), por ser de fácil aplicação e apresentar correlação com a gordura corpórea e o risco de doenças (1). Em crianças, esse valor varia com a idade e o gênero, o que torna necessário uma ferramenta adicional para a avaliação (3). No Brasil, o Ministério da Saúde adota as curvas de IMC ajustado para idade e gênero

da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2007 (4), onde os pontos de corte para o diagnóstico do estado nutricional são definidos em percentis ou escores-Z, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1 - Valores críticos de diagnóstico nutricional para crianças de 5 a 19 anos

Diagnóstico Nutricional	Valores críticos	
	Percentil	Escore-z
Magreza acentuada	< 0,1	< -3
Magreza	$\geq 0,1$ e < 3	≥ -3 e < -2
Eutrofia	≥ 3 e ≤ 85	≥ -2 e $\leq +1$
Sobrepeso	> 85 e ≤ 97	> +1 e $\leq +2$
Obesidade	> 97 e $\leq 99,9$	> +2 e $\leq +3$
Obesidade grave	> 99,9	> +3

Fonte: Ministério da Saúde, 2007.

A etiologia da obesidade é multifatorial e envolve o desequilíbrio no balanço energético, influenciado principalmente por mudanças nos hábitos alimentares, como aumento do consumo de alimentos com alto teor de gordura e açúcar, aumento do volume e número de calorias ingeridas, além de diminuição da prática de atividade física (5), afetando principalmente os indivíduos que possuem alguma predisposição genética para obesidade (6).

Estudos de segregação familiar revelam que a hereditariedade da obesidade está na ordem de 40% (7) a 80% (8). Os genes podem intervir na adipogênese, lipogênese e manutenção de gordura e peso corporal (9) através da sua participação no controle de vias aferentes (sinalizadores hormonais, nutrientes, sinais nervosos, entre outros), de mecanismos

centrais (neurotransmissores hipotalâmicos) e de vias eferentes (atividade do sistema nervoso autônomo)(10).

Na infância, a obesidade está associada a um risco maior de morte prematura e incapacidade na vida adulta (1). Alguns estudos documentam que o tempo de duração da obesidade e sua instalação precoce estão diretamente associados à morbimortalidade por doenças cardiovasculares (11). Além disso, frequentemente podem ser observadas alterações metabólicas como dislipidemia e intolerância à glicose, esteatose hepática, alterações musculoesqueléticas como doença de Blount e epifisiolistese femoral proximal, alterações respiratórias como asma e apneia do sono, além de problemas psicossociais como depressão, redução da autoestima, intimidação física e/ou psicológica e transtornos alimentares (12).

1.2 TRANSTORNO DA COMPULSÃO ALIMENTAR PERIÓDICA

A compulsão alimentar caracteriza-se pela ingestão de uma grande quantidade de alimento em um período delimitado de tempo (por exemplo, até duas horas), maior do que a maioria das pessoas consumiria sob circunstâncias e períodos similares. Além disso, o episódio é acompanhado pela sensação de perda de controle em relação a quanto e o que é consumido (13).

O diagnóstico do transtorno da compulsão alimentar periódica (TCAP) caracteriza-se pela ocorrência de episódios de compulsão alimentar ao menos uma vez por semana nos últimos três meses, na ausência de comportamentos compensatórios voltados para a eliminação do excesso

alimentar ingerido como, por exemplo, abuso de laxantes, vômitos ou exercícios físicos excessivos. Adicionalmente, para satisfazer aos critérios de diagnóstico do TCAP, os episódios devem estar associados com no mínimo três das seguintes situações: comer mais rapidamente que o normal, comer grande quantidade de alimentos quando não há a sensação fisiológica de fome, comer até sentir-se desconfortável, comer sozinho em decorrência da sensação de embaraço pela quantidade de alimento consumida e/ou sentir repulsa por si mesmo, depressão ou culpa após comer excessivamente (13, 14). O TCAP é considerado um transtorno alimentar, segundo o Manual de Diagnóstico e Estatística de Doenças Mentais (15).

Estima-se que a prevalência do TCAP em indivíduos adultos em busca de tratamento para perda de peso seja de aproximadamente 30% e na população geral seja de cerca de 3% a 5% (14, 16). Entretanto em um estudo realizado no Brasil com 128 crianças e adolescentes obesos foi verificada a presença de compulsão alimentar periódica (CAP) em 39% (17).

Indivíduos obesos com TCAP apresentam o início do quadro de obesidade mais precoce, quando comparados àqueles sem o transtorno, e podem sofrer de maior flutuação de peso (18). A compulsão alimentar representa uma importante dificuldade diante do tratamento dos pacientes obesos, uma vez que estes indivíduos podem interromper prematuramente o tratamento devido à incapacidade de controlar a ingestão alimentar.

Existe um número crescente de estudos que abordam a contribuição de fatores genéticos na etiologia dos transtornos alimentares e da obesidade

(19). A vulnerabilidade genética, particularmente para os transtornos alimentares, pode estar associada à deficiência da sinalização na via hipotalâmica leptina-melanocortina (20), envolvendo fatores como a alimentação, regulação do apetite, metabolismo energético, personalidade e humor (19).

1.3 PREFERÊNCIA E CONSUMO ALIMENTAR

Respostas sensoriais ao sabor, aroma e textura dos alimentos ajudam a determinar as preferências e os hábitos alimentares. Preferências por sabores são influenciadas por variáveis genéticas, fisiológicas, metabólicas, gênero e idade, e podem ser moduladas por obesidade, transtornos alimentares ou doenças que influenciem o comportamento alimentar (21). A preferência e o hábito alimentar também se relacionam com fatores ambientais como o número de exposições a um alimento, propaganda na mídia, influência de colegas, familiares, ou professores, custo e dispêndio necessários para o acesso ao alimento, restrição e variedade de alimentos (22).

A ingestão excessiva de alimentos com alta densidade energética está relacionada com a obesidade, e estudos sugerem que a presença de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) pode influenciar a preferência por gordura (23-26) ou por doces (27, 28).

1.4 BALANÇO ENERGÉTICO

Em situação de equilíbrio energético, a energia que provem das calorias dos alimentos ingeridos é utilizada para manutenção do gasto energético total, que é composto pela soma da taxa metabólica basal, termogênese alimentar e gasto energético da atividade física. Em uma situação de energia consumida em excesso, o balanço calórico positivo é armazenado principalmente sob a forma de gordura, para utilização posterior (19).

A regulação homeostática do balanço energético é realizada por meio de um controle periférico, composto por uma complexa rede neuro-hormonal, da qual participam o sistema gustativo, o trato gastrointestinal, os músculos e o tecido adiposo e de um controle central, envolvendo principalmente o tronco cerebral, o hipotálamo, bem como áreas do sistema límbico e do córtex cerebral (19). Desequilíbrios em um ou mais componentes deste sistema podem desencadear um papel importante no desenvolvimento da obesidade (29).

1.4.1 Regulação homeostática e vias de sinalização

No núcleo arqueado do hipotálamo junto ao terceiro ventrículo cerebral, estão localizados corpos celulares de neurônios anorexígenos e orexígenos, sendo estes os primeiros integradores de informações nutricionais de fome e saciedade e de adiposidade, que são sensíveis não apenas à leptina, mas também à ghrelina, à insulina e ao peptídeo YY (19).

Uma subpopulação de neurônios orexígenos que sintetizam dois neurotransmissores, o neuropeptídeo Y (NPY) e a proteína relacionada ao Agouti (AgRP), atuam no núcleo paraventricular resultando no aumento de apetite, na inibição do sistema nervoso simpático e da produção de calor, favorecendo o ganho ponderal (19).

Outra subpopulação que consiste nos neurônios anorexígenos, por sua vez, sintetizam o transcrito regulado por cocaína e anfetamina (CART) e a pró-opiomelanocortina (POMC) (30). Este pró-hormônio, sob a ação das pró-hormônio convertases 1 e 2 (PC-1 e PC-2) dá origem a peptídeos bioativos, incluindo a corticotrofina (ACTH), a β -endorfina e os hormônios estimuladores de melanócitos (α -MSH, β -MSH e γ -MSH) que agem por meio da ligação com receptores de melanocortina (31), que se encontram amplamente distribuídos em tecidos periféricos e no sistema nervoso central (SNC) (30). O sistema da melanocortina possui cinco receptores (MC1R, MC2R, MC3R, MC4R e MC5R). Destes, o MC3R e o MC4R encontram-se no SNC e estão implicados na regulação do peso corporal, modulando o gasto energético, ativando o sistema nervoso simpático, a termogênese e diminuindo a ingestão alimentar (32) (Figura 1).

Figura 1 - Via leptina-melanocortina.

A elevação dos níveis de leptina e insulina, que ocorre com o aumento da gordura corporal e nas situações de balanço energético positivo, estimula os neurônios POMC/CART (via orexigênica), e inibe os neurônios NPY/AgRP (via anoréxica), localizados no núcleo arqueado do hipotálamo. O α -MSH, um produto da POMC, é agonista dos MC3R e MC4R, inibindo a ingestão alimentar e aumentando o gasto energético. Já o aumento da ghrelina, que ocorre nas situações de balanço energético negativo, estimula os neurônios AgRP/NPY. A AgRP é antagonista do MC4R e inibe a sinalização desse receptor resultando no aumento da ingestão alimentar e redução do gasto calórico. AgRP: proteína relacionada ao Agouti; CART: transcrito regulado por cocaína e anfetamina; Ghsr: receptor de ghrelina; Lepr: receptor de leptina; α -MSH: hormônio estimulador de melanócito α ; Mc3r: receptor tipo 3 de melanocortina; Mc4r: receptor tipo 4 de melanocortina; NPY: neuropeptídeo Y; POMC: pro-opiomelanocortina; Y1r: receptor de neuropeptídeo Y. [Adaptado de: Barsh & Schwartz, 2002 (33)]

Os circuitos neurais envolvidos na regulação da ingestão e escolha de alimentos são complexos e, em conjunto com o hipotálamo, outras áreas como o núcleo accumbens, a amígdala e o tronco cerebral formam um circuito complexo que regula o comportamento alimentar (34-36), incluindo fatores cognitivos e emocionais relacionados à ingestão de alimentos (35, 37, 38).

O MC4R apresenta papel fundamental na homeostase energética, podendo interferir na termogênese e na função cardiovascular, ocorrendo aumento da pressão arterial após sua ativação (39-41), além de relacionar-se com quantidade (42) e com a escolha de alimentos ingeridos (37, 43, 44).

1.5 GENE *MC4R* E OBESIDADE

O MC4R é uma proteína composta por 332 aminoácidos codificada pelo gene *MC4R*, localizado no cromossomo 18q22, que possui um único éxon com 1438 pares de base. O MC4R pertence ao grupo dos receptores acoplados à proteína G, com sete alças transmembrana, que estimulam a adenilciclase (45).

Em roedores, a expressão do *MC4R* foi confirmada no hipocampo, amígdala, hipotálamo, córtex orbital, córtex olfativo, corpo estriado e tronco cerebral (46). Camundongos com deleção do *MC4R* apresentam hiperfagia, obesidade e hiperinsulinemia. A re-expressão do *MC4R* no núcleo paraventricular do hipotálamo e na amígdala normaliza o comportamento hiperfágico, não afetando o gasto energético e a homeostase da glicose

(47), que normalizam com a re-expressão do *MC4R* em neurônios localizados no núcleo motor dorsal do nervo vago (48).

Outro estudo também realizado em roedores mostra que o *MC4R* influencia seletivamente o consumo alimentar. A administração de AgRP, antagonista do *MC4R*, na amígdala resultou em aumento do consumo da dieta com alto teor de gordura, enquanto que o oposto foi observado após a administração de um agonista do *MC4R*. No entanto, o consumo da dieta pobre em gordura não foi influenciado por nenhum dos ligantes (44). Outros estudos também apresentam resultados semelhantes após administração de agonistas ou antagonistas do *MC4R* no hipotálamo, ratificando o papel do *MC4R* na predileção ou aversão por alimentos com maior teor de gordura (37, 43).

Em 1998, foram relatadas as primeiras mutações no *MC4R* associadas à obesidade de início na infância em humanos (49). Desde então, mais de 150 foram identificadas. Estas mutações incluem pelo menos 122 missenses, sete mutações nonsense, além de duas deleções. Mutações no *MC4R* têm sido relatadas como a causa mais frequente de obesidade monogênica, com prevalências variando de acordo com a população estudada, desde menos de 0,5% até 5,8% (28, 45, 50, 51).

A deficiência do *MC4R* está relacionada com obesidade grave de início precoce, aumento de gordura corporal e massa magra, hiperfagia, aumento da velocidade de crescimento linear na infância e idade óssea maior do que a idade cronológica, além de nível elevado de insulina. Indivíduos homozigotos para mutações nesse gene apresentam fenótipo

mais grave, com IMC e gordura corporal aumentados quando comparados aos portadores heterozigotos, demonstrando que variantes no *MC4R* são transmitidas de forma autossômica co-dominante, com penetrância variável (50).

Dentre os SNPs no gene *MC4R*, dois parecem exercer efeito protetor em relação à obesidade, o rs2229616 (Val103Ile) e o rs5282087 (Ile251Leu), que se associaram com menor IMC, circunferência abdominal, hemoglobina glicada e maior valor de HDL-colesterol (52, 53). Portadores do rs2229616 apresentam menor risco de desenvolver obesidade (28). Foi encontrada uma correlação positiva entre esse SNP e maior de consumo de carboidratos em indivíduos obesos (54).

Grandes estudos do tipo *Genome-Wide Association* (GWAS) identificaram dois SNPs próximos ao gene *MC4R* associados à obesidade: rs17782313 e rs12970134 (Tabela 2) (55, 56). Esses SNPs estão localizados na região 3' não traduzida a 188 Kb e a 154 Kb da região codificadora do *MC4R*, respectivamente.

Tabela 2 - Características dos SNPs rs17782313 e rs12970134

SNP	rs17782313	rs12970134
Troca do alelo	C/T	G/A
Alelo ancestral	T	G
Frequência do alelo polimórfico	22% (12% a 29%)	20% (9% a 30%)

Fonte: Dados obtidos do NCBI, 2013.

Ainda é desconhecido o mecanismo do funcionamento dos SNPs rs17782313 e rs12970134 no *MC4R*. Especula-se que estas variantes possam modular a expressão desse gene (55).

Loos et al. (55) identificaram o rs17782313 como SNP mais comum no gene *MC4R* associado ao aumento de risco para obesidade e aumento de IMC em indivíduos de descendência europeia. Outro estudo encontrou relação desta variante com o aumento da circunferência abdominal e do risco de desenvolver diabetes tipo 2 em mulheres (26). O SNP rs12970134 também está relacionado com aumento de circunferência abdominal, peso corporal, IMC e resistência à insulina (56, 57).

Em relação à influência desses polimorfismos na ingestão energética e comportamento alimentar, os resultados são controversos. Qi et al.(26), em estudo realizado com 5724 mulheres, observou que portadores do alelo C para o rs17782313 apresentaram maior consumo energético total e de gorduras. Outros achados também relacionados a esse SNP são: menor resposta à saciedade em crianças e adultos (58), aumento do consumo de alimentos fora da refeição e hiperfagia em crianças obesas (26, 58, 59). No entanto, outro estudo conduzido em 756 adultos saudáveis não observou relação entre comportamento ou escolhas alimentares e essas duas variantes (60).

1.6 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

O *MC4R* exerce um papel fundamental na homeostase energética, influenciando a ingestão alimentar e o gasto energético, sendo as mutações

no *MC4R* a causa mais frequente de obesidade monogênica. É ainda controverso se o *MC4R* influencia a compulsão e o consumo alimentar, sobretudo em crianças e adolescentes.

Não há estudos na população brasileira que tenham analisado as variantes rs17782313 e rs12970134, nem a sequência do gene *MC4R*, relacionando com obesidade e comportamento alimentar.

OBJETIVO

2 OBJETIVO

Analisar a influência de variantes alélicas no gene *MC4R* e dos SNPs rs17782313 e rs12970134, próximos ao gene, em relação a consumo alimentar e presença da compulsão alimentar periódica em crianças e adolescentes obesos.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar a população quanto ao consumo alimentar, compulsão alimentar periódica e perfil clínico e metabólico;

Analisar a influência das variantes no gene *MC4R* e dos SNPs sobre o risco para obesidade, composição corporal e perfil clínico e metabólico;

Verificar a presença de variantes alélicas no gene *MC4R* em crianças e adolescentes obesos.

MÉTODOS

3 SUJEITOS E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

3.1.1 Grupo de obesos

O grupo de obesos foi constituído por crianças e adolescentes com idade entre 7 e 19 anos diagnosticados com obesidade segundo os critérios da OMS, $Z\text{-IMC} \geq 2$, utilizando a curva ajustada para gênero e idade (4). Foram incluídos indivíduos de ambos os sexos, candidatos a tratamento para obesidade na Liga de Obesidade Infantil da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP).

Os critérios de exclusão compreenderam diagnóstico de síndrome genética estabelecida (por exemplo, síndrome de Prader-Willi, síndrome de Bardet-Biedl ou outras), portadores de doença endócrina causadora de obesidade (por exemplo, síndrome de Cushing, hipotireoidismo ou outras), sinais clínicos sugestivos de síndromes genéticas incluindo critérios maiores e menores para síndrome de Prader-Willi, retinite pigmentosa associada à obesidade ou retardo mental, utilização de medicamentos que promovam mudança de comportamento alimentar e alteração de peso, tratamento em curso para obesidade.

3.1.2 Grupo controle

O grupo controle foi constituído por crianças e adolescentes com idade entre 7 e 19 anos e estado nutricional adequado, conforme classificação de IMC para idade e gênero, determinado pelo valor de Z-IMC entre $-2,0 \leq e \leq 1,0$, segundo os parâmetros da OMS (4).

Foram excluídos do estudo indivíduos em uso crônico de medicamentos que provocassem alteração de peso e/ou sob tratamento direcionado ao aumento ou diminuição de peso.

O recrutamento das crianças e adolescentes ocorreu a partir de escolas públicas do Estado de São Paulo, do Centro de Saúde Escola Geraldo de Paula Souza da Faculdade de Saúde Pública da USP, além do HC-FMUSP.

Para o grupo de crianças e adolescentes eutróficos foi realizada a avaliação de variáveis antropométricas, CAP, consumo alimentar e o estudo molecular.

3.1.3 Composição dos grupos

Inicialmente, foram triadas 801 crianças e adolescentes no estudo, dentre as quais 608 apresentaram diagnóstico de obesidade e 160 de eutrofia. Após exclusões por critérios descritos anteriormente, foram consideradas elegíveis 518 crianças e adolescentes no grupo com obesidade e 139 no grupo controle, conforme representado na Figura 2.

Figura 2 - Organograma representativo da amostra final de crianças e adolescentes no grupo de obesos e no grupo controle (eutrófico).

3.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este projeto está de acordo com os requisitos da Comissão de Ética para análise de Projetos de Pesquisa da Diretoria Clínica do HC-FMUSP, em atenção a Resolução nº. 466, de 12 de dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde, aprovado como Protocolo de Pesquisa número 0512/11.

Os participantes e seus responsáveis legais receberam e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido contendo informações detalhadas sobre a pesquisa anteriormente ao início dos procedimentos.

3.3 AVALIAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL

3.3.1 Variáveis antropométricas e clínicas

Peso (kg): aferido através de balança digital, marca Filizola®, com precisão de 100 gramas. As medidas foram realizadas com os pacientes trajando roupas leves e descalços.

Estatura (cm): determinada através de estadiômetro, graduado em centímetros e com precisão de 1,0 milímetro, apresentando barra de madeira vertical e fixa, com esquadro móvel para posicionamento sobre a cabeça do indivíduo descalços, em posição ereta, com os pés paralelos, calcanhares, panturrilha, glúteos, ombros e cabeça encostados no estadiômetro, com a cabeça sob o plano horizontal de Frankfurt. A medida de estatura foi utilizada para o cálculo do percentil (P) de estatura, determinado de acordo com as tabelas do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) para sexo e idade (61).

Escore Z do IMC (Z-IMC): determinado pelo IMC (peso (kg) dividido pela altura (m) do indivíduo elevada ao quadrado) utilizando o método LMS, no qual L representa o coeficiente empregado para normalização da curva, M representa a mediana e S, o coeficiente de variação individual para sexo e idade, conforme a equação: $Z\text{-IMC} = [(IMC/M)^L - 1] / LS$ (62). Os valores de LMS foram obtidos segundo as tabelas de IMC para idade e sexo da OMS (4).

Relação cintura-estatura (RCE): a RCE foi definida mediante a aferição da circunferência da cintura, utilizando-se fita plástica inelástica e

flexível, com precisão 1,0 mm. Como referencial anatômico, adotou-se a medida do ponto médio entre o rebordo costal inferior e a crista ilíaca. O paciente foi orientado a permanecer com o abdômen relaxado e em posição ereta, mantendo os braços paralelos ao corpo e os pés unidos, sendo a leitura da medida realizada no momento da expiração. A relação foi determinada pelo cálculo $RCE = \text{Circunferência da cintura (cm)} / \text{Estatura (cm)}$.

Composição corporal: compreendeu a avaliação do percentual de massa gorda (MG) realizada por bioimpedância elétrica, método que estima os compartimentos corpóreos com base em propriedades elétricas do organismo através da passagem de uma corrente elétrica de baixa intensidade. Foi orientada a retirada de calçados, meias, relógios ou qualquer outro objeto metálico para realização do exame (63, 64). As medidas da bioimpedância elétrica foram aferidas do lado direito do indivíduo, que foi orientado a manter-se deitado em posição supina sobre superfície não condutora, com os braços em ângulo de 30° em relação ao seu corpo e as pernas sem contato entre si. Para avaliação corporal, utilizou-se o aparelho de bioimpedância elétrica *Body Composition Analyser* (BiaQuantum RJL Systems, Inc, MI, EUA). Estes dados foram processados com a utilização de software contendo equações que permitiram estimar individualmente o conteúdo de MG (65).

Pressão arterial (mm Hg) e frequência cardíaca (FC): as aferições da pressão arterial e frequência cardíaca foram realizadas por meio de um medidor oscilométrico Microlife®, modelo BP 3AC1-1 PC (Widnau, Suíça),

validado pelo protocolo internacional da *European Society of Hypertension* (66, 67). A pressão arterial foi aferida com o indivíduo sentado em repouso por cinco minutos em ambiente calmo, com o paciente sentado e recostado, o braço totalmente exposto e apoiado em suporte ao nível do coração, utilizando-se manguito de tamanho adequado, com largura em torno de 40% da circunferência do braço, medida à meia distância entre o acrômio e o olecrano (68). Considerou-se o valor final obtido a partir da média entre três aferições e a determinação da hipertensão arterial (HAS) foi estabelecida por meio dos valores de percentis de pressão arterial sistólica (PAS) e/ou diastólica (PAD) ≥ 95 , baseado em tabelas para gênero, idade e percentil de estatura para crianças e adolescentes (69, 70)

Estadiamento puberal: O estadiamento puberal foi avaliado segundo os critérios propostos Marshall & Tanner (71). Os pacientes foram classificados como: (I) pré-púberes (genitália no estágio 1 ou 2 em meninos; mamas no estágio 1 em meninas) e (II) púberes (genitália a partir do estágio 3 em meninos; mamas a partir do estágio 2 em meninas).

3.3.2 Variáveis laboratoriais e metabólicas

A coleta de sangue venoso periférico foi realizada após 12 horas em jejum de alimentos e água e as análises foram conduzidas no Laboratório de Bioquímica da Divisão de Laboratório Central do HC-FMUSP e no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular (LIM-42) da Disciplina de Endocrinologia do HC-FMUSP.

Glicemia (mg/dL): a concentração plasmática de glicose foi

determinada pelo método enzimático colorimétrico automatizado utilizando-se kits comerciais (Labtest Diagnóstica®, Brasil). Considerou-se a glicemia de jejum alterada (GJA) quando o valor da glicemia apresentado foi ≥ 100 mg/dL (72, 73).

Insulina (mU/L): a concentração sérica de insulina foi determinada por eletroquimioluminescência (AutoDelfia, Perkin Elmer Life Sciences Inc., Norton, OH, EUA).

Resistência à insulina: avaliada pelo *Homeostatic model assessment of insulin resistance* (HOMA-IR), modelo proposto como método para avaliar resistência insulínica a partir das concentrações de insulina e glicose em jejum por meio da fórmula: $\text{HOMA-IR} = \text{Glicose (mg/dL)} \times \text{Insulina } (\mu\text{U/mL}) / 405$. (74)

Leptina (ng/mL) e leptina ajustada (ng/mL/kg): a leptina foi determinada por enzimaímmunoensaio utilizando-se kits comerciais #EZHL-80SK (EMD Millipore Corp., St. Charles, MO, EUA) calibrado com o padrão 97/554 do National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC). Para cada indivíduo, a leptina foi avaliada ajustada à quantidade de massa gorda, calculada a partir da razão $\text{Leptina ajustada} = \text{Leptina (ng/mL)} / \text{Massa gorda (kg)}$.

Lipoproteína de alta densidade (HDL-c) e Triglicérides (TG) (mg/dL): as dosagens plasmáticas foram determinadas pelo método enzimático colorimétrico automatizado utilizando-se kits comerciais (Roche Diagnostics Corp., Indianápolis, IN, EUA). Como referência para os parâmetros de perfil lipídico, definiu-se como HDL-c baixo, quando o valor de

HDL-c foi < 45 mg/dL e a hipertrigliceridemia quando o valor de TG apresentou-se ≥ 130 mg/dL para crianças e adolescentes na faixa etária entre os 10 a 19 anos e ≥ 100 mg/dL para crianças com até 10 anos de idade (75, 76).

Alanina aminotransferase (ALT) e Aspartato aminotransferase (AST) (U/L): as dosagens de ALT e AST foram realizadas pelo método cinético automatizado utilizando-se kits comerciais em analisador bioquímico Cobas Mira® (Roche Diagnostics Corp., Indianápolis, IN, EUA).

Ácido úrico (mg/dL): a concentração sérica de ácido úrico foi determinada pelo método enzimático colorimétrico automatizado utilizando-se kits comerciais (Roche Diagnostics Corp., Indianápolis, IN, EUA).

3.4 AVALIAÇÃO DA COMPULSÃO ALIMENTAR PERIÓDICA

A CAP foi avaliada utilizando a Escala de Compulsão Alimentar Periódica (ECAP), um questionário autoaplicável que avalia manifestações comportamentais, sentimentos e cognições envolvidas nos episódios de compulsão alimentar (Anexo A). O questionário, desenvolvido na década de 1980 por Gormally et al. (77), e traduzido e validado por Freitas et al. (78) em 2001 é composto por 16 itens com 62 afirmativas no total, dentre as quais deve ser assinalado, em cada item, a afirmativa que melhor representa a resposta do indivíduo.

A afirmativa de cada questão corresponde a determinado número de pontos que variam de 0 (zero) a 3 (três), em que 0 corresponde à ausência e 3, à gravidade máxima. O escore final, obtido pela somatória de pontos de

todas as afirmativas, permite a classificação do indivíduo em três categorias de CAP segundo os pontos de corte sugeridos pelos autores do questionário: grave (pontuação ≥ 27), moderada (pontuação entre 18 e 26) ou ausente (pontuação ≤ 17) (78).

Os indivíduos foram classificados em grupos de CAP ausente, quando o escore final obtido foi menor ou igual a 17 pontos e CAP presente quando o escore final foi superior a 17 pontos.

3.5 AVALIAÇÃO DO CONSUMO ALIMENTAR

A avaliação da dieta dos participantes foi realizada utilizando um inquérito alimentar Recordatório de 24 horas (R24h). Este método, que aborda todos os alimentos e preparações consumidas desde o momento em que o indivíduo acordou até a hora em que foi dormir no dia anterior, foi aplicado por nutricionistas (79). Quando necessário, o participante do estudo recebeu auxílio de seu responsável para a descrição correta das preparações e quantidades consumidas. Destaca-se que este método foi selecionado por poder ser aplicado em qualquer faixa etária, apresentar baixo custo, rápida aplicação e permite a obtenção de um quadro mais detalhado do consumo, pois possibilita respostas abertas, quando comparado a outros inquéritos (79).

A utilização desse inquérito teve como objetivo avaliar a ingestão média absoluta de energia (kcal), colesterol (mg) e fibras dietéticas (g) e percentual de macronutrientes (carboidratos, proteínas, lipídios totais) e frações de ácidos graxos dietéticos (gorduras saturada, monoinsaturadas e

poli-insaturadas), Também foi avaliada a contribuição percentual do valor energético total (VET) nas principais refeições (desjejum, almoço e jantar).

3.5.1 Análise do consumo alimentar

A análise de macronutrientes foi realizada de acordo com as recomendações do *Institute of Medicine* (80), denominadas *Dietary Reference Intakes* (DRIs), utilizando-se os valores propostos pela *Acceptable Macronutrient Distribution Range* (AMDR), que preconiza um consumo percentual em relação ao VET de 45 a 65 de carboidratos, 25 a 35 de lipídios e 10 a 30 de proteína (80). As frações lipídicas e colesterol foram analisados segundo a OMS (81) sendo considerado adequado o consumo percentual de gorduras saturadas < 10, gorduras poli-insaturadas de 6 a 11 e gorduras monoinsaturadas ≤ 20, em relação ao VET. Considerou-se inadequado o consumo de colesterol > 200 mg ao dia (81).

Os dados obtidos pelo R24h foram calculados por meio do software Avanutri® versão 4.0, sendo cadastrados no programa todos os alimentos utilizados e conferidos em duplicata, aplicando como referência a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO (82), como primeira opção, e, quando o alimento não estava relacionado na tabela, foi utilizada a tabela do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (83).

Para melhor caracterização da dieta, foi realizada análise da ingestão de alguns alimentos, divididos nos seguintes grupos:

Frutas, legumes e verduras (FLV): analisados em gramas, foi considerado adequado o consumo de 400g ou mais por dia, segundo recomendação da OMS (84).

Feijões: análise realizada em gramas.

Leite e iogurte: consumo analisado em mililitros.

Doces: foram incluído nesse grupo açúcar de adição, achocolatado em pó, biscoito recheado, bolo com recheio e cobertura, balas, pirulitos, chocolate, doce de leite, doce de amendoim, doce de frutas, sorvete de massa. Para análise desse grupo os alimentos foram convertidos em porções, onde cada porção equivale a 110 calorias;

Bebidas industrializadas: foram incluídos nesse grupo refrigerante e sucos industrializados. A unidade para análise desse grupo foi mililitros.

3.5.2 Padronização de medidas caseiras

Para a análise do R24h, as medidas caseiras foram convertidas em gramas utilizando a tabela elaborada por Pinheiro et al. (85), como referência primária, e Fisberg et al. (86), quando o alimento ou preparação não foi encontrado na primeira opção. Na ausência de informações quanto ao tamanho das porções consumidas, considerou-se a porção média. Para alimentos sem informações quanto às porções pequena ou grande, considerou-se uma porção pequena equivalente a 75% da porção média e uma porção grande equivalente a 125% da porção média. Para alimentos de redes de *fast-food*, foi acessado o sítio da internet da empresa a fim de consultar os ingredientes.

Quando nos inquéritos não foi especificado o tipo de copo, assumiu-se o copo de 200 ml. Também foram questionados os condimentos (temperos como sal, azeite, óleo, vinagre) adicionados aos alimentos consumidos crus, como saladas. No caso dos molhos, considerou-se a quantidade relatada pelo indivíduo. Quanto ao óleo e demais ingredientes utilizados na cocção, utilizou-se as quantidades descritas nos livros de medidas caseiras (85, 86).

3.6 ESTUDO MOLECULAR

O estudo molecular foi realizado no Laboratório de Carboidratos e Radioimunoensaios – LIM 18 da FMUSP. A genotipagem para determinação dos polimorfismos e o sequenciamento do gene foram realizados em DNA extraído de leucócitos de sangue periférico, utilizando-se protocolos padronizados.

3.6.1 Extração do DNA genômico

O DNA genômico foi obtido a partir de 15mL de sangue periférico, colhidos com 25mM de ácido etileno diaminotetracético (EDTA). O procedimento seguiu o protocolo de Miller et al. (1998), utilizando o método “*salting-out*” (87).

Nos indivíduos do grupo controle, a extração de DNA foi realizada a partir de amostra de 2 mL de saliva coletada utilizando-se kit comercial Oragene DNA G-500® (DNA Genotek Inc., Ontario, CA), quando não foi

possível a coleta de sangue periférico. A obtenção da amostra foi conduzida seguindo os protocolos padronizados estabelecidos pelo fabricante, mediante a orientação do indivíduo a permanecer sem ingerir alimentos, bebidas ou utilizar-se de qualquer substância capaz de remoção das células da mucosa oral pelo período mínimo de 30 minutos previamente à coleta de amostra (Anexo B).

A concentração do DNA foi estimada através da leitura da densidade óptica por espectrofotometro NanoDropND-1000 (*ThermoScientific, Medison, WI, USA*). Após a etapa da quantificação as amostras foram diluídas em uma faixa de concentração final de 50ng/μL, para a realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

3.7 GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS

A genotipagem dos polimorfismos foi realizada utilizando ensaios TaqMan, tendo a reação um volume final de 10μL contendo: TaqMan Genotyping Master Mix® (2x) – 5,0μL, Assay 20x – 0,5μL, DNA genômico 1,0μL, água Milli-Q estéril – 3,5μL, de acordo com o protocolo do fabricante, Applied Biosystems. A genotipagem dos SNPs rs17782313 e rs12970134 foi realizada, respectivamente, através dos seguintes ensaios TaqMan: assay ID c_32667060_10 e c_3058722_10 (*Applied Biosystems, EUA*). A fluorescência do ensaio foi visualizada pelo sistema de PCR em tempo real Step One Plus® (*Applied Biosystems, EUA*), através da seguinte ciclagem: 60°C durante 1 minuto Pre-PCR Read (*Holding Stage – Step 1*), 95°C durante 10 minutos (*Holding Stage – Step 1*), 95°C durante 15 segundos

(40X) (*Cycling Stage – Step 1*) e, finalmente, a 60°C durante 1 minuto (*Step 2*).

A confiabilidade da genotipagem por TaqMan para cada um dos polimorfismos foi verificada através do sequenciamento automático de três indivíduos controle com os genótipos diferentes: homozigoto para o alelo ancestral, heterozigoto e homozigoto para o alelo polimórfico.

3.8 SEQUENCIAMENTO DO GENE MC4R

3.8.1 Reação em cadeia da polimerase

A reação de PCR foi realizada para amplificação da região codificadora do *MC4R* composta por apenas 1 exon. Para tanto, utilizou-se 2 oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 3), desenhados com base na sequência disponível no banco de dados *Ensembl Genome Browser* (ENSG00000166603). Em virtude do tamanho do exon, composto por 1438 pb, foram necessários quatro oligonucleotídeos iniciadores: dois para a amplificação por PCR (1F e 2R) e três para o sequenciamento (1F, 1R e 2F).

Tabela 3 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para o sequenciamento do gene *MC4R*

Tipo	Nome	Sequência
<i>Sense (forward)</i>	1F	5'ATCAATTCAGGGGGGACACTG3'
	2F	5'AGTTGTATCTGGGCAGCTTG3'
<i>Antisense (reverse)</i>	1R	5'CAGCATGGTGAAGAACATGG3'
	2R	5'ACGGAAGAGAAAGCTGTTGC3'

As reações foram realizadas com o volume final de 25µL, contendo 17,75µL de água Mili-Q, 0,5µL de dNTP a 10mM, 1,0µL de cada oligonucleotideo iniciador 1F e 2R a 10pmol, 0,25µL da enzima *Platinum® Taq DNA polymerase* (5 U/µL), 2µL de DNA genômico a 50ng/µL e 2,5µL de tampão de reação com MgCl₂ 10x pcr buffer 100mM (*GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK*).

A amplificação foi realizada em termociclador Veriti® (*Applied Biosystems-Life Technologies, Foster City, CA, USA*). O protocolo de amplificação consistiu de um ciclo de 5 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos a 94°C por 45 segundos, temperatura de anelamento de 60°C, por 45 segundos e 72°C por 1 minuto; ciclo de extensão a 72°C por 10 minutos, finalizando a 15°C. Os fragmentos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% contendo brometo de etídeo 10mg/mL (*Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*) utilizando, como marcador de peso molecular, o *Low DNA Mass Ladder* (*Invitrogen, Life Technology, Gaithersburg, MD, USA*). Os fragmentos foram visualizados e

analisados sob transiluminação em luz ultravioleta (*Eletronic U.V. Transiluminator – Ultra Lum*) e fotodocumentador (*Vilber Loumart*).

3.8.2 Purificação enzimática e sequenciamento automático

Apenas os produtos amplificados foram utilizados no sequenciamento, obedecendo a critérios de fragmento de banda única e concentrações $\geq 20\text{ng}/\mu\text{L}$. Posteriormente, $2,5\mu\text{L}$ do produto de amplificação foi submetido à purificação enzimática com a adição de $1\mu\text{L}$ da ExoSAP-IT® - combinação das enzimas fosfatase alcalina de camarão e exonuclease I (*USB Corporation – GE Healthcare*). A reação foi processada a 37°C por 15 minutos, seguido por mais 15 minutos a 80°C . Os produtos de PCR purificados foram submetidos à reação de sequenciamento. O protocolo consistiu na adição de: $1,5\mu\text{L}$ de “*Big Dye*” (*ABI Prism® BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits - Applied Biosystems-Life Technologies*), $0,5\mu\text{L}$ do oligonucleotídeo iniciador a 10pMol , $6,0\mu\text{L}$ do Tampão “*Save Money*” (*Applied Biosystems Life Technologies*), além de $2,0\mu\text{L}$ de betaína a 5M (*Sigma-Audrich, St Louis, Missouri, USA*), utilizada para otimizar a reação, obedecendo ao seguinte programa de ciclagem: 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos, num total de 25 ciclos, finalizando a 15°C . A reação de sequenciamento foi realizada no termociclador Veriti® (*Applied Biosystems-Life Technologies, Foster City, CA, USA*). Estes produtos foram submetidos à precipitação com $1\mu\text{L}$ EDTA (125mM), $1\mu\text{L}$ Acetato de Na (3M) e $25\mu\text{L}$ Ethanol PA (*Merck Reagentes*), de acordo com as recomendações da *Applied Biosystems - Life*

Technologies.

Os produtos de sequenciamento foram então submetidos à eletroforese capilar e analisados em sequenciador automático *ABI Prism Genetic Analyzer XL 3130 automatic DNA sequencer (Applied Biosystems/Hitachi)*. Os cromatogramas foram comparados com sequências disponíveis no banco de dados *Ensembl* e lidos no programa *Sequencher®* versão 4.8.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A amostra foi caracterizada quanto às variáveis antropométricas, clínicas e metabólicas, a CAP foi avaliada através do escore obtido pela ECAP, sendo os indivíduos classificados com CAP ausente ou CAP presente, e o consumo alimentar por meio do consumo percentual de macronutrientes e frações lipídicas, fibras em gramas, colesterol em miligramas, valor energético total e dividido pelas refeições realizadas.

As variáveis contínuas foram apresentadas em média e desvio padrão quando em distribuição paramétrica e mediana e percentis 25 e 75 quando em distribuição não paramétrica, enquanto as variáveis nominais foram apresentadas em frequências absolutas e relativas. As variáveis contínuas foram submetidas ao teste Kolmogorov-Smirnov para verificação de distribuição paramétrica ou não paramétrica.

As comparações de variáveis contínuas e os polimorfismos foram conduzidas pelo modelo recessivo, modelo genético no qual indivíduos homozigotos para o alelo ancestral e indivíduos portadores do alelo

polimórfico são comparados. Adotou-se este modelo com a finalidade de diminuir o número de classes e elevar o poder estatístico da amostra. O Teste T de Student ou Teste Mann-Whitney U foram utilizados, respectivamente, para variáveis contínuas com distribuição paramétrica e não paramétrica.

Para a comparação entre as frequências alélicas e inadequações no consumo alimentar ou fatores de risco cardiometabólicos foi utilizado o Teste de Qui-Quadrado (χ^2). No caso de significância estatística, a magnitude do risco conferido por cada variável foi estimada usando *Odds Ratio* (OR) com intervalo de confiança (IC) de 95%, calculado por regressão logística, ajustada para variáveis de confusão.

As frequências dos polimorfismos foram testadas quanto ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg utilizando-se o Teste de Qui-Quadrado (χ^2) e a avaliação de desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos foi realizada por meio do programa CubeX: Cubic Exact Solution (88).

Utilizou-se o programa PHASE versão 2.1.1 para estimar as frequências de haplótipos e diplótipos no grupo de crianças e adolescentes obesos e o grupo controle (89, 90).

As análises estatísticas foram conduzidas utilizando-se o programa SPSS versão 20.0 (*Statistical Package for the Social Sciences Inc.*, EUA) e em cada teste de hipótese foi fixado nível de significância de 0,05.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO

4.1.1 Características antropométricas, clínicas e metabólicas

Foram incluídos no estudo 518 crianças e adolescentes obesos com Z-IMC médio de $3,24 \pm 0,57$ e idade de $12,7 \pm 2,7$ anos, sendo 270 (52,1%) do gênero feminino e 248 (47,9%) do masculino. Quanto ao estadiamento puberal, 173 (33,4%) deles foram classificados como pré-púberes e 345 (66,6%) púberes.

O grupo controle foi composto por 137 crianças e adolescentes eutróficos, sendo 77 (55,4%) do gênero feminino. Os obesos apresentaram significativamente maiores médias de idade, Z-IMC, percentil de estatura e escore da ECAP. As características antropométricas dos dois grupos e clínicas e metabólicas dos indivíduos obesos são apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Características antropométricas, clínicas e metabólicas do grupo obeso, e antropométricas do grupo controle

Variáveis	OBESOS	EUTRÓFICOS	p
	Média ± DP	Média ± DP	
	Mediana (P ₂₅ – P ₇₅)	Mediana (P ₂₅ – P ₇₅)	
Idade (anos)	12,7 ± 2,7	10,60 ± 1,28	<0,001
Z-IMC (escore)	3,24 ± 0,57	-0,21 ± 0,72	<0,001
Estatura (percentil)	77 (49 - 94)	50,11 ± 27,66	<0,001
ECAP (escore)	16 (11 - 22)	7 (0 - 10)	<0,001
RCE	0,65 (0,60 - 0,70)	...	...
PAS (percentil)	78 (56 - 91)	...	...
PAD (percentil)	66 (46 - 82)	...	...
FC (bpm)	82 ± 13	...	...
Massa gorda (%)	39,4 ± 6,3	...	...
Ácido úrico (mg/dL)	5,6 ± 1,3	...	...
ALT (U/L)	19 (15 - 27)	...	...
AST (U/L)	21 (18 - 26)	...	...
Glicose (mg/dL)	81 ± 10	...	...
Insulina (μU/mL)	20,9 (14,7 - 31,8)	...	...
HOMA-IR	4,1 (2,8 - 6,5)	...	...
Colesterol total (mg/dL)	166 ± 32	...	...
LDL-colesterol (mg/dL)	98 (83 - 118)	...	...
HDL-colesterol (mg/dL)	42 (38 - 49)	...	...
Leptina (ng/mL)	42 (28 - 57)	...	...
Leptina Ajustada (ng/mL/kg)	1,30 ± 0,65	...	...
Triglicérides (mg/dL)	102 (75 - 138)	...	...

Dados com distribuição paramétrica, apresentados em média e desvio padrão, comparados por Teste T de Student. Dados com distribuição não paramétrica apresentados em mediana e P₂₅-P₇₅, comparados por teste de Mann Whitney-U.

ECAP: escala de compulsão alimentar periódica; RCE: relação cintura-estatura; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; FC: frequência cardíaca; ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase.

Entre os obesos, a prevalência de HAS, hipertrigliceridemia, HDL-c baixo e glicemia de jejum alterada foi de 21,4% (n=107), 58,4% (n=288), 33,9% (n=166) e 3,8% (n=19), respectivamente.

4.1.2 Avaliação do consumo e compulsão alimentar

Ao comparar o valor energético total e valor energético percentual por refeição entre os grupos, os indivíduos eutróficos apresentaram médias maiores de calorias no café da manhã e no lanche da tarde, ao passo que os obesos apresentaram maior valor energético total e percentual no lanche da manhã, almoço e jantar.

Quanto ao consumo de macronutrientes, os obesos apresentaram maior consumo percentual de gorduras totais, poli e monoinsaturadas, maior consumo médio de colesterol e de fibras, e menor consumo percentual de carboidratos. Os dados referentes ao consumo alimentar nos dois grupos estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Comparação do valor energético total, valor energético percentual por refeição e características do consumo percentual de macronutrientes, colesterol, frações lipídicas e fibras entre grupo obeso e controle.

Variáveis	OBESOS	EUTRÓFICOS	p
	Média ± DP	Média ± DP	
	Mediana (P ₂₅ – P ₇₅)	Mediana (P ₂₅ – P ₇₅)	
Energia (kcal)	2049 ± 765	1581 ± 667	<0,001
Café da Manhã (%)	9,5 (0 - 17)	17,5 (9 - 25)	<0,001
Lanche da Manhã (%)	0 (0-11,5)	0 (0 - 0)	<0,001
Almoço (%)	31 ± 14	25 ± 13	<0,001
Lanche da Tarde (%)	10,6 (0 - 18,7)	12,6 (2,9 - 25)	0,008
Jantar (%)	31,7 (21 - 40)	26,8 (19 - 35)	0,010
Ceia (%)	0 (0 - 4,8)	0 (0 - 0)	0,888
Proteína (%)	18 ± 6,1	17,2 ± 5,7	0,187
Carboidratos (%)	51,2 ± 9,1	53,7 ± 9,0	0,008
Gordura total (%)	30,8 ± 6,9	29,1 ± 7,0	0,022
Colesterol (mg)	258 (170 - 385)	178 (104 - 288)	<0,001
GS (%)	10,9 ± 3,1	11 ± 3,3	0,798
GP (%)	7 ± 2,6	6 ± 2	<0,001
GM (%)	9,4 ± 2,9	8,8 ± 2,7	0,041
Fibras (g)	17,7 (12 - 24,5)	13,5 (9,3 – 20,7)	0,006

Dados com distribuição paramétrica, apresentados em média e desvio padrão, comparados por Teste T de Student. Dados com distribuição não paramétrica apresentados em mediana e P₂₅-P₇₅, comparados por teste de Mann Whitney-U.

GS: gordura saturada; GP: gordura poli-insaturada; GM: gordura monoinsaturada.

Entre os obesos observa-se maior frequência na omissão do café da manhã e maior consumo percentual de gordura poli-insaturada (Figuras 3 e 4). Quanto ao consumo categórico de fibras e adequação do consumo percentual de proteínas, não houve diferença entre os grupos (Figuras 5 e 6).

Figura 3 - Frequência de omissão das principais refeições nos grupos obeso e controle

* $p < 0,001$; ** $p = 0,051$; *** $p = 0,169$

Figura 4 - Frequência do consumo inadequado de frações lipídicas e colesterol nos grupos obeso e controle

* $p = 0,831$; ** $p = 0,027$; *** $p < 0,001$

GS: gordura saturada; GP: gordura poli-insaturada; Col: colesterol.

Figura 5 - Frequência do consumo de fibras nos grupos obeso e controle

Figura 6 - Frequência do consumo percentual de macronutrientes nos grupos de obeso e controle

* $p=0,014$; ** $p=0,040$; *** $p=0,526$.

CHO: carboidrato; Eu: eutróficos; GT: gordura total; Ob: obesos; PTN: proteína.

Na análise qualitativa da dieta, observa-se que o grupo dos obesos apresentou maior consumo médio de feijão, com frequência menor de consumidores e média de consumo de bebidas açúcaradas maior, com um número maior de consumidores, quando comparado ao grupo controle. Quanto ao consumo de leite, doces e FVL, não houve diferença significativa entre os grupos (Tabelas 6 e 7).

Tabela 6 - Comparação entre a frequência de consumo de alimentos ou grupo alimentares nos grupos obeso e controle

Variáveis		OBESOS N (%)	EUTRÓFICOS N (%)	p
FVL	-	82 (31,3)	52 (36,4)	0,996
	+	130 (68,7)	91 (63,6)	
Consumo adequado FVL	-	158 (87,8)	82 (90,1)	0,570
	+	22 (12,2)	9 (9,9)	
Feijão	-	68 (25,9)	13 (9,2)	<0,001
	+	195 (74,1)	129 (90,8)	
Leite e iogurte	-	72 (27,4)	29 (20,4)	0,080
	+	191 (72,6)	113 (79,6)	
Doces	-	64 (24,4)	24 (16,8)	0,070
	+	198 (75,6)	119 (83,2)	
Bebidas açucaradas	-	26 (9,9)	24 (16,8)	0,047
	+	236 (90,1)	119 (83,2)	

Regressão logística.

FVL: frutas, verduras e legumes.

Tabela 7 - Comparação do consumo de alimentos e grupos alimentares entre os grupos obeso e controle

Variáveis	OBESOS	EUTRÓFICOS	p
	Média ± DP	Média ± DP	
	Mediana (P ₂₅ – P ₇₅)	Mediana (P ₂₅ – P ₇₅)	
FVL (g)	130 (60 - 250)	125 (60 - 220)	0,635
Feijão (g)	120 (80 - 160)	120 (60 - 120)	0,006
Leite (mL)	200 (150 - 300)	200 (100 - 250)	0,056
Doces (porção)	139 (0,7 - 3,54)	1,09 (0,5 - 3,0)	0,227
Bebidas açucaradas (mL)	300 (200 - 500)	200 (200 - 400)	<0,001

Dados com distribuição não paramétrica apresentados em mediana e P₂₅-P₇₅, comparados por teste de Mann Whitney-U.

FVL: frutas, verduras e legumes.

Avaliando a compulsão alimentar nos dois grupos, o valor médio de escore da ECAP foi de 16 (11 - 22) entre os obesos e 7 (0 - 10) entre os eutróficos ($p < 0,001$). Os obesos apresentaram um maior número de indivíduos classificados com CAP [45,5% (n=222)] que os eutróficos [5% (n=7)] ($p < 0,001$).

4.2 ESTUDO DOS SNPS RS17782313 E RS12970134

No grupo obeso, os SNPs rs17782313 e rs12970134 foram avaliados em 403 e 406 indivíduos, respectivamente. Ambos estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Suas frequências alélicas e genotípicas estão apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8 - Frequências alélicas e genotípicas dos SNPs rs17782313 e rs12970134 no grupo obeso

SNP		Alelos		p	Genótipos			p
		T	C		TT	TC	CC	
rs17782313 (T/C)	N	243	160	0,22	243	141	19	0,80
	(%)	60,3	39,7		60,3	35,0	4,7	
		G	A		GG	GA	AA	
rs12970134 (G/A)	N	245	161	0,22	245	146	15	0,23
	(%)	60,3	39,7		60,3	35,9	3,7	

No grupo controle, os SNPs foram avaliados em 133 e 132 indivíduos, respectivamente. As frequências alélicas e genotípicas dos mesmos, que estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, são apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9 - Frequências alélicas e genotípicas dos SNP rs17782313 e rs12970134 no grupo controle

SNP		Alelos		p	Genótipos			p
		T	C		TT	TC	CC	
rs17782313 (T/C)	N	86	46	0,20	86	38	08	0,18
	(%)	65,2	34,8		65,2	28,8	6,1	
		G	A		GG	GA	AA	
rs12970134 (G/A)	N	82	51	0,21	82	46	05	0,64
	(%)	61,7	38,3		61,7	24,6	3,8	

4.2.1 Avaliação das variantes quanto à obesidade

Quando comparamos a presença do alelo polimórfico para os SNPs rs17782313 e rs12970134 entre os grupos obeso e controle, não há diferença significativa (Tabela 10).

Tabela 10 - Comparação da frequência genotípica dos SNPs rs17782313 e rs12970134 entre os grupos obeso e controle

SNP		Obesos N (%)	Eutróficos N (%)	OR IC 95%	P
rs17782313	TT	243 (60,3)	86 (65,2)	1,1 0,710 - 1,705	0,668
	CT/TT	160 (39,7)	46 (34,8)		
rs12970134	GG	245 (60,3)	82 (61,7)	1,0 0,656 - 1,553	0,966
	AG/AA	161 (39,7)	51(38,3)		

Regressão logística ajustada para Z-IMC, idade e gênero.

4.2.2 Avaliação do SNP rs17782313 quanto às características antropométricas, clínicas e metabólicas no grupo de obesos.

Os obesos portadores do rs17782313 apresentaram maior média de triglicérides, e maior frequência de hipertrigliceridemia. As demais variáveis para esse polimorfismo não apresentaram diferença estatística (Tabelas 11 e 12).

Tabela 11 - Comparação entre os dados clínicos e metabólicos segundo a presença ou não do alelo polimórfico do rs17782313 no grupo obeso

Variáveis	TT	CT/CC	p
Z-IMC (escore)	3,28 ± 0,57	3,25 ± 0,56	0,612
RCE	0,65 (0,60 - 0,71)	0,65 (0,61 - 0,71)	0,913
Estatutura (percentil)	77 (50 - 93)	77 (47 - 93)	0,651
PAS (percentil)	78 (58 - 90)	80 (57 - 92)	0,459
PAD (percentil)	64 (46 - 79)	64 (46 - 81)	0,940
FC (bpm)	82 ± 13	84 ± 14	0,237
Massa gorda (%)	39,7 ± 5,9	40,1 ± 7,0	0,569
ECAP (escore)	17 ± 8	18 ± 9	0,669
Ácido úrico (mg/dL)	5,5 ± 1,3	5,6 ± 1,3	0,237
ALT (U/L)	20 (15 - 27)	20 (16 - 28)	0,520
AST (U/L)	21 (16 - 26)	22 (19 - 27)	0,372
Glicose (mg/dL)	79 ± 9	80 ± 11	0,425
Insulina (µU/mL)	21 (15 - 32)	22 (14 - 34)	0,942
HOMA-IR	4,2 (2,9 - 6,4)	4,1 (2,8 - 6,7)	0,795
Colesterol total (mg/dL)	165 ± 31	171 ± 35	0,096
LDL-colesterol (mg/dL)	99 (81 - 119)	99 (84 - 118)	0,418
HDL-colesterol (mg/dL)	43 (38 - 49)	42 (37 - 49)	0,660
Leptina (ng/mL)	47 (34 - 66)	48 (33 - 66)	0,720
Leptina Ajustada (ng/mL/kg)	1,5 ± 0,6	1,5 ± 0,7	0,845
Triglicérides (mg/dL)	97 (75 - 131)	110 (76 - 149)	0,034

Dados com distribuição paramétrica apresentados em média e desvio padrão, comparados por teste T de Student. Dados com distribuição não paramétrica apresentados em mediana e P₂₅-P₇₅, comparados por teste de Mann Whitney-U.

ECAP: escala de compulsão alimentar periódica; RCE: relação cintura-estatura; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; FC: frequência cardíaca; ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase.

Tabela 12 - Frequência dos fatores de risco cardiometabólicos e CAP segundo a presença ou não do alelo polimórfico do rs17782313 nos obesos

Variáveis	TT N (%)	CT/CC N (%)	OR IC 95%	p
HAS	- 189 (81,1) + 44 (18,9)	119 (77,8) 34 (22,2)	1,254 0,746-2,109	0,392
Glicemia de jejum alterada	- 235 (97,5) + 6 (2,5)	151 (95,6) 7 (4,4)	1,732 0,566-5,302	0,336
HDL-c baixo	- 99 (41,6) + 139 (58,4)	67 (42,4) 91 (57,6)	0,931 0,616-1,407	0,734
Hipertrigliceridemia	- 166 (70,3) + 70 (29,7)	88 (56,1) 69 (43,9)	1,985 1,288-3,057	0,002
CAP	- 118 (52,4) + 107 (47,6)	78 (51,7) 73 (48,3)	1,086 0,712-1,657	0,702

Regressão logística ajustada para Z-IMC, idade e gênero.

HAS: hipertensão arterial; HDL-c: colesterol HDL; CAP: compulsão alimentar periódica.

4.2.3 Avaliação do SNP rs17782313 quanto ao consumo alimentar no grupo de obesos

Ao comparar as médias das variáveis referentes ao consumo alimentar, não houve diferença significativa entre os portadores ou não do rs17782313 (Tabela 13).

Tabela 13 - Comparação entre os dados de consumo alimentar segundo a presença ou não do alelo polimórfico do rs17782313 no grupo obeso

Variáveis	TT	CT/CC	p
Energia (kcal)	1979 ± 759	2094 ± 792	0,298
Café da manhã (%)	10,2 (0,0 - 17,7)	10,4 (0,0 - 19,4)	0,407
Almoço (%)	32,1 ± 15,7	30,4 ± 11,9	0,407
Jantar (%)	29,7 ± 15,1	31,1 ± 13,4	0,481
Proteínas (%)	18 ± 6	17 ± 5	0,502
Carboidratos (%)	51 ± 9	52 ± 8	0,330
Gordura total (%)	31 ± 7	30 ± 6	0,337
Gordura saturada (%)	10,8 ± 3,1	10,6 ± 2,8	0,703
Gordura monoinsaturada (%)	9,5 ± 2,9	9,1 ± 2,8	0,332
Gordura poli-insaturada (%)	7,1 ± 2,6	6,8 ± 2,5	0,535
Colesterol (mg)	232 (152 - 348)	256 (178 - 408)	0,243
Fibras (g)	17,7 (11,4 - 26,1)	17,5 (12,3 - 23,5)	0,681

Dados com distribuição paramétrica apresentados em média e desvio padrão, comparados por teste T de Student. Dados com distribuição não paramétrica apresentados em mediana e P₂₅-P₇₅, comparados por teste de Mann Whitney-U.

4.2.4 Avaliação do SNP rs12970134 quanto às características antropométricas, clínicas e metabólicas no grupo de obesos

A presença do SNP rs12970134 não implicou em diferença significativamente estatística nas médias das variáveis clínicas e metabólicas, nem na frequência dos fatores de risco cardiometabólicos (Tabelas 14 e 15).

Tabela 14 - Comparação entre os dados clínicos e metabólicos segundo a presença ou não do alelo polimórfico do rs12970134 no grupo obeso

Variáveis	GG	AG/AA	p
Z-IMC (escore)	3,27 ± 0,59	3,28 ± 0,54	0,780
RCE	0,66 (0,61 - 0,72)	0,65 (0,60 - 0,70)	0,191
Estatutura (percentil)	76 (50 - 92)	78 (47 - 94)	0,896
PAS (percentil)	79 (59 - 90)	79 (56 - 92)	0,686
PAD (percentil)	63 (46 - 79)	66 (46 - 81)	0,445
FC (bpm)	81,8 ± 12,7	84 ± 14,1	0,125
Massa gorda (%)	39,9 ± 6,4	39,8 ± 6,4	0,864
ECAP (escore)	17,4 ± 8,5	17,5 ± 8,4	0,936
Ácido úrico (mg/dL)	5,57 ± 1,29	5,52 ± 0,32	0,748
ALT (U/L)	20 (16 - 28)	20 (16 - 27)	0,837
AST (U/L)	21 (18 - 26)	22 (18 - 26)	0,615
Glicose (mg/dL)	79,8 ± 10,2	79,9 ± 10,1	0,961
Insulina (µU/mL)	22 (15 - 35)	20 (14 - 31)	0,161
HOMA-IR	4,3 (3,0 - 6,7)	4,1 (2,3 - 6,2)	0,230
Colesterol total (mg/dL)	166 ± 34	18 ± 31	0,610
LDL-colesterol (mg/dL)	99 (82 - 121)	98 (85 - 116)	0,953
HDL-colesterol (mg/dL)	42 (37 - 49)	43 (37 - 49)	0,969
Leptina (ng/mL)	49 (34 - 67)	45 (33 - 64)	0,258
Leptina Ajustada (ng/mL/kg)	1,5 ± 0,64	1,5 ± 0,68	0,733
Triglicérides (mg/dL)	98 (76 - 136)	108 (76 - 144)	0,131

Dados com distribuição paramétrica apresentados em média e desvio padrão, comparados por Teste T de Student. Dados com distribuição não paramétrica apresentados em mediana e P₂₅-P₇₅, comparados por teste de Mann Whitney-U.

ECAP: escala de compulsão alimentar periódica; RCE: relação cintura-estatura; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; FC: frequência cardíaca; ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase.

Tabela 15 - Frequência dos fatores de risco cardiometabólicos e CAP segundo a presença ou não do alelo polimórfico do rs12970134 nos obesos

Variáveis		GG N (%)	AG/GG N (%)	OR IC 95%	p
HAS	-	190(80,5)	119(77,8)	1,167	0,557
	+	46(19,5)	34(22,2)	0,697-1,952	
Glicemia de jejum alterada	-	234(96,7)	55(96,9)	0,909	0,870
	+	8(3,3)	5(3,1)	0,291-2,843	
HDL-c baixo	-	101(41,9)	66(41,8)	0,980	0,923
	+	140(58,1)	92(58,2)	0,649-1,479	
Hipertrigliceridemia	-	158(66,1)	96(61,1)	1,228	0,344
	+	81(33,9)	61(38,9)	0,802-1,880	
CAP	-	120(52,6)	78(51,7)	1,081	0,718
	+	108(47,4)	73(48,3)	0,709-1,647	

Regressão logística ajustada para gênero, idade e Z-IMC.

HAS: hipertensão arterial; HDL-c: colesterol HDL; CAP: compulsão alimentar periódica.

4.2.5 Avaliação do SNP rs12970134 quanto ao consumo alimentar no grupo de obesos

Não houve diferença significativamente estatística quanto às médias referentes ao consumo alimentar (Tabela 16).

Tabela 16 - Comparação entre os dados de consumo alimentar segundo a presença ou não do alelo polimórfico do rs12970134 no grupo obeso

Variáveis	GG	AG/AA	p
Energia (kcal)	2000 ± 791	2039 ± 741	0,712
Café da manhã (%)	9,4 (0,0 - 19,0)	10,4 (0,0 - 18,6)	0,392
Almoço (%)	31,7 ± 15,3	31,4 ± 13,6	0,870
Jantar (%)	30,3 ± 15,1	30,0 ± 14,0	0,626
Proteínas (%)	17,9 ± 6	17,7 ± 6	0,831
Carboidratos (%)	50,9 ± 8,9	51,8 ± 9	0,452
Gordura Total (%)	31,1 ± 7	30 ± 6	0,245
Gordura saturada (%)	10,8 ± 3	10,7 ± 3	0,732
Gordura monoinsaturada (%)	9,7 ± 3	8,9 ± 2,6	0,057
Gordura poli-insaturada (%)	7,1 ± 2,6	6,8 ± 2,4	0,310
Colesterol (mg)	241 (151 - 351)	253 (185 - 390)	0,275
Fibras (g)	17,7 (11,7 - 25,0)	17,3 (12,1 - 25,2)	0,725

Dados com distribuição paramétrica apresentados em média e desvio padrão, comparados por Teste T de Student. Dados com distribuição não paramétrica apresentados em mediana e P₂₅-P₇₅, comparados por teste de Mann Whitney-U.

4.3 ANÁLISE DO DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO

Verificamos que tanto no grupo de obesos quanto no controle os SNPs rs1778233 e rs12970134 estavam em desequilíbrio de ligação (Tabela 17).

Tabela 17 - Análise do desequilíbrio de ligação nos grupos obeso e controle

	D'	R²	p
Obesos	0,638	0,3896	<0,001
Eutróficos	0,627	0,3764	<0,001

4.3.1 Frequência estimada dos diplótipos

Foram estimados 9 diferentes haplótipos gerados a partir das variantes alélicas, apresentados na Tabela 18.

Tabela 18 - Frequência dos diplótipos nos grupos obeso e controle

Diplótipo	Obesos N (%)	Eutróficos N (%)	p
AC_AC	9 (2,2)	3 (2,3)	1,000
AC_GC	8 (2,0)	4 (3,0)	0,502
AC_GT	98 (24,3)	27 (20,3)	0,561
AT_AC	3 (0,7)	1 (0,8)	1,000
AT_AT	3 (0,7)	1 (0,8)	1,000
AT_GT	37 (9,2)	15 (11,3)	0,499
GC_GC	2 (0,5)	1 (0,8)	0,573
GT_GC	40 (9,9)	10 (7,5)	0,493
GT_GT	203 (50,4)	71 (53,4)	0,547

4.3.1 Avaliação dos diplótipos quanto às características antropométricas, clínicas, metabólicas e dados de consumo alimentar no grupo obeso

Nenhum diplótipo influenciou na presença de obesidade (Tabela 18).

Ao comparar as variáveis antropométricas, clínicas e metabólica, foi observado que os obesos com o diplótipo GT_GT apresentou menor média de frequência cardíaca (81 ± 13 vs. 84 ± 14 ; $p=0,038$), de triglicérides (107 ± 47 vs. 118 ± 54 ; $p=0,038$) e menor frequência de hipertrigliceridemia ($OR=0,608$; $IC95\%$ 398 - 930; $p=0,022$), exercendo efeito protetor. Paralelamente, verificou-se maior frequência de hipertrigliceridemia para o diplótipo AC_GT ($OR=1,685$; $IC95\%$ 1,039 - 2,733; $p=0,034$). Resultados esses que corroboram com o mostrado anteriormente (Tabelas 11 e 12), onde os portadores do alelo polimórfico para o rs17781213 (alelo C) apresentaram maiores valores de triglicérides.

Outro dado observado foi menor média de AST para o diplótipo AT_GT ($20,8 \pm 9,1$ vs. $23,2 \pm 7$; $p=0,022$). Não foram observadas diferenças entre os parâmetros nos demais diplótipos (Anexos C, D e E).

Por causa da baixa frequência, não foi possível realizar análise nos diplótipos AC_AC, AC_GC, AT_AC, AT_AT e GC_GC.

4.4 GENE *MC4R*

A análise do sequenciamento do *MC4R* foi realizada em 400 crianças e adolescentes obesos e 133 eutróficos, sendo identificadas 10 mutações já descritas no banco de dados *Ensembl Genome Browser*: rs2229616 (C/T), rs61741819 (G/A), rs138281308 (G/T), CM003759 (A/G), CM061845 (C/T), COSM1611328 (C/T) rs52804924 (G/T), rs145765578 (G/A), rs150448918 (G/A/C), rs52820871 (T/G) e 1 variante nova, Asn72Ser (A/G) (Tabela 19). A posição na proteína das variantes encontradas estão ilustradas na Figura 7.

Nos obesos identificamos 9 mutações, 2 sinônimas e 7 missenses, sendo que 2 resultam em perda funcional da proteína. Os eutróficos apresentaram 6 mutações, 2 sinônimas e 4 missenses, incluindo 1 mutação que causa perda funcional da proteína (Tabela 20).

Figura 7 - Posição das mutações missense no *MC4R* identificadas nesse estudo e consequências na atividade funcional do receptor

Tabela 19 - Características das variantes encontradas no gene *MC4R*

Variante	Troca do alelo	Alelo ancestral	Substituição do aminoácido	Posição na proteína	Tipo da mutação
rs2229616	C/T	C	Val ⇒ Ile	103	missense
rs61741819	G/A	G	Ile ⇒ Ile	198	sinônima
rs138281308	G/T	G	Phe ⇒ Leu	202	missense
CM003759	A/G	G	Thr ⇒ Ile	150	missense
CM061845	A/G	G	Val ⇒ Ile	166	missense
COSM1611328	C/T	C	Arg⇒Gln	305	missense
rs52804924	G/T	G	Pro ⇒ His	299	missense
rs145765578	G/A	G	Cys ⇒ Cys	279	sinônima
rs150448918	G/A/C	G	Gly ⇒ Gly	324	sinônima
rs52820871	T/G	T	Ile ⇒ Leu	251	missense
Asn72Ser	A/G	G	Asn ⇒ Ser	72	missense

Arg=arginina; Asn=aspargina Cys=cisteína, Gln=glutamina; Gly=glicina, His=histidina,
 Ile=isoleucina, Leu=leucina, Phe=fenilalanina, Pro=prolina, Ser=serina, Thr=treonina,
 Val=valina.

Tabela 20 - Frequência das variantes identificadas no gene *MC4R* nos grupos de obeso e controle, caracterização funcional e referência

Variante	Obesos N (%)	Eutróficos N (%)	Perda funcional	Referência
rs2229616	6 (1,50)	2 (1,50)	Não	(45)
rs61741819	4 (1,00)	3 (2,26)	-	-
rs138281308	1 (0,25)	2 (1,50)	Não	(91, 92)
CM003759	1 (0,25)	0 (0,00)	Sim, parcial	(45)
CM061845	1 (0,25)	0 (0,00)	Não	(93)
COSM1611328	0 (0,00)	1 (0,75)	Sim, parcial	(94)
rs52804924	1 (0,25)	0 (0,00)	Sim, total	(91, 95)
rs145765578	1 (0,25)	0 (0,00)	-	-
rs150448918	0 (0,00)	1 (0,75)	-	-
rs52820871	1 (0,25)	1 (0,75)	Não	(45)
Asn72Ser	1 (0,25)	0 (0,00)	...	...

Figura 8 - Eletroferogramas de regiões do gene *MC4R* com e sem as variantes identificadas

A: eletroferograma com a variante; B: eletroferograma sem a variante.

As variantes no gene foram mais frequentes no grupo controle do que no grupo obeso (7,5% vs. 4,5%, $p < 0,001$).

As variantes foram identificadas em heterozigose, exceto a variante rs61741819 presente em apenas um indivíduo, que foi verificada em homozigose, como mostra a Figura 8. Três portadores do polimorfismo rs138281308, eutróficos e obesos, e um da variante rs2229616, obeso, também apresentaram a variante rs61741819.

As características clínicas, metabólicas e perfil dietético dos indivíduos portadores das variantes encontram-se no Anexo F. As mutações identificadas no *MC4R* parece não determinar um fenótipo específico nos obesos.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, que teve como foco verificar a influência de variantes no gene *MC4R* sobre o consumo e compulsão alimentar, observa-se que o grupo de crianças e adolescentes obesos apresentou uma média de Z-IMC de 3,24, que representa um grau acentuado de obesidade.

As doenças comumente associadas à obesidade em adultos também foram observadas em nossa coorte de crianças e adolescentes obesos. Encontramos elevadas frequências de hipertensão arterial, hipertrigliceridemia e baixo HDL-c (21,4%, 58,4% e 33,9%, respectivamente). Estes valores são semelhantes a alguns estudos já publicados (96-100).

A hipertensão arterial é uma doença que frequentemente se associa à obesidade em adolescentes (96-100). Além da influência da adiposidade sobre a pressão arterial (101) o *Bogalusa Heart Study* (99) consolidou a relação entre pressão arterial e os níveis de insulina, mesmo após ajuste para o IMC. Este importante estudo também documentou que indivíduos com sobrepeso e obesidade apresentavam-se 2,4 a 7,1 vezes mais propensos a apresentar hipercolesterolemia, com níveis elevados de LDL-c e triglicérides e baixos HDL-c (99).

Em nossa população encontramos médias elevadas de HOMA-IR, insulina e leptina. A leptina aumenta em proporção à adiposidade (100, 102), havendo correlação da leptinemia com IMC, circunferência da cintura e

percentual de massa gorda, assim como com a concentração de insulina e HOMA-IR, sendo-lhe um papel importante da leptina na patogênese da resistência à insulina (100, 103-106).

Os níveis elevados de triglicérides e baixos de HDL-c encontrados na presente casuística estão em concordância com outros estudos em outras populações (97, 98) nas quais esses números são maiores que os de adolescentes sem obesidade.

Em nossa amostra de crianças e adolescentes obesos foi observada uma alta prevalência de sintomas de CAP, sendo 45,5% classificados com CAP. Esse valor foi significativamente maior do que o apresentado pelo grupo controle, onde apenas 5% dos indivíduos apresentam CAP. A compulsão alimentar figura como um achado frequente entre indivíduos à procura de tratamento para a obesidade (107, 108). Estudos anteriores também encontraram prevalência significativa de episódios de CAP entre 39,1% de crianças e adolescentes com obesidade ($Z\text{-IMC} = 2,28 \pm 0,46$) (17) e de 56,7% entre adultos obesos mórbidos (109). A elevada prevalência de CAP em nossa coorte pode dever-se à gravidade da obesidade apresentada.

O consumo percentual de gordura total nas crianças e adolescentes obesos foi significativamente maior quando comparado aos eutróficos, em concordância com outros estudos (110, 111). Não obstante, é importante considerar que, apesar do maior consumo de colesterol, não houve diferença entre o consumo percentual de gordura saturada entre os grupos. Na Pesquisa Nacional de Avaliação da Saúde e Nutrição dos Estados

Unidos da América (NHANES), observou-se que apesar do notável aumento da obesidade entre as crianças no período entre 1970 e 1988-1994, o percentual médio de energia a partir de gordura total e saturada diminuiu. Ainda assim, mais de 75% das crianças apresentaram consumo inadequado de gordura total, colesterol ou gordura saturada (112). Da mesma forma, em nossa população, também observamos alta frequência de inadequação no consumo de gorduras totais, gorduras saturadas e colesterol (26%, 59% e 66%, respectivamente).

O consumo de refrigerantes merece algumas considerações, pois, juntamente a outras bebidas açucaradas, apresentam alta densidade energética e, por ser líquido, muitas vezes seu consumo pode ser acompanhado de outros alimentos sólidos, na maior parte das vezes de baixa qualidade nutricional, o que resulta no aumento da ingestão calórica total e de açúcar (113).

Nos resultados apresentados pela POF 2008-2009 (114) pode-se observar alto consumo *per capita* de refrigerante pela população brasileira (94,7 g/dia), principalmente entre os adolescentes (122 g/dia). O NHANES mostrou o aumento significativo do consumo de refrigerantes e bebidas açucaradas em 15 anos, contribuindo com maior valor calórico no VET em crianças e adolescentes com excesso de peso quando comparado aos eutróficos (112). Também em nossa coorte verificamos não só uma mediana maior de consumo diário de refrigerantes e bebidas adoçadas pelos obesos (300mL vs. 200mL), como uma frequência alta de consumidores entre as crianças e adolescentes obesos, com mais de 90% dos indivíduos.

Outro dado de consumo alimentar que diferiu entre os grupos é a média do consumo de fibras, maior entre os obesos. A fibra normalmente é considerada um marcador positivo de qualidade da dieta, pois está associada ao consumo de vegetais, alimentos integrais e leguminosas (114). Porém, ao analisar os alimentos e grupos alimentares, podemos concluir que o maior valor de fibras ocorreu em consequência ao maior volume de feijão consumido pelos obesos, e não pela frequência de consumidores do feijão, que foi maior entre os eutróficos, ou pelo consumo de vegetais, que não diferiu entre os grupos.

Ao avaliar o padrão de refeição, ressalta-se um percentual elevado de sujeitos entre os obesos que não realizam o café da manhã, além de maior consumo percentual do VET no jantar, quando comparado aos eutróficos. A omissão do café da manhã está positivamente associada com aumento de IMC (115) e inadequação de macro e micronutrientes, resultando na piora da qualidade da dieta, com menor ingestão de laticínios e frutas, alimentos fontes de cálcio, vitaminas e fibras (115-117). Estudos também mostram que O consumo maior do que 30% do VET no período noturno aumenta em duas vezes o risco para obesidade (118) e associa-se a circunferência de cintura aumentada (119) e resistência à insulina (120).

Há evidências de que o baixo consumo percentual calórico de manhã e alto consumo no período noturno interferem no sistema circadiano, que, através da ação de hormônios como leptina, cortisol e adiponectina, resulta na redução do gasto energético e no maior acúmulo de gordura corporal (121).

5.1 rs17782313

A presença do alelo C do rs17782313 está associada com maior IMC, apresentando um efeito de $0,25 \text{ kg/m}^2$ por alelo, bem como maior circunferência de cintura, implicando em aumento de $0,67 \text{ cm}$ por alelo. Estes achados foram encontrados em indivíduos adultos de origem europeia (57). Outros estudos também apresentaram resultados semelhantes (26, 55, 122, 123), além de uma possível influência do rs17782313 na glicemia de jejum aumentada (26, 124, 125). Entretanto, outros estudos, assim como o realizado em nossa população, não corroboram com esses resultados, uma vez que não foi encontrada relação desse SNP com risco aumentado para obesidade (124-126), circunferência de cintura (124, 127), glicemia de jejum aumentada, insulinemia (124), ou hipertensão arterial (128).

Portadores do rs17782313 apresentaram maior média de triglicérides e maior frequência de hipertrigliceridemia no grupo de obesos, ao ajustar para fatores de confusão (Z-IMC, gênero e idade). Esses resultados são confirmados ao analisar os haplótipos, pois foi verificado nos obesos com o haplótipo TG_TG, ausência do alelo de risco C para o rs17782313, menor nível sérico de triglicérides e menor frequência de hipertrigliceridemia.

Alguns estudos que avaliaram a associação entre níveis de triglicérides e esse SNP não encontraram resultado significativo (57, 129-131). Um deles, no entanto, documentou uma associação da variante com HDL-c baixo (131) e outro com LDL-c plasmático aumentado (129).

Katsuura-Kamano et al. (132), verificaram relação positiva entre níveis plasmáticos de triglicérides e a presença do alelo polimórfico em uma coorte

de adultos japoneses. A administração de AgRP, agonista inverso do MC4R, ou a inativação do gene *MC4R* em ratos resultou no aumento da absorção de lipídios, síntese de triglicérides e acúmulo de gorduras no tecido adiposo, independente da ingestão de alimentos (133). Nessa coorte também houve aumento de triglicérides independente do consumo de gorduras. Apesar de ainda ser desconhecido o mecanismo do funcionamento do rs17782313 no *MC4R*, especula-se que esta variante atue na modulação da expressão desse gene (55),

Qi et al. (26) encontraram uma ingestão de energia total maior em mulheres homozigóticas para o alelo C do que em portadoras do alelo ancestral (TT), além de verificar maior consumo de proteínas, gorduras totais e saturadas, após ajuste para variáveis de confusão. No entanto, assim como em nossa pesquisa, outros dois estudos conduzidos em populações europeias (23, 60) não confirmam este achado. Torna-se importante destacar que utilizamos o R24h para avaliar a ingestão alimentar, enquanto Qi et al. (26) utilizaram um questionário de frequência alimentar (QFA) contendo 116 alimentos, Bauer et al. (23) utilizaram um QFA desenvolvido para a população dinamarquesa com 77 itens principais, e Hasselbalch et al. (60) utilizaram um QFA com 227 itens desenvolvido para a Investigação Prospectiva Europeia sobre Câncer e Estudo Dinamarquês de Nutrição.

Apesar do *MC4R* ser expresso em áreas do cérebro que regulam o comportamento alimentar, incluindo fatores emocionais e cognitivos (34-36), são controversos os estudos que relacionam mutações nesse gene com a presença de CAP. Branson et al. (134) foram os primeiros a relatar a relação

positiva entre variantes no gene *MC4R* e compulsão alimentar em adulto com obesidade grave. Outros estudos, realizados com crianças e adolescentes obesos (94, 135) e adultos obesos ou eutróficos (94), não observaram nenhuma influência de variantes no *MC4R* sobre a CAP, ao incluir somente mutações funcionalmente relevantes para o gene.

Ao analisar 205 voluntários de peso saudável, Horstmann et al. (136) observaram influencia da presença do alelo de risco C para o rs17782313 sobre o comportamento alimentar em mulheres. Esse SNP também foi associado com humor deprimido e comportamento de comer emocional e maior desejo por comida (137). Apesar da alta frequência de CAP nas crianças e adolescentes obesos, a presença da variante rs17782313 não influenciou a CAP nesse grupo.

5.2 rs12970134

A presença do rs12970134 não influenciou o risco para obesidade, quando comparamos os grupos de obesos e eutróficos, e nem implicou em maior gravidade da obesidade, quando avaliamos as médias de Z-IMC dos obesos portadores ou não desse polimorfismo. Também não observamos associação dessa variante com parâmetros de risco cardiometabólicos ou alteração da ingestão alimentar ao avaliar crianças e adolescentes obesos.

Em concordância com o nosso estudo Hasselbalch et al. (60) não encontraram correlação entre o rs12970134 e o IMC, circunferência de cintura, consumo de energia total ou macronutrientes. Um estudo italiano que avaliou adultos com obesidade mórbida também não encontrou relação

dessa variante com fatores de risco cardiometabólico, incluindo adiposidade HDL-c, pressão arterial, HOMA-IR e circunferência de cintura (138).

Em contrapartida, um estudo tipo GWAS, realizado em população indiana e de origem europeia, encontrou correlação do rs12970134 com circunferência de cintura, sendo que homozigotos para o alelo A apresentaram aumento médio de dois centímetros nessa medida, além de maior risco para resistência à insulina (56). A associação do alelo de risco A com maior IMC foi descrita também por outros autores (57, 139).

5.3 GENE *MC4R*

Nesse estudo verificamos a presença de mutações missenses em 3% dos indivíduos obesos, com apenas 2 (0,5%) portadores de mutações que causam perda funcional do *MC4R*. Assim, podemos considerar rara a prevalência de mutações com perda de função *MC4R* de nossa amostra de crianças e adolescentes.

A prevalência de mutações funcionalmente relevantes no gene *MC4R* parece variar dependendo da origem étnica. Farooqi et al. (50) encontraram 5,8% de mutações no *MC4R* em pacientes britânicos de origem caucasiana com obesidade grave com início na infância. Em outro estudo realizado em crianças alemãs com excesso de peso foi observado que 5,3% dos indivíduos eram portadores de mutações (140). Em índios Pima foi observada sua presença em 2,4% dos indivíduos (141), enquanto que em crianças e adolescentes italianos com obesidade grave a mutação nesse gene foi menor que 0,5% (142).

Um dos polimorfismos mais investigado no gene *MC4R* é o rs2229616, uma variante missense com troca de uma valina por uma isoleucina na posição 103 da proteína, porém sem implicação funcional para o receptor (45, 143).

Diversos estudos demonstram um efeito protetor do SNP rs2229616 no IMC, reduzindo de 18% a 30% o risco para obesidade (28, 52, 53, 144, 145). No estudo KORA, realizado com mais de 7 mil adultos de origem europeia, foi observada a presença dessa variante em 3,7% dos sujeitos, que apresentaram redução da circunferência de cintura em 1,46 cm, da hemoglobina glicada em 0,09% e um aumento do HDL-c em 1,76 mg/dl (53). Brönnner et al. também observaram efeito protetor desse SNP com redução de 41 mg/dl nos níveis de triglicérides associada à presença do alelo de risco C (146).

A variante missense rs52820871, que consiste na substituição de uma isoleucina por uma leucina na posição 251 da proteína, também parece exercer efeito protetor contra a obesidade. Stutzmann et al., ao analisar 9 estudos com indivíduos de origem europeia observaram associação inversa entre a presença do alelo polimórfico e obesidade ou aumento de IMC em 8 estudos (52).

Nessa coorte o SNP rs2229616 esteve presentes em 1,5% dos indivíduos obesos e não influenciou a obesidade, já que frequência foi semelhante nos grupos de obesos e controle. O mesmo foi observado para o SNP rs52820871, presente em 1 indivíduo obeso e 1 controle. Outros estudos também não observaram efeito protetor para esses SNPs (54, 147).

A variante rs138281308 foi descrita pela primeira vez em 2002 por Jacobson et al. (148) e corresponde a uma variação do tipo missense em que há a troca de uma fenilalanina por uma leucina na posição 202, e parece não afetar funcionalmente o MC4R (92). Essa variação parece ser dependente da origem étnica, pois há relatos de ocorrência somente em estudos que incluem populações de origem africana (91, 148). Semelhante ao nosso estudo, em que a frequência desse SNP foi rara entre os obesos (0,25%), um estudo caso-controle realizado com 1821 norte americanos relatou apenas 1 indivíduo com obesidade severa portador dessa variante (91)..

A mutação missense CM061845 (troca da valina pela isoleucina na posição 166 da proteína) esteve presente em 1 sujeito obeso. Essa variante foi descrita em um estudo de base populacional germânica, com frequência de 0,02% e sem perda funcional para o gene (93).

As mutações encontradas no presente estudo que resultam em perda parcial da função do receptor são CM003759, substituição da treonina por isoleucina na posição 150, e COSM1611328, substituição da arginina pela glutamina, identificadas em 1 obeso e 1 controle, respectivamente. Ainda são escassas as publicações que relatem essas mutações.

Ao realizar estudo funcional *in vitro* para a mutação CM003759, Vaisse et al. observaram redução parcial da atividade do receptor e da afinidade pelo α -MSH, quando comparado ao receptor do tipo selvagem (45). Assim como em nosso estudo, eles observaram apenas 1 paciente com essa mutação em coorte com 209 obesos.

A mutação COSM1611328 foi descrita pela primeira vez na população europeia, com frequência rara, de 1 portador em uma coorte com 2257 indivíduos obesos e 2677 não obesos (94). Apesar de essa mutação provocar perda funcional no gene, no presente estudo a criança portadora dessa mutação é eutrófica ($Z\text{-IMC} = 0,65$). Mutações funcionais no *MC4R* raramente são encontradas em controles eutróficos, contudo a prevalência dessas em nossa população controle (0,7%) é muito semelhante ao descrito em uma amostra populacional de adultos da Alemanha (0,66%) (93) e norte-americanos (0,64%) (91).

Encontramos apenas 1 mutação que resulta em perda total da função do gene, rs52804924 (troca da prolina pela histidina na posição 299), que abole a resposta do MC4R ao $\alpha\text{-MSH}$ *in vitro* (91, 95). Essa é uma mutação rara, sendo identificada em 2 indivíduos norte-americanos (91) e 1 criança de francesa (95), todos com obesidade grave.

A mutação no códon 72, não descrita previamente, leva a substituição de uma asparagina por uma serina, dois aminoácidos de polaridade neutra. Esse aminoácido está localizado na primeira alça transmembrana do receptor e foi identificado em uma criança obesa. Faz-se necessário caracterizar funcionalmente o receptor com essa mutação.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Os polimorfismos rs17782313 e rs12970134 não estão associados ao consumo alimentar nem à presença da compulsão alimentar no grupo de obesos.

O polimorfismo rs17782313 está associado ao maior risco de hipertrigliceridemia e maior nível sérico de triglicérides em crianças e adolescentes obesos.

O polimorfismo rs12970134 não influencia os parâmetros clínicos e metabólicos e a composição corporal.

As crianças e adolescentes obesos apresentam maior frequência na omissão do café da manhã, consumo calórico total, de colesterol e de percentual de gorduras poli-insaturadas, além de maior consumo de fibras, relacionado à ingestão de feijão.

A compulsão alimentar periódica é comum nos obesos, estando presente em quase metade dessa coorte, e rara nos eutróficos.

As crianças e adolescentes obesos apresentam elevada frequência de hipertensão arterial, hipertrigliceridemia e níveis baixos de HDL-colesterol.

A presença dos polimorfismos rs17782313 e rs12970134 não implica em maior risco para obesidade.

A presença de variantes alélicas funcionalmente relevantes para gene *MC4R* é rara nessa coorte.

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO A. Escala de Compulsão Alimentar Periódica

Autores: Gormally J, Black S, Daston S, Rardin D. (1982).

Tradutores: Freitas S, Appolinario JC. (2001).

Nome: _____ **Data:** ____/____/____

Instruções: Você encontrará abaixo grupos de afirmações numeradas. Leia todas as afirmações em cada grupo e marque, nesta folha, aquela que melhor descreve o modo como você se sente em relação aos problemas que tem para controlar seu comportamento alimentar.

1

- () 1. Eu não me sinto constrangido(a) com o meu peso ou o tamanho do meu corpo quando estou com outras pessoas.
- () 2. Eu me sinto preocupado(a) em como pareço para os outros, mas isto, normalmente, não me faz sentir desapontado(a) comigo mesmo(a).
- () 3. Eu fico mesmo constrangido(a) com a minha aparência e o meu peso, o que me faz sentir desapontado(a) comigo mesmo(a).
- () 4. Eu me sinto muito constrangido(a) com o meu peso e, frequentemente, sinto muita vergonha e desprezo por mim mesmo(a). Tento evitar contatos sociais por causa desse constrangimento.

2

- () 1. Eu não tenho nenhuma dificuldade para comer devagar, de maneira apropriada.
- () 2. Embora pareça que eu devore os alimentos, não acabo me sentindo empanturrado(a) por comer demais.
- () 3. Às vezes tendo a comer rapidamente, sentindo-me então desconfortavelmente cheio(a) depois.
- () 4. Eu tenho o hábito de engolir minha comida sem realmente mastigá-la. Quando isto acontece, em geral me sinto desconfortavelmente empanturrado(a) por ter comido demais.

3

- () 1. Eu me sinto capaz de controlar meus impulsos para comer, quando eu quero.
- () 2. Eu sinto que tenho falhado em controlar meu comportamento alimentar mais do que a média das pessoas.
- () 3. Eu me sinto totalmente incapaz de controlar meus impulsos para comer.
- () 4. Por me sentir tão incapaz de controlar meu comportamento alimentar, entro em desespero tentando manter o controle.

4

- () 1. Eu não tenho o hábito de comer quando estou chateado(a).
- () 2. Às vezes eu como quando estou chateado(a) mas, frequentemente, sou capaz de me ocupar e afastar minha mente da comida.
- () 3. Eu tenho o hábito regular de comer quando estou chateado(a) mas, de vez em quando, posso usar alguma outra atividade para afastar minha mente da comida.

() 4. Eu tenho o forte hábito de comer quando estou chateado(a). Nada parece me ajudar a parar com esse hábito.

5

() 1. Normalmente quando como alguma coisa é porque estou fisicamente com fome.

() 2. De vez em quando como alguma coisa por impulso, mesmo quando não estou realmente com fome.

() 3. Eu tenho o hábito regular de comer alimentos que realmente não aprecio para satisfazer uma sensação de fome, mesmo que fisicamente eu não necessite de comida.

() 4. Mesmo que não esteja fisicamente com fome, tenho uma sensação de fome em minha boca que somente parece ser satisfeita quando eu como um alimento, tipo um sanduíche, que enche a minha boca. Às vezes, quando eu como o alimento para satisfazer minha “fome na boca”, em seguida eu o cuspo, assim não ganharei peso.

6

() 1. Eu não sinto qualquer culpa ou ódio de mim mesmo(a) depois de comer demais.

() 2. De vez em quando sinto culpa ou ódio de mim mesmo(a) depois de comer demais.

() 3. Quase o tempo todo sinto muita culpa ou ódio de mim mesmo(a) depois de comer demais.

7

() 1. Eu não perco o controle total da minha alimentação quando estou em dieta, mesmo após períodos em que como demais.

() 2. Às vezes, quando estou em dieta e como um alimento proibido, sinto como se tivesse estragado tudo e como ainda mais.

() 3. Frequentemente, quando como demais durante uma dieta, tenho o hábito de dizer para mim mesmo(a): “agora que estraguei tudo, porque não irei até o fim”. Quando isto acontece, eu como ainda mais.

() 4. Eu tenho o hábito regular de começar dietas rigorosas por mim mesmo(a), mas quebro as dietas entrando numa compulsão alimentar. Minha vida parece ser “uma festa” ou “um morrer de fome”.

8

() 1. Eu raramente como tanta comida a ponto de me sentir desconfortavelmente empanturrado(a) depois.

() 2. Normalmente, cerca de uma vez por mês, como uma tal quantidade de comida que acabo me sentindo muito empanturrado(a).

() 3. Eu tenho períodos regulares durante o mês, quando como grandes quantidades de comida, seja na hora das refeições, seja nos lanches.

() 4. Eu como tanta comida que, regularmente, me sinto bastante desconfortável depois de comer e, algumas vezes, um pouco enjoado(a).

9

() 1. Em geral, minha ingesta calórica não sobe a níveis muito altos, nem desce a níveis muito baixos.

() 2. Às vezes, depois de comer demais, tento reduzir minha ingesta calórica para quase nada, para compensar o excesso de calorias que ingeri.

() 3. Eu tenho o hábito regular de comer demais durante a noite. Parece que a minha rotina não é estar com fome de manhã, mas comer demais à noite.

() 4. Na minha vida adulta tenho tido períodos, que duram semanas, nos quais praticamente me mato de fome. Isto se segue a períodos em que como demais. Parece que vivo uma vida de “festa” ou de “morrer de fome”.

#10

- () 1. Normalmente eu sou capaz de parar de comer quando quero. Eu sei quando “já chega”.
- () 2. De vez em quando, eu tenho uma compulsão para comer que parece que não posso controlar.
- () 3. Frequentemente tenho fortes impulsos para comer que parece que não sou capaz de controlar, mas, em outras ocasiões, posso controlar meus impulsos para comer.
- () 4. Eu me sinto incapaz de controlar impulsos para comer. Eu tenho medo de não ser capaz de parar de comer por vontade própria.

#11

- () 1. Eu não tenho problema algum para parar de comer quando me sinto cheio(a).
- () 2. Eu, normalmente, posso parar de comer quando me sinto cheio(a) mas, de vez em quando, comer demais me deixa desconfortavelmente empanturrado(a).
- () 3. Eu tenho um problema para parar de comer uma vez que eu tenha começado e, normalmente, sinto-me desconfortavelmente empanturrado(a) depois que faço uma refeição.
- () 4. Por eu ter o problema de não ser capaz de parar de comer quando quero, às vezes tenho que provocar o vômito, usar laxativos e/ou diuréticos para aliviar minha sensação de empanturramento.

#12

- () 1. Parece que eu como tanto quando estou com os outros (reuniões familiares, sociais), como quando estou sozinho(a).
- () 2. Às vezes, quando eu estou com outras pessoas, não como tanto quanto eu quero comer porque me sinto constrangido(a) com o meu comportamento alimentar.
- () 3. Frequentemente eu como só uma pequena quantidade de comida quando outros estão presentes, pois me sinto muito embaraçado(a) com o meu comportamento alimentar.
- () 4. Eu me sinto tão envergonhado(a) por comer demais que escolho horas para comer demais quando sei que ninguém me verá. Eu me sinto como uma pessoa que se esconde para comer.

#13

- () 1. Eu faço três refeições ao dia com apenas um lanche ocasional entre as refeições.
- () 2. Eu faço três refeições ao dia mas, normalmente, também lanchinho entre as refeições.
- () 3. Quando eu faço lanches pesados, tenho o hábito de pular as refeições regulares.
- () 4. Há períodos regulares em que parece que eu estou continuamente comendo, sem refeições planejadas.

#14

- () 1. Eu não penso muito em tentar controlar impulsos indesejáveis para comer.
- () 2. Pelo menos, em algum momento, sinto que meus pensamentos estão “preocupados” com tentar controlar meus impulsos para comer.
- () 3. Frequentemente, sinto que gasto muito tempo pensando no quanto comi ou tentando não comer mais.
- () 4. Parece, para mim, que a maior parte das horas que passo acordado(a) estão “preocupadas” por pensamentos sobre comer ou não comer. Sinto como se eu estivesse constantemente lutando para não comer.

#15

- () 1. Eu não penso muito sobre comida.
- () 2. Eu tenho fortes desejos por comida, mas eles só duram curtos períodos de tempo.
- () 3. Há dias em que parece que eu não posso pensar em mais nada a não ser comida.
- () 4. Na maioria dos dias, meus pensamentos parecem estar “preocupados” com comida. Sinto como se eu vivesse para comer.

() 1. Eu normalmente sei se estou ou não fisicamente com fome. Eu como a porção certa de comida para me satisfazer.

() 2. De vez em quando eu me sinto em dúvida para saber se estou ou não fisicamente com fome. Nessas ocasiões é difícil saber quanto eu deveria comer para me satisfazer.

() 3. Mesmo que se eu pudesse saber quantas calorias eu deveria ingerir, não teria ideia alguma de qual seria a quantidade “normal” de comida para mim.

[illegible]

ANEXO B. Protocolo para coleta de amostra de saliva Oragene DNA G-500®

INSTRUÇÕES DE USO

Leia todas as instruções antes da coleta

Precauções durante a coleta:

NÃO coma, beba, fume ou masque chiclete por 30 minutos antes de fornecer a amostra de saliva.

NÃO remova o filme plástico da tampa do funil.

Aplicação: Para a coleta de DNA humano em amostras de saliva.

Conteúdo: O kit contém líquido estabilizante.

Avisos e precauções: Se o líquido estabilizante entrar em contato com a pele ou com os olhos, lave-os com água. Não ingerir. Veja MSDS em www.dnagenotek.com.

Tampa pequena, perigo de asfixia.

Armazenamento: 15°C / 30°C

Resumo e explicação do kit:

Oragene-DNA é um kit de auto-coleta que proporciona os materiais e as instruções para a coleta e estabilização de espécimes de saliva.

Legenda de embalagem:

- Consulte o guia da embalagem
- Coletar a saliva até (usar até)
- Dispositivo médico de diagnóstico in-vitro
- Número de catálogo
- Marcação CE
- Cuidado, consulte instruções de uso
- Instruções de armazenamento
- Representante autorizado
- Fabricante

Procedimento:

A maioria das pessoas leva de 2 a 5 minutos para fornecer uma amostra de saliva seguindo as etapas 1 a 5.

- 1 Cuspa no funil até a quantidade de saliva líquida (não as bolhas) alcançar o nível de enchimento exibido na figura nº 1.

- 2 Segure o tubo na vertical com uma mão. Feche a tampa com a outra mão (conforme mostrado) empurrando a tampa firmemente até ouvir um forte estalo. O líquido na tampa será liberado no tubo para se misturar à saliva. Certifique-se de que a tampa está completamente fechada.

- 3 Segure o tubo na vertical. Desenroscar o funil do tubo.

- 4 Use a tampa pequena para fechar o tubo.

- 5 Agite o tubo tampado por 5 segundos. Descarte ou recicle o funil.

Para uso de diagnóstico in-vitro

DNAGENOTEK

Fabricado no Canadá
DNA Genotek Inc.
Ottawa, ON, Canadá K2K 1L1

*Amostras superiores
Desempenho comprovado*

Tel: 613.723.5757
Info@dnagenotek.com
www.dnagenotek.com

Emergo Europe, Molenstraat 15, 2513 BH The Hague, Holanda
Tel: (+31) (0) 70 345-8570 Fax: (+31) (0) 70 346-7299

Oragene®DNA não está à venda nos Estados Unidos.

*Oragene é uma marca comercial registrada da DNA Genotek Inc.

É possível que alguns produtos da DNA Genotek não estejam disponíveis em todas as regiões geográficas.

Para obter detalhes, entre em contato com o seu representante de vendas.

Todos os protocolos, artigos científicos e notas de aplicação da DNA Genotek estão disponíveis na seção de suporte em nosso site www.dnagenotek.com.

Patente (www.dnagenotek.com/legal/notices)

© 2013 DNA Genotek Inc., uma subsidiária da OraSure Technologies, Inc. Todos os direitos reservados.
PD-PR-00298 (BZ - Portuguese) Issue 1/2013-01

ANEXO C, Tabela 21

Tabela 21 - Comparação entre os dados antropométricos, metabólicos e consumo alimentar segundo a presença ou não dos diplótipos **AT_GT** e **GC_GT** no grupo obeso

Variáveis	AT_GT	outros	p	GC_GT	outros	p
Z-IMC	3,33 ± 0,51	3,26 ± 0,57	0,496	3,2 ± 0,59	3,28 ± 0,57	0,611
RCE	0,64 (0,59 - 0,69)	0,65 (0,61 - 0,71)	0,333	0,65 (0,62 - 0,73)	0,65 (0,61 - 0,71)	0,424
Estatura	77 (33 - 93)	78 (50 - 93)	0,547	73 (46 - 89)	78 (49 - 94)	0,388
PAS	82 (63 - 93)	79 (57 - 90)	0,358	83 (62 - 95)	79 (57 - 90)	0,104
PAD	71 (52 - 87)	63 (46 - 79)	0,122	67 (49 - 83)	64 (46 - 79)	0,514
FC	85,3 ± 13,5	82,5 ± 13,3	0,255	83 ± 12	83 ± 13	0,852
MG (%)	39,5 ± 6,2	39,9 ± 6,4	0,743	39,9 ± 8,2	39,8 ± 6,1	0,960
ECAP	17,2 ± 7,0	17,4 ± 8,6	0,867	17,9 ± 8,8	17,3 ± 8,4	0,719
Acido úrico	5,2 ± 1,3	5,6 ± 1,3	0,063	5,6 ± 1,3	5,5 ± 1,3	0,832
ALT (U/L)	18 (15 - 23)	20 (16 - 28)	0,197	18 (15 - 26)	20 (16 - 28)	0,524
AST (U/L)	19 (17 - 24)	21 (19 - 26)	0,022	22 (18 - 27)	21 (18 - 26)	0,929
Glicose	79 ± 9	80 ± 10	0,425	81 ± 13	80 ± 10	0,599
Insulina	20 (13 - 30)	22 (15 - 33)	0,272	27 (13 - 41)	21 (15 - 32)	0,252
HOMA-IR	4,1 (2,3 - 5,7)	4,2 (2,9 - 6,5)	0,225	4,4 (2,6 - 8,8)	4,1 (2,8 - 6,4)	0,311
CT	165 ± 29	167 ± 33	0,627	175 ± 43	166 ± 31,6	0,107
LDL-c	97 (77 - 120)	99 (83 - 119)	0,648	104 (78 - 125)	99 (83 - 118)	0,388
HDL-c	43 (37 - 50)	42 (37 - 49)	0,926	40 (65 - 50)	43 (38 - 49)	0,377
Leptina	42 (34 - 64)	48 (34 - 66)	0,345	55 (38 - 67)	47 (34 - 66)	0,447
Leptina Ajustada	1,57 ± 0,56	1,48 ± 0,6	0,402	1,6 ± 0,6	1,47 ± 0,7	0,264
TG	107 (68 - 139)	103 (76 - 139)	0,808	121 (73 - 160)	102 (76 - 50)	0,319
Energia	1992 ± 608	2026 ± 789	0,810	2307 ± 854	2005 ± 765	0,236
CM (%)	14 (3 - 19)	10 (0 - 18)	0,328	15 (0 - 25)	10 (0 - 18)	0,740
AL (%)	34,3 ± 18	31,2 ± 14	0,445	31,1 ± 14,8	31,5 ± 14,4	0,917
JT (%)	30,3 ± 12,7	30,3 ± 15	0,985	32,4 ± 10	30,1 ± 15	0,463
PTN (%)	19,3 ± 8	17,6 ± 6	0,228	19 ± 4,6	17,7 ± 6,2	0,312
CHO (%)	50,2 ± 9,8	51,6 ± 8,8	0,529	48,4 ± 8	51,7 ± 9	0,160
GT (%)	30,6 ± 6,4	30,6 ± 7	0,970	32,5 ± 8	30,5 ± 6,9	0,388
GS (%)	11,1 ± 3,5	10,7 ± 3	0,622	11,7 ± 3	10,7 ± 3	0,281
GM (%)	8,8 ± 2,4	9,4 ± 2,9	0,340	10,4 ± 3,7	9,3 ± 2,8	0,168
GP (%)	6,7 ± 2,2	7 ± 2,6	0,482	7 ± 2,6	7 ± 2,5	0,964
Colesterol	227 (189 - 321)	251 (156 - 381)	0,783	265 (185 - 409)	247 (155 - 379)	0,476
Fibras (g)	18 (10 - 27)	17 (12 - 25)	0,979	19 (13 - 23)	17 (11 - 25)	0,882

Dados com distribuição paramétrica apresentados em média e desvio padrão, comparados por teste T de Student. Dados com distribuição não paramétrica apresentados em mediana e P₂₅-P₇₅, comparados por teste de Mann Whitney-U.

RCE: relação cintura-estatura; PAS: pressão arterial sistólica, percentil; PAD: pressão arterial diastólica, percentil; FC: frequência cardíaca; MG: massa gorda; ECAP: escala de compulsão alimentar periódica; ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; CT: colesterol total; LDL-c: LDL colesterol; HDL-c: HDL colesterol; TG: triglicérides; CM: café da manhã; AL: almoço; JT: jantar; PTN: proteína; CHO: carboidrato; GT: gordura total; GS: gordura saturada; GM: gordura monoinsaturada; GP: gordura poli-insaturada.

ANEXO D, Tabela 22

Tabela 22 - Comparação entre os dados antropométricos, metabólicos e consumo alimentar segundo a presença ou não dos diplótipos GT_GT e AC_GT no grupo obeso

Variáveis	GT_GT	outros	p	AC_GT	outros	p
Z-IMC	3,27 ± 0,59	3,27 ± 0,55	0,872	3,22 ± 0,55	3,29 ± 0,58	0,297
RCE	0,66 (0,61 - 0,72)	0,65 (0,61 - 0,70)	0,504	0,64 (0,61 - 0,70)	0,66 (0,61 - 0,72)	0,109
Estatura	76 (52 - 92)	77 (46 - 93)	0,609	78 (48 - 94)	77 (49 - 92)	0,645
PAS	76 (57 - 89)	81 (59 - 92)	0,206	77 (54 - 90)	90(59 - 90)	0,310
PAD	62 (46 - 78)	67 (46 - 82)	0,281	61 (45 - 79)	65 (46 - 80)	0,600
FC	81 ± 13	84 ± 14	0,038	82 ± 13	85 ± 14	0,108
MG (%)	39,8 ± 5,9	39,9 ± 6,8	0,866	40 ± 6,2	40 ± 6,4	0,615
ECAP	17,3 ± 8,4	17,5 ± 8,5	0,851	17,3 ± 8,7	17,4 ± 8,3	0,847
Ac. úrico	5,6 ± 1,3	5,5 ± 1,3	0,896	5,7 ± 1,3	5,5 ± 1,3	0,223
ALT (U/L)	20 (15 - 28)	19 (16 - 27)	0,206	20 (16 - 28)	20(15 - 28)	0,268
AST (U/L)	21 (19 - 26)	22 (18 - 26)	0,261	22 (19 - 26)	21 (18 - 26)	0,523
Glicose	80 ± 9	80 ± 11	0,666	167 ± 32	167 ± 33	0,577
Insulina	21 (16 - 33)	22 (14 - 32)	0,492	21 (14 - 31)	21 (15 - 35)	0,227
HOMA-IR	4,3 (3,0 - 6,5)	4,1 (3,7 - 6,4)	0,573	4,1 (2,6 - 6,2)	4,2 (2,9 - 6,5)	0,329
CT	165 ± 32	170 ± 4	0,117	167 ± 32	167 ± 33	0,943
LDL-c	99 (83 - 119)	99 (84 - 119)	0,491	98 (84 - 114)	99 (83 - 121)	0,495
HDL-c	43 (38 - 49)	42 (37 - 49)	0,767	42 (37 - 49)	42 (37 - 49)	0,949
Leptina	48 (32 - 67)	47 (34 - 66)	0,575	45 (30 - 61)	48 (35 - 67)	0,106
Leptina Ajustada	1,5 ± 0,64	1,5 ± 0,67	0,676	1,42 ± 0,75	1,51 ± 0,62	0,380
TG	96 (76 - 129)	109 (76 - 149)	0,038	111 (78 - 146)	100 (75 - 136)	0,107
Energia	1968 ± 783	2081 ± 760	0,286	2113 ± 784	1992 ± 768	0,325
CM (%)	9 (0 - 18)	12 (0 - 19)	0,195	10 (0 - 18)	10 (0 - 19)	0,996
AL (%)	31,8 ± 15,5	31,1 ± 13,2	0,740	28,9 ± 11	32,36 ± 15	0,082
JT (%)	29,7 ± 15,35	30,8 ± 13,5	0,590	31 ± 13	30 ± 15	0,678
PTN (%)	17,8 ± 6,3	17,8 ± 5,9	0,985	16,5 ± 5	18,2 ± 6,4	0,070
CHO (%)	51,2 ± 9,1	51,8 ± 8,6	0,614	53 ± 8,8	51 ± 8,8	0,086
GT (%)	31 ± 7,6	31,2 ± 6,3	0,391	30 ± 5,9	30,8 ± 7,3	0,402
GS (%)	10,7 ± 3	10,8 ± 3	0,912	10,6 ± 3	10,8 ± 3	0,561
GM (%)	6,6 ± 3	9 ± 2,7	0,169	9 ± 2,7	9,4 ± 3	0,332
GP (%)	7,1 ± 2,7	6,8 ± 2,4	0,304	7 ± 2,6	7 ± 2,5	0,967
Colesterol	237 (147 - 348)	254 (183 - 390)	0,597	263 (188 - 430)	236 (152 - 351)	0,221
Fibras (g)	17 (11 - 25)	18 (12 -25)	0,848	16 (12 - 23)	18 (12 - 26)	0,360

Dados com distribuição paramétrica apresentados em média e desvio padrão, comparados por teste T de Student. Dados com distribuição não paramétrica apresentados em mediana e P₂₅-P₇₅, comparados por teste de Mann Whitney-U.

RCE: relação cintura-estatura; PAS: pressão arterial sistólica, percentil; PAD: pressão arterial diastólica, percentil; FC: frequência cardíaca; MG: massa gorda; ECAP: escala de compulsão alimentar periódica; ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; CT: colesterol total; LDL-c: LDL colesterol; HDL-c: HDL colesterol; TG: triglicérides; CM: café da manhã; AL: almoço; JT: jantar; PTN: proteína; CHO: carboidrato; GT: gordura total; GS: gordura saturada; GM: gordura monoinsaturada; GP: gordura poli-insaturada.

ANEXO E, Tabela 23

Tabela 23 - Frequência dos fatores de risco cardiometabólicos e CAP segundo a presença ou não dos diplótipos no grupo obeso

Variáveis		AT_GT N (%)	outros N (%)	p	GC_GT N (%)	outros N (%)	p	GT_GT N (%)	outros N (%)	p	AC_GT N (%)	outros N (%)	p
HAS	-	24 (70,6)	284 (80,7)	0,174	27 (71,1)	281 (80,7)	0,121	162 (82,7)	146 (76,8)	0,147	77 (81,9)	231 (79,1)	0,643
	+	10 (29,4)	68 (19,3)		11 (28,9)	67 (19,3)		34 (17,3)	44 (23,2)		17 (18,1)	61 (20,9)	
Glicemia de jejum alterada	-	36 (97,3)	350 (96,7)	0,884	36 (92,3)	350 (97,2)	0,112	196 (97,5)	190 (96,0)	0,419	95 (97,9)	291 (96,4)	0,431
	+	1 (2,7)	12 (3,3)		3 (7,7)	10 (2,8)		5 (2,5)	8 (4,0)		2 (2,1)	11 (3,6)	
HDL-c baixo	-	13 (36,1)	153 (42,5)	0,415	15 (37,5)	151 (42,4)	0,537	85 (42,7)	81 (41,1)	0,827	42 (43,8)	124 (41,3)	0,646
	+	23 (63,9)	207 (57,5)		25 (62,5)	205 (57,6)		114 (57,3)	116 (58,9)		54 (56,2)	176 (58,7)	
Hipertrigliceridemia	-	27 (75,0)	227 (63,6)	0,121	19 (47,5)	235 (66,6)	0,012	138 (70,1)	116 (59,2)	0,022	53 (55,8)	201 (67,4)	0,034
	+	9 (25,0)	130 (36,4)		21 (52,5)	118 (33,4)		59 (29,9)	80 (40,8)		42 (44,2)	97 (32,6)	
CAP	-	17 (50,0)	179 (52,3)	0,937	20 (52,6)	176 (52,1)	0,889	99 (52,4)	97 (51,9)	0,808	48 (51,1)	148 (52,5)	0,538
	+	17 (50,0)	163 (47,7)		18 (47,4)	162 (49,7)		90 (47,6)	90 (48,1)		46 (48,9)	134 (47,5)	

Regressão logística ajustada para gênero, idade e Z-IMC.

ANEXO F, Tabela 24

Tabela 24 - Características antropométricas, metabólica e dados do consumo alimentar dos indivíduos portadores de variações alélicas no *MC4R*

Variáveis	rs2227616							rs138281308 rs61741820			
Sexo	F	M	F	F	M	F	F	M	F	F	M
Z-IMC (escore)	3,56	2,84	3,99	3,77	3,11	0,15	0,26	3,60	1,80	0,58	-0,90
RCE	0,67	0,61	0,85	0,68	0,64	...	...	0,64	0,56	...	...
Estatura (percentil)	89	93	17	69	84	80	80	100	94	14	15
ECAP	11	9	29	3	21	7	8	18	17	14	12
PAS (percentil)	88	86	90	92	65	...	...	71	53	...	...
PAD (percentil)	36	46	70	65	86	...	...	60	88	...	...
FC (bpm)	79	83	74	94	...	...	...	77	97	...	...
MG (%)	41	30	44	38	41	...	...	42	30	...	...
Ácido úrico (mg/dL)	6	6,8	5,1	4,3	6,6	...	...	4,5	4,6	...	...
ALT (U/L)	14	19	21	16	22	...	...	19	12	...	...
AST (U/L)	18	29	18	20	19	...	...	22	20	...	...
Glicose (mg/dL)	84	64	78	78	88	...	...	81	83	...	...
Insulina (µU/mL)	17,1	10,9	52,5	6,6	29,9	...	...	23,5	8,2	...	...
HOMA-IR	3,55	1,72	10,11	1,27	6,50	...	...	4,70	1,68	...	...
CT(mg/dL)	176	200	201	191	155	...	...	116	165	...	...
HDL-c (mg/dL)	47	35	31	59	48	...	...	37	39	...	...
LDL-c (mg/dL)	98	119	136	111	91	...	...	67	104	...	...
Leptina (ng/mL)	10,9	31,4	98,5	61,1	33,2	...	...	38,9	10,9	...	...
TG (mg/dL)	156	228	169	104	82	...	...	60	108	...	...
Energia (kcal)	...	...	...	1718	2594	2266	2101	...	2336	1865	1600
CM (%)	...	...	...	14,4	24,9	9,1	34,1	...	11,8	13,8	9,1
Almoço (%)	...	...	...	16,9	0,0	42,3	9,9	...	19,1	16,8	22,1
Jantar (%)	...	...	...	27,0	22,9	22,4	32,3	...	11,1	8,4	33,1
PTN (%)	...	...	...	11,0	13,6	13,5	16,5	...	10,6	11,3	23,1
CHO(%)	...	...	...	57,1	55,8	64,4	49,0	...	47,2	47,0	45,2
GT (%)	...	...	...	31,9	30,5	22,0	34,5	...	42,2	41,7	31,8
Colesterol (mg)	...	...	...	323,2	190,4	89,6	413,4	...	69,8	122,2	221,3
GS(%)	...	...	...	9,4	13,4	7,5	17,6	...	15,1	15,8	10,9
GM (%)	...	...	...	8,8	4,4	5,3	3,4	...	5,2	6,1	9,6
GP (%)	...	...	...	8,0	9,7	6,1	9,9	...	13,8	13,4	8,8
Fibras (g)	...	...	...	23,0	27,1	33,1	16,5	...	14,2	18,7	17,4

Continua...

Continuação da Tabela 24

Variáveis	rs2229616 rs61741819	rs61741819	rs61741819 (homozigoto)	CM003759	CM061845	rs52804924
Sexo	F	M	F	F	M	M
Z-IMC (escore)	3,97	2,45	-0,52	2,16	2,69	3,50
RCE	...	0,61	...	0,57	0,62	...
Estatura (percentil)	7	94	8	86	70	26
ECAP	11	3	9	20	9	1
PAS (percentil)	...	71	...	9	83	...
PAD (percentil)	...	59	...	16	59	...
FC (bpm)	...	70	...	72	68	...
MG (%)	43	39	...	39	39	60
Ácido úrico (mg/dL)	6,5	5,2	...	4,9	6	3,4
ALT (U/L)	39	13	...	14	17	41
AST (U/L)	22	21	...	17	24	20
Glicose (mg/dL)	81	75	...	53	82	78
Insulina (μU/mL)	17,0	17,5	...	22,3	40,5	51,9
HOMA-IR	...	3,24	...	2,92	8,20	...
CT(mg/dL)	172	204	...	167	202	165
HDL-c (mg/dL)	51	62	...	32	37	35
LDL-c (mg/dL)	97	126	...	122	119	103
Leptina (ng/mL)	...	30,7	...	53,1	35,1	...
TG (mg/dL)	118	81	...	63	312	135
Energia (kcal)	1956	1912	1411	2732	...	...
CM (%)	0,0	14,8	25,1	4,5	...	...
Almoço (%)	27,3	20,9	25,8	29,7	...	...
Jantar (%)	17,2	6,7	25,8	5,3	...	...
PTN (%)	32,5	12,6	16,4	19,4	...	...
CHO(%)	43,1	64,5	53,7	43,4	...	...
GT (%)	24,5	23,0	29,9	37,2	...	...
Colesterol (%)	1694,9	131,3	121,7	843,9	...	...
GS (%)	10,2	10,2	10,8	16,8	...	...
GM(%)	5,8	4,9	6,5	5,8	...	...
GP (%)	6,4	5,7	9,6	11,3	...	...
Fibras (g)	13,6	10,0	13,7	15,5	...	...

Continua...

Conclusão da tabela 24

Variáveis	rs52820871		Asn72Ser	COSM1611328	rs145765578	rs150448918
Sexo	F	F	F	F	F	M
Z-IMC (escore)	2,84	-1,33	3,55	0,65	3,02	-1,28
RCE	0,66	...	0,74	...	0,65	...
Estatura (percentil)	9	55	71	66	81	8
ECAP	...	6	32	10	13	12
PAS (percentil)	46	...	83	...	50	...
PAD (percentil)	6	...	84	...	44	...
FC (bpm)	104	...	86	...	73	...
MG (%)	39	...	51	...	50	...
Ácido úrico (mg/dL)	8	...	5,7	...	4,5	...
ALT (U/L)	24	...	81	...	12	...
AST (U/L)	27	...	60	...	23	...
Glicose (mg/dL)	72	...	87	...	70	...
Insulina (µU/mL)	31,7	...	10,7	...	7,6	...
HOMA-IR	5,64	...	2,30	...	1,31	...
CT(mg/dL)	190	...	169	...	139	...
HDL-c (mg/dL)	38	...	46	...	44	...
LDL-c (mg/dL)	133	...	100	...	83	...
Leptina (ng/mL)	27,4	...	88,4	...	67,5	...
TG (mg/dL)	93	...	113	...	61	...
Energia (kcal)	1784	1383	2311	2683	...	3359
CM (%)	15,9	9,1	0,0	16,4	...	22,0
Almoço (%)	26,4	26,2	23,5	36,5	...	9,3
Jantar (%)	0,0	48,6	24,1	16,4	...	23,5
PTN (%)	23,5	16,1	12,5	21,2	...	15,3
CHO(%)	44,6	43,5	52,1	42,9	...	52,4
GT (%)	31,9	40,5	35,4	35,9	...	32,3
Colesterol (mg)	270,5	159,5	27,4	506,0	...	554,7
GS (%)	11,4	13,5	10,2	11,6	...	12,6
GM(%)	8,5	7,1	11,5	7,9	...	5,1
GP (%)	9,4	13,4	9,9	11,3	...	9,7
Fibras (g)	9,7	5,9	52,9	22,5	...	15,6

ECAP: escala de compulsão alimentar periódica; RCE: relação cintura-estatura; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; FC: frequência cardíaca; ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; MG: massa gorda; HDL-c: HDL colesterol; LDL-c: LDL colesterol; CM: café da manhã; TG: triglicérides; PTN: proteína; CHO: carboidrato; GT: gordura total; GS: gordura saturada; GM gordura monoinsaturada; GP: gordura poli-insaturada.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. World Health Organ Tech Rep Ser. 2000;894:i-xii, 1-253.
2. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística I. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil. Rio de Janeiro 2010.
3. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. World Health Organ Tech Rep Ser. 1995;854:1-452.
4. de Onis M, Onyango AW, Borghi E, Siyam A, Nishida C, Siekmann J. Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. Bull World Health Organ. 2007;85(9):660-7.
5. Schonfeld-Warden N, Warden CH. Pediatric obesity. An overview of etiology and treatment. Pediatr Clin North Am. 1997;44(2):339-61.
6. Knuth AG, Hallal PC. Temporal trends in physical activity: a systematic review. J Phys Act Health. 2009;6(5):548-59.
7. Bray G, Bouchard C. Genetics of human obesity: research directions. FASEB J. 1997;11(12):937-45.
8. Bouchard C, Tremblay A. Genetic influences on the response of body fat and fat distribution to positive and negative energy balances in human identical twins. J Nutr. 1997;127(5 Suppl):943S-7S.
9. Daniels SR, Khoury PR, Morrison JA. The utility of body mass index as a measure of body fatness in children and adolescents: differences by race and gender. Pediatrics. 1997;99(6):804-7.
10. Marques-Lopes I, Marti A, Moreno-Aliaga MJ, Martinez A. Aspectos genéticos da obesidade. Revista de Nutrição. 2004;17(3):327-38.
11. Must A, Jacques PF, Dallal GE, Bajema CJ, Dietz WH. Long-term morbidity and mortality of overweight adolescents. A follow-up of the Harvard Growth Study of 1922 to 1935. N Engl J Med. 1992;327(19):1350-5.
12. Dietz WH. Health consequences of obesity in youth: childhood predictors of adult disease. Pediatrics. 1998;101(3 Pt 2):518-25.
13. Spitzer RL, Yanovski S, Wadden T, Wing R, Marcus MD, Stunkard A, et al. Binge eating disorder: its further validation in a multisite study. Int J Eat Disord. 1993;13(2):137-53.
14. Spitzer RL, Devlin M, Walsh BT, Hasin D. Binge eating disorder: A multisite field trial of the diagnostic criteria. International Journal of Eating Disorders. 1992;11(3):191-203.
15. Association AP. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. DSM-5. Washington, DC 2013.
16. Goldfein JA, Walsh BT, LaChaussee JL, Kissileff HR, Devlin MJ. Eating behavior in binge eating disorder. Int J Eat Disord. 1993;14(4):427-31.
17. Lourenço BH, Arthur T, Rodrigues MD, Guazzelli I, Frazzatto E, Deram S, et al. Binge eating symptoms, diet composition and metabolic characteristics of obese children and adolescents. Appetite. 2008;50(2-3):223-30.
18. Coutinho W. Estudo da compulsão alimentar periódica em pacientes que procuram tratamento médico para emagrecer. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2000.
19. Lenard NR, Berthoud HR. Central and peripheral regulation of food intake

- and physical activity: pathways and genes. *Obesity* (Silver Spring). 2008;16 Suppl 3:S11-22.
20. Venner AA, Lyon ME, Doyle-Baker PK. Leptin: a potential biomarker for childhood obesity? *Clin Biochem*. 2006;39(11):1047-56.
 21. Drewnowski A. Taste preferences and food intake. *Annu Rev Nutr*. 1997;17:237-53.
 22. Faith MS, Rhea SA, Corley RP, Hewitt JK. Genetic and shared environmental influences on children's 24-h food and beverage intake: sex differences at age 7 y. *Am J Clin Nutr*. 2008;87(4):903-11.
 23. Bauer F, Elbers CC, Adan RA, Loos RJ, Onland-Moret NC, Grobbee DE, et al. Obesity genes identified in genome-wide association studies are associated with adiposity measures and potentially with nutrient-specific food preference. *Am J Clin Nutr*. 2009;90(4):951-9.
 24. Timpson NJ, Emmett PM, Frayling TM, Rogers I, Hattersley AT, McCarthy MI, et al. The fat mass- and obesity-associated locus and dietary intake in children. *Am J Clin Nutr*. 2008;88(4):971-8.
 25. Memisoglu A, Hu FB, Hankinson SE, Manson JE, De Vivo I, Willett WC, et al. Interaction between a peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene polymorphism and dietary fat intake in relation to body mass. *Hum Mol Genet*. 2003;12(22):2923-9.
 26. Qi L, Kraft P, Hunter DJ, Hu FB. The common obesity variant near MC4R gene is associated with higher intakes of total energy and dietary fat, weight change and diabetes risk in women. *Hum Mol Genet*. 2008;17(22):3502-8.
 27. Martínez JA, Corbalán MS, Sánchez-Villegas A, Forga L, Martí A, Martínez-González MA. Obesity risk is associated with carbohydrate intake in women carrying the Gln27Glu beta2-adrenoceptor polymorphism. *J Nutr*. 2003;133(8):2549-54.
 28. Young EH, Wareham NJ, Farooqi S, Hinney A, Hebebrand J, Scherag A, et al. The V103I polymorphism of the MC4R gene and obesity: population based studies and meta-analysis of 29 563 individuals. *Int J Obes (Lond)*. 2007;31(9):1437-41.
 29. Veloso LA. O controle hipotalâmico da fome e da termogênese - implicações no desenvolvimento da obesidade. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia*. 2006;50(2):165-76.
 30. Millington GW. The role of proopiomelanocortin (POMC) neurones in feeding behaviour. *Nutr Metab (Lond)*. 2007;4:18.
 31. Pritchard LE, Turnbull AV, White A. Pro-opiomelanocortin processing in the hypothalamus: impact on melanocortin signalling and obesity. *J Endocrinol*. 2002;172(3):411-21.
 32. Rodrigues AM, Suplicy HL, Radominski RB. Controle Neuroendócrino do Peso Corporal: Implicações na Gênese da Obesidade. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*. 2003;47(4):398-409.
 33. Barsh GS, Schwartz MW. Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration. *Nat Rev Genet*. 2002;3(8):589-600.
 34. York DA. Peripheral and central mechanisms regulating food intake and macronutrient selection. *Obes Surg*. 1999;9(5):471-9.
 35. Bray GA. Afferent signals regulating food intake. *Proc Nutr Soc*. 2000;59(3):373-84.
 36. Berthoud HR. Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neurosci Biobehav Rev*. 2002;26(4):393-428.
 37. Hagan MM, Rushing PA, Benoit SC, Woods SC, Seeley RJ. Opioid receptor involvement in the effect of AgRP- (83-132) on food intake and food selection. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001;280(3):R814-21.
 38. Will MJ, Franzblau EB, Kelley AE. The amygdala is critical for opioid-

mediated binge eating of fat. *Neuroreport*. 2004;15(12):1857-60.

39. Lubrano-Berthelier C, Cavazos M, Le Stunff C, Haas K, Shapiro A, Zhang S, et al. The human MC4R promoter: characterization and role in obesity. *Diabetes*. 2003;52(12):2996-3000.
40. Valli-Jaakola K, Palvimo JJ, Lipsanen-Nyman M, Salomaa V, Peltonen L, Kontula K, et al. A two-base deletion -439delGC in the melanocortin-4 receptor promoter associated with early-onset obesity. *Horm Res*. 2006;66(2):61-9.
41. Loos RJ, Rankinen T, Tremblay A, Pérusse L, Chagnon Y, Bouchard C. Melanocortin-4 receptor gene and physical activity in the Québec Family Study. *Int J Obes (Lond)*. 2005;29(4):420-8.
42. Valette M, Bellisle F, Carette C, Poitou C, Dubern B, Paradis G, et al. Eating behaviour in obese patients with melanocortin-4 receptor mutations: a literature review. *Int J Obes (Lond)*. 2012.
43. Rossi M, Kim MS, Morgan DG, Small CJ, Edwards CM, Sunter D, et al. A C-terminal fragment of Agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in vivo. *Endocrinology*. 1998;139(10):4428-31.
44. Boghossian S, Park M, York DA. Melanocortin activity in the amygdala controls appetite for dietary fat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010;298(2):R385-93.
45. Vaisse C, Clement K, Durand E, Hercberg S, Guy-Grand B, Froguel P. Melanocortin-4 receptor mutations are a frequent and heterogeneous cause of morbid obesity. *J Clin Invest*. 2000;106(2):253-62.
46. Gelez H, Poirier S, Facchinetti P, Allers KA, Wayman C, Bernabé J, et al. Neuroanatomical distribution of the melanocortin-4 receptors in male and female rodent brain. *J Chem Neuroanat*. 2010;40(4):310-24.
47. Balthasar N, Dalgaard LT, Lee CE, Yu J, Funahashi H, Williams T, et al. Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure. *Cell*. 2005;123(3):493-505.
48. Rossi J, Balthasar N, Olson D, Scott M, Berglund E, Lee CE, et al. Melanocortin-4 receptors expressed by cholinergic neurons regulate energy balance and glucose homeostasis. *Cell Metab*. 2011;13(2):195-204.
49. Vaisse C, Clement K, Guy-Grand B, Froguel P. A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. *Nat Genet*. 1998;20(2):113-4.
50. Farooqi IS, Keogh JM, Yeo GS, Lank EJ, Cheetham T, O'Rahilly S. Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. *N Engl J Med*. 2003;348(12):1085-95.
51. Santoro N, Cirillo G, Xiang Z, Tanas R, Greggio N, Morino G, et al. Prevalence of pathogenetic MC4R mutations in Italian children with early onset obesity, tall stature and familial history of obesity. *BMC Med Genet*. 2009;10:25.
52. Stutzmann F, Vatin V, Cauchi S, Morandi A, Jouret B, Landt O, et al. Non-synonymous polymorphisms in melanocortin-4 receptor protect against obesity: the two facets of a Janus obesity gene. *Hum Mol Genet*. 2007;16(15):1837-44.
53. Heid IM, Vollmert C, Kronenberg F, Huth C, Ankerst DP, Luchner A, et al. Association of the MC4R V103I polymorphism with the metabolic syndrome: the KORA Study. *Obesity (Silver Spring)*. 2008;16(2):369-76.
54. Pichler M, Kollerits B, Heid IM, Hunt SC, Adams TD, Hopkins PN, et al. Association of the melanocortin-4 receptor V103I polymorphism with dietary intake in severely obese persons. *Am J Clin Nutr*. 2008;88(3):797-800.
55. Loos RJ, Lindgren CM, Li S, Wheeler E, Zhao JH, Prokopenko I, et al. Common variants near MC4R are associated with fat mass, weight and risk of obesity. *Nat Genet*. 2008;40(6):768-75.

56. Chambers JC, Elliott P, Zabaneh D, Zhang W, Li Y, Froguel P, et al. Common genetic variation near MC4R is associated with waist circumference and insulin resistance. *Nat Genet.* 2008;40(6):716-8.
57. Zobel DP, Andreasen CH, Grarup N, Eiberg H, Sørensen TI, Sandbaek A, et al. Variants near MC4R are associated with obesity and influence obesity-related quantitative traits in a population of middle-aged people: studies of 14,940 Danes. *Diabetes.* 2009;58(3):757-64.
58. Valladares M, Domínguez-Vásquez P, Obregón AM, Weisstaub G, Burrows R, Maiz A, et al. Melanocortin-4 receptor gene variants in Chilean families: association with childhood obesity and eating behavior. *Nutr Neurosci.* 2010;13(2):71-8.
59. Stutzmann F, Cauchi S, Durand E, Calvacanti-Proença C, Pigeyre M, Hartikainen AL, et al. Common genetic variation near MC4R is associated with eating behaviour patterns in European populations. *Int J Obes (Lond).* 2009;33(3):373-8.
60. Hasselbalch AL, Angquist L, Christiansen L, Heitmann BL, Kyvik KO, Sørensen TI. A variant in the fat mass and obesity-associated gene (FTO) and variants near the melanocortin-4 receptor gene (MC4R) do not influence dietary intake. *J Nutr.* 2010;140(4):831-4.
61. Ogden CL, Kuczmarski RJ, Flegal KM, Mei Z, Guo S, Wei R, et al. Centers for Disease Control and Prevention 2000 growth charts for the United States: improvements to the 1977 National Center for Health Statistics version. *Pediatrics.* 2002;109(1):45-60.
62. Cole TJ. The LMS method for constructing normalized growth standards. *Eur J Clin Nutr.* 1990;44(1):45-60.
63. NIH Consensus statement. Bioelectrical impedance analysis in body composition measurement. National Institutes of Health Technology Assessment Conference Statement. December 12-14, 1994. *Nutrition.* 1996;12(11-12):749-62.
64. Kushner RF. Bioelectrical impedance analysis: a review of principles and applications. *J Am Coll Nutr.* 1992;11(2):199-209.
65. Elia M. Body composition analysis: an evaluation of 2 component models, multicomponent models and bedside techniques. *Clin Nutr.* 1992;11(3):114-27.
66. Topouchian JA, El Assaad MA, Orobinskaia LV, El Feghali RN, Asmar RG. Validation of two devices for self-measurement of brachial blood pressure according to the International Protocol of the European Society of Hypertension: the SEINEX SE-9400 and the Microlife BP 3AC1-1. *Blood Press Monit.* 2005;10(6):325-31.
67. Thompson AM, Eguchi K, Reznik ME, Shah SS, Pickering TG. Validation of an oscillometric home blood pressure monitor in an end-stage renal disease population and the effect of arterial stiffness on its accuracy. *Blood Press Monit.* 2007;12(4):227-32.
68. The sixth report of the Joint National Committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure. *Arch Intern Med.* 1997;157(21):2413-46.
69. NationalHighBloodPressureEducationProgramWorkingGrouponHighBloodPressureinChildrenandAdolescents. The fourth report on the diagnosis, evaluation, and treatment of high blood pressure in children and adolescents. *Pediatrics.* 2004;114(2 Suppl):555-76.
70. Falkner B, Gidding SS, Portman R, Rosner B. Blood pressure variability and classification of prehypertension and hypertension in adolescence. *Pediatrics.* 2008;122(2):238-42.
71. Tanner JM. Normal growth and techniques of growth assessment. *Clin Endocrinol Metab.* 1986;15(3):411-51.

72. Genuth S, Alberti KG, Bennett P, Buse J, DeFronzo R, Kahn R, et al. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2003;26(11):3160-7.
73. Association AD. Standards of medical care in diabetes--2014. *Diabetes Care*. 2014;37 Suppl 1:S14-80.
74. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28(7):412-9.
75. Kwiterovich PO. Recognition and management of dyslipidemia in children and adolescents. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(11):4200-9.
76. Simão AF, Precoma DB, Andrade JP, Correa FH, Saraiva JF, Oliveira GM, et al. [In Process Citation]. *Arq Bras Cardiol*. 2013;101(6 Suppl 2):1-63.
77. Gormally J, Black S, Daston S, Rardin D. The assessment of binge eating severity among obese persons. *Addict Behav*. 1982;7(1):47-55.
78. Freitas S, Lopes CS, Coutinho W, Appolinario JC. Tradução e adaptação para o português da Escala de Compulsão Alimentar Periódica. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 2001;23:215-20.
79. Fisberg RM, Marchioni DML, Colucci ACA. Avaliação do consumo alimentar e da ingestão de nutrientes na prática clínica *Arq Bras Endocrinol Metab* [Internet]. 2009; 53(5):[617-24 pp.].
80. Trumbo P, Schlicker S, Yates AA, Poos M, Food and Nutrition Board of the Institute of Medicine TeNA. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. *J Am Diet Assoc*. 2002;102(11):1621-30.
81. Prevention of cardiovascular disease: Guideline for assessment and management of cardiovascular risk. In: Organization WH, editor. Geneva2007.
82. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO. 2 ed. Campinas2006.
83. U.S. Department of Agriculture USDA. Composition of Foods Raw, Processed, Prepared USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 25. Maryland2007.
84. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. World Health Organ Tech Rep Ser. 2003;916:i-viii, 1-149, backcover.
85. Pinheiro A, Lacerda A, Benzecry E, Gomes M, Costa V. Tabela para avaliação de consumo alimentar em medidas caseiras. 5 ed. São Paulo2008.
86. Fisberg R, Villar B. Manual de receitas e medidas caseiras para cálculo de inquéritos alimentares. São Paulo2002.
87. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16(3):1215.
88. Gaunt TR, Rodríguez S, Day IN. Cubic exact solutions for the estimation of pairwise haplotype frequencies: implications for linkage disequilibrium analyses and a web tool 'CubeX'. *BMC Bioinformatics*. 2007;8:428.
89. Stephens M, Donnelly P. A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am J Hum Genet*. 73. United States2003. p. 1162-9.
90. Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet*. 68. United States2001. p. 978-89.
91. Calton MA, Ersoy BA, Zhang S, Kane JP, Malloy MJ, Pullinger CR, et al. Association of functionally significant Melanocortin-4 but not Melanocortin-3 receptor mutations with severe adult obesity in a large North American case-control study. *Hum Mol Genet*. 2009;18(6):1140-7.

92. Xiang Z, Proneth B, Dirain ML, Litherland SA, Haskell-Luevano C. Pharmacological characterization of 30 human melanocortin-4 receptor polymorphisms with the endogenous proopiomelanocortin-derived agonists, synthetic agonists, and the endogenous agouti-related protein antagonist. *Biochemistry*. 2010;49(22):4583-600.
93. Hinney A, Bettecken T, Tarnow P, Brumm H, Reichwald K, Lichtner P, et al. Prevalence, spectrum, and functional characterization of melanocortin-4 receptor gene mutations in a representative population-based sample and obese adults from Germany. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(5):1761-9.
94. Stutzmann F, Tan K, Vatin V, Dina C, Jouret B, Tichet J, et al. Prevalence of melanocortin-4 receptor deficiency in Europeans and their age-dependent penetrance in multigenerational pedigrees. *Diabetes*. 2008;57(9):2511-8.
95. Lubrano-Berthelier C, Durand E, Dubern B, Shapiro A, Dazin P, Weill J, et al. Intracellular retention is a common characteristic of childhood obesity-associated MC4R mutations. *Hum Mol Genet*. 2003;12(2):145-53.
96. Pastucha D, Talafa V, Malincikova J, Cihalik C, Hyjanek J, Horakova D, et al. Obesity, hypertension and insulin resistance in childhood--a pilot study. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2010;154(1):77-81.
97. Steinberger J, Moorehead C, Katch V, Rocchini AP. Relationship between insulin resistance and abnormal lipid profile in obese adolescents. *J Pediatr*. 1995;126(5 Pt 1):690-5.
98. López-Capapé M, López-Bermejo A, Alonso Blanco M, Lara Orejas E, Corbatón Blasco J, Barrio Castellanos R. [Fatty liver disease, insulin resistance and adiponectin in an obese pediatric population]. *An Pediatr (Barc)*. 2009;71(6):495-501.
99. Jiang X, Srinivasan SR, Bao W, Berenson GS. Association of fasting insulin with longitudinal changes in blood pressure in children and adolescents. The Bogalusa Heart Study. *Am J Hypertens*. 1993;6(7 Pt 1):564-9.
100. Kennedy A, Gettys TW, Watson P, Wallace P, Ganaway E, Pan Q, et al. The metabolic significance of leptin in humans: gender-based differences in relationship to adiposity, insulin sensitivity, and energy expenditure. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(4):1293-300.
101. Sorof J, Daniels S. Obesity hypertension in children: a problem of epidemic proportions. *Hypertension*. 2002;40(4):441-7.
102. Feitosa AC, Mancini MC, Cercato C, Villares SM, Halpern A. [Metabolic profile according to leptin levels in obese patients]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2007;51(1):59-64.
103. Leoni MC, Valsecchi C, Mantelli M, Marastoni L, Tinelli C, Marchi A, et al. Impact of child obesity on adipose tissue physiology: assessment of adipocytokines and inflammatory cytokines as biomarkers of obesity. *Pediatr Rep*. 2010;2(2):e19.
104. Cohen B, Novick D, Rubinstein M. Modulation of insulin activities by leptin. *Science*. 1996;274(5290):1185-8.
105. de Courten M, Zimmet P, Hodge A, Collins V, Nicolson M, Staten M, et al. Hyperleptinaemia: the missing link in the, metabolic syndrome? *Diabet Med*. 1997;14(3):200-8.
106. Fischer S, Hanefeld M, Haffner SM, Fusch C, Schwanebeck U, Köhler C, et al. Insulin-resistant patients with type 2 diabetes mellitus have higher serum leptin levels independently of body fat mass. *Acta Diabetol*. 2002;39(3):105-10.
107. de Zwaan M. Binge eating disorder and obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2001;25 Suppl 1:S51-5.
108. Decaluwé V, Braet C, Fairburn CG. Binge eating in obese children and adolescents. *Int J Eat Disord*. 2003;33(1):78-84.
109. Petribu K, Ribeiro ES, Oliveira FM, Braz CI, Gomes ML, Araujo DE, et al.

- [Binge eating disorder in a population of morbid obese candidates to bariatric surgery at the Oswaldo Cruz University Hospital in Recife, PE]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2006;50(5):901-8.
110. Tucker LA, Seljaas GT, Hager RL. Body fat percentage of children varies according to their diet composition. *J Am Diet Assoc.* 1997;97(9):981-6.
 111. Maffei C, Pinelli L, Schutz Y. Fat intake and adiposity in 8 to 11-year-old obese children. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1996;20(2):170-4.
 112. Troiano RP, Briefel RR, Carroll MD, Bialostosky K. Energy and fat intakes of children and adolescents in the united states: data from the national health and nutrition examination surveys. *Am J Clin Nutr.* 2000;72(5 Suppl):1343S-53S.
 113. Vartanian LR, Schwartz MB, Brownell KD. Effects of soft drink consumption on nutrition and health: a systematic review and meta-analysis. *Am J Public Health.* 2007;97(4):667-75.
 114. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: Análise do Consumo Alimentar Pessoal no Brasil. Rio de Janeiro, 2011.
 115. Affenito SG, Thompson DR, Barton BA, Franko DL, Daniels SR, Obarzanek E, et al. Breakfast consumption by African-American and white adolescent girls correlates positively with calcium and fiber intake and negatively with body mass index. *J Am Diet Assoc.* 2005;105(6):938-45.
 116. Peters BS, Verly E, Marchioni DM, Fisberg M, Martini LA. The influence of breakfast and dairy products on dietary calcium and vitamin D intake in postpubertal adolescents and young adults. *J Hum Nutr Diet.* 2012;25(1):69-74.
 117. Deshmukh-Taskar PR, Radcliffe JD, Liu Y, Nicklas TA. Do breakfast skipping and breakfast type affect energy intake, nutrient intake, nutrient adequacy, and diet quality in young adults? NHANES 1999-2002. *J Am Coll Nutr.* 2010;29(4):407-18.
 118. Wang JB, Patterson RE, Ang A, Emond JA, Shetty N, Arab L. Timing of energy intake during the day is associated with the risk of obesity in adults. *J Hum Nutr Diet.* 2014;27 Suppl 2:255-62.
 119. Jakubowicz D, Barnea M, Wainstein J, Froy O. High Caloric intake at breakfast vs. dinner differentially influences weight loss of overweight and obese women. *Obesity (Silver Spring).* 2013;21(12):2504-12.
 120. Garaulet M, Gómez-Abellán P, Albuquerque-Béjar JJ, Lee YC, Ordovás JM, Scheer FA. Timing of food intake predicts weight loss effectiveness. *Int J Obes (Lond).* 2013;37(4):604-11.
 121. Garaulet M, Gómez-Abellán P. Timing of food intake and obesity: A novel association. *Physiol Behav.* 2014.
 122. Sull JW, Lee M, Jee SH. Replication of genetic effects of MC4R polymorphisms on body mass index in a Korean population. *Endocrine.* 2013.
 123. Thomsen M, Dahl M, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. β 2-adrenergic receptor Thr164Ile polymorphism, obesity, and diabetes: comparison with FTO, MC4R, and TMEM18 polymorphisms in more than 64,000 individuals. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(6):E1074-9.
 124. Han X, Luo Y, Zhang X, Lv C, Sun X, Zhou X, et al. Rs4074134 near BDNF gene is associated with type 2 diabetes mellitus in Chinese Han population independently of body mass index. *PLoS One.* 2013;8(2):e56898.
 125. Mejía-Benítez A, Klünder-Klünder M, Yengo L, Meyre D, Aradillas C, Cruz E, et al. Analysis of the contribution of FTO, NPC1, ENPP1, NEGR1, GNPDA2 and MC4R genes to obesity in Mexican children. *BMC Med Genet.* 2013;14:21.
 126. Wang J, Mei H, Chen W, Jiang Y, Sun W, Li F, et al. Study of eight GWAS-identified common variants for association with obesity-related indices in Chinese children at puberty. *Int J Obes (Lond).* 2012;36(4):542-7.
 127. Vasan SK, Fall T, Job V, Gu HF, Ingelsson E, Brismar K, et al. A common

- variant in the FTO locus is associated with waist-hip ratio in Indian adolescents. *Pediatr Obes*. 2013;8(3):e45-9.
128. Xi B, Zhao X, Shen Y, Wu L, Hotta K, Hou D, et al. Associations of obesity susceptibility loci with hypertension in Chinese children. *Int J Obes (Lond)*. 2013.
129. Tao L, Zhang Z, Chen Z, Zhou D, Li W, Kan M, et al. A Common variant near the melanocortin 4 receptor is associated with low-density lipoprotein cholesterol and total cholesterol in the Chinese Han population. *Mol Biol Rep*. 2012;39(6):6487-93.
130. Liem ET, Vonk JM, Sauer PJ, van der Steege G, Oosterom E, Stolk RP, et al. Influence of common variants near INSIG2, in FTO, and near MC4R genes on overweight and the metabolic profile in adolescence: the TRAILS (TRacking Adolescents' Individual Lives Survey) Study. *Am J Clin Nutr*. 2010;91(2):321-8.
131. Kring SI, Holst C, Toubro S, Astrup A, Hansen T, Pedersen O, et al. Common variants near MC4R in relation to body fat, body fat distribution, metabolic traits and energy expenditure. *Int J Obes (Lond)*. 2010;34(1):182-9.
132. Katsuura-Kamano S, Uemura H, Arisawa K, Yamaguchi M, Hamajima N, Wakai K, et al. A polymorphism near MC4R gene (rs17782313) is associated with serum triglyceride levels in the general Japanese population: the J-MICC Study. *Endocrine*. 2014.
133. Nogueiras R, Wiedmer P, Perez-Tilve D, Veyrat-Durebex C, Keogh JM, Sutton GM, et al. The central melanocortin system directly controls peripheral lipid metabolism. *J Clin Invest*. 2007;117(11):3475-88.
134. Branson R, Potoczna N, Kral JG, Lentz KU, Hoehe MR, Horber FF. Binge eating as a major phenotype of melanocortin 4 receptor gene mutations. *N Engl J Med*. 2003;348(12):1096-103.
135. Hebebrand J, Geller F, Dempfle A, Heinzel-Gutenbrunner M, Raab M, Gerber G, et al. Binge-eating episodes are not characteristic of carriers of melanocortin-4 receptor gene mutations. *Mol Psychiatry*. 2004;9(8):796-800.
136. Horstmann A, Kovacs P, Kabisch S, Boettcher Y, Schloegl H, Tönjes A, et al. Common genetic variation near MC4R has a sex-specific impact on human brain structure and eating behavior. *PLoS One*. 2013;8(9):e74362.
137. Yilmaz Z, Davis C, Loxton NJ, Kaplan AS, Levitan RD, Carter JC, et al. Association between MC4R rs17782313 polymorphism and overeating behaviors. *Int J Obes (Lond)*. 2014.
138. Liguori R, Labruna G, Alfieri A, Martone D, Farinero E, Contaldo F, et al. The FTO gene polymorphism (rs9939609) is associated with metabolic syndrome in morbidly obese subjects from southern Italy. *Mol Cell Probes*. 2014;28(4):195-9.
139. Dwivedi OP, Tabassum R, Chauhan G, Kaur I, Ghosh S, Marwaha RK, et al. Strong influence of variants near MC4R on adiposity in children and adults: a cross-sectional study in Indian population. *J Hum Genet*. 2013;58(1):27-32.
140. Melchior C, Schulz A, Windholz J, Kiess W, Schöneberg T, Körner A. Clinical and functional relevance of melanocortin-4 receptor variants in obese German children. *Horm Res Paediatr*. 2012;78(4):237-46.
141. Thearle MS, Muller YL, Hanson RL, Mullins M, Abdussamad M, Tran J, et al. Greater impact of melanocortin-4 receptor deficiency on rates of growth and risk of type 2 diabetes during childhood compared with adulthood in Pima Indians. *Diabetes*. 2012;61(1):250-7.
142. Miraglia Del Giudice E, Cirillo G, Nigro V, Santoro N, D'Urso L, Raimondo P, et al. Low frequency of melanocortin-4 receptor (MC4R) mutations in a Mediterranean population with early-onset obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2002;26(5):647-51.
143. Gu W, Tu Z, Kleyn PW, Kissebah A, Duprat L, Lee J, et al. Identification and functional analysis of novel human melanocortin-4 receptor variants. *Diabetes*.

1999;48(3):635-9.

144. Geller F, Reichwald K, Dempfle A, Illig T, Vollmert C, Herpertz S, et al. Melanocortin-4 receptor gene variant I103 is negatively associated with obesity. *Am J Hum Genet.* 2004;74(3):572-81.

145. Hinney A, Hohmann S, Geller F, Vogel C, Hess C, Wermter AK, et al. Melanocortin-4 receptor gene: case-control study and transmission disequilibrium test confirm that functionally relevant mutations are compatible with a major gene effect for extreme obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(9):4258-67.

146. Brönner G, Sattler AM, Hinney A, Soufi M, Geller F, Schäfer H, et al. The 103I variant of the melanocortin 4 receptor is associated with low serum triglyceride levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(2):535-8.

147. Rutanen J, Pihlajamäki J, Karhapää P, Vauhkonen I, Kuusisto J, Moilanen Mykkänen L, et al. The Val103Ile polymorphism of melanocortin-4 receptor regulates energy expenditure and weight gain. *Obes Res.* 2004;12(7):1060-6.

148. Jacobson P, Ukkola O, Rankinen T, Snyder EE, Leon AS, Rao DC, et al. Melanocortin 4 receptor sequence variations are seldom a cause of human obesity: the Swedish Obese Subjects, the HERITAGE Family Study, and a Memphis cohort. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(10):4442-6.