THAIS ARTHUR

**Influência de variantes no gene do receptor secretagogo do
hormônio do crescimento (*GHSR*) na obesidade e no risco de
compulsão alimentar e síndrome metabólica 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

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Mara Ferreira Villares

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Arthur, Thaís

Influência de variantes no gene do receptor secretagogo do hormônio do crescimento (*GHSR*) na obesidade e no risco de compulsão alimentar e síndrome metabólica em crianças e adolescentes obesos / Thaís Arthur. -- São Paulo, 2012.

**DISSERTAÇÃO(MESTRADO)--FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO.**

Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Sandra Mara Ferreira Villares.

Descritores: 1.Receptores de grelina 2.Genética 3.Obesidade 4.Criança
5.Adolescente 6.Comportamento alimentar

USP/FM/DBD-325/12

Dedico este trabalho ao meu marido William
que me acompanhou intensamente nesta jornada.

E aos meus pais, Maria do Carmo e Alcides,
pelo incentivo e apoio em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora, Dra Sandra Mara Ferreira Villares pela oportunidade e por ter tornado a experiência do mestrado possível. Agradeço pela companhia, palavras, ensinamentos e amizade nestes oito anos de convivência, desde o início como estagiária de nutrição no ambulatório de obesidade infantil. Dias intensos com muito trabalho, passeios, viagens, almoços, cafés... enfim, uma companhia muito agradável e carinhosa. Muito obrigada!

A Eliana e a Isabel sempre companheiras, presentes em todos os momentos do desenvolvimento do trabalho e em vários momentos de minha vida, preparo do casamento, casamento, reforma, casa nova.

Eli, obrigada por ser uma grande amiga, muito atenciosa e preocupada com todos, sempre presente e disposta para me ajudar e me aconselhar.

Bel, obrigada pela grande ajuda no ambulatório e pela grande prática em tornar as coisas mais tranquilas e simples de serem realizadas, sempre me deixando calma e confiante, grande amiga.

Pai e mãe, agradeço por terem me criado sempre confiante e sempre permitindo que eu buscasse meus sonhos e apoiando para que estes se tornassem possíveis.

Thali, querida irmã! Muito obrigada pelos conselhos e pelo convívio na área acadêmica.

Família: obrigada pelo amor, carinho, cuidado, atenção e incentivo para que eu pudesse me tornar uma pessoa melhor a cada dia.

Will (amor), o que dizer? Meus olhos enchem de lágrimas de alegria... obrigada por fazer parte da minha vida! Por estar sempre do meu lado, me apoiando, me ajudando, me aconselhando e me dando carinho. Te amo!

Mari, sempre amiga e alegre. Obrigada por me apresentar os caminhos da nutrição, sempre me aconselhando e ajudando em vários momentos de trabalho e da vida. Querida comadre!

Sophie, amiga e nutricionista. Obrigada pelas dicas e ajuda nos trabalhos, sempre disponível para ajudar e conversar.

Mara, mais uma nutricionista para meu convívio, trocando experiências e sempre alegre e disposta a ajudar.

Simone, estagiária e amiga. Obrigada pelas conversas, passeios, carinho e amizade.

Chris, sempre amiga. Obrigada pela ajuda no trabalho e por ser sempre esta pessoa meiga, carinhosa e companheira.

Heidi, amigaaa.. obrigada por ser esta pessoa sempre feliz e confiante no tratamento da obesidade infantil.

Agradeço a todas as estagiárias de nutrição, que passaram pelo ambulatório e pela Liga de obesidade infantil desde 2004... desde a época que também era estagiária. Algumas já são amigas nutricionistas e todas contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho e para minha formação. Todas já fazem parte do meu caminho profissional.

Agradeço a todos da disciplina de endocrinologia, do LIM-25 e do grupo de obesidade pelo convívio, pela ajuda no desenvolvimento do trabalho, pelas oportunidades e por compartilhar bons momentos.

A todos os amigos de infância, de Piracicaba, da FSP-USP que sempre me acompanharam. Obrigada amigos por fazerem parte da minha vida.

Agradeço às crianças do ambulatório de obesidade que permitiram este estudo e tornou meu aprendizado cada dia mais rico.

Agradeço a FAPESP e a CAPES pelo auxílio de pesquisa e pela bolsa concedidos.

"Se achar que precisa voltar, volte!
Se perceber que precisa seguir, siga!
Se estiver tudo errado, comece novamente!
Se estiver tudo certo, continue.
Deus quer, o homem sonha, a obra nasce."

Fernando Pessoa

Esta dissertação 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

Lista de figuras e gráficos

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

Resumo

Summary

1- INTRODUÇÃO.....	2
1.1- Obesidade	2
1.2- Grelina	6
1.3- Receptor Secretagogo do Hormônio do Crescimento (<i>GHSR</i>).....	13
2- OBJETIVOS.....	20
2.1- Objetivo geral.....	20
2.2- Objetivos específicos	20
3- MÉTODOS.....	22
3.1- Protocolo do estudo.....	22
3.2- População do Estudo.....	22
3.3- Avaliação antropométrica e da composição corporal	23
3.4- Métodos laboratoriais.....	25
3.5- Avaliação dos parâmetros metabólicos	27
3.6- Avaliação da pressão arterial.....	29
3.7- Avaliação do consumo alimentar	29
3.8- Avaliação da Compulsão Alimentar Periódica (CAP)	30

3.9- Estudo do gene do receptor secretagogo do hormônio do crescimento (<i>GHSR</i>)	31
3.10- Análise estatística	35
4- RESULTADOS	38
4.1- Avaliação da população de estudo	38
4.2- Avaliação do gene do receptor secretagogo do hormônio do crescimento (<i>GHSR</i>)	41
5- DISCUSSÃO	78
5.1- População de estudo	78
5.2- Gene do receptor secretagogo do hormônio do crescimento(<i>GHSR</i>)	80
6- CONCLUSÕES	93
7- ANEXOS	96
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1: Acilação da grelina.....	8
Figura 2: Secreção da grelina segundo refeições em 24 horas.....	9
Figura 3: Ações da grelina.....	11
Figura 4: Receptor 1a (<i>GHSR</i> 1a).....	14
Figura 5: Mecanismo de ação da grelina- ativação do <i>GHSR</i> 1a.....	16
Gráfico 1: Médias da glicemia nos tempos do TOTG segundo os genótipos da variante rs495225 (171 C/T).....	57
Gráfico 2: Médias da insulina nos tempos do TOTG segundo os genótipos da variante rs495225 (171 C/T).....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Primers para PCR do Exon 1 do gene do <i>GHSR</i>	33
Tabela 2: Primers para PCR do Exon 2 do gene do <i>GHSR</i>	33
Tabela 3: Análise das variáveis clínicas nas CAO e CAE.....	38
Tabela 4: Análise da ingestão calórica e do risco de compulsão alimentar nas CAO e CAE.....	39
Tabela 5: Análise das variáveis laboratoriais e metabólicas nas CAO e CAE.....	40
Tabela 6: Análise da frequência de SM e de seus parâmetros nas CAO e CAE.....	41
Tabela 7: Frequência dos genótipos da variante rs2232165 (60 C/T) no exon 1 do <i>GHSR</i> nas CAO e CAE.....	42
Tabela 8: Análise das variáveis antropométricas, de composição corporal e clínicas segundo genótipo da variante rs2232165 (60 C/T) nas CAO.....	43
Tabela 9: Análise das variáveis dietéticas segundo genótipo da variante rs2232165 (60 C/T) nas CAO.....	44
Tabela 10: Análise das variáveis laboratoriais e metabólicas segundo genótipo da variante rs2232165 (60C/T) nas CAO.....	46
Tabela 11: Descrição das variáveis clínicas, antropométricas e de composição corporal das cinco CAO com genótipo CT da variante rs2232166 (144 C/T).....	48

Tabela 12: Descrição das variáveis do consumo alimentar e do comportamento alimentar de duas CAO com genótipo CT da variante rs2232166 (144 C/T).....	49
Tabela 13: Descrição das variáveis laboratoriais das cinco CAO com genótipo CT da variante rs2232166 (144 C/T).....	50
Tabela 14: Frequência dos genótipos da variante rs495225 (171 C/T) no exon 1 do <i>GHSR</i> nas CAO e CAE.....	51
Tabela 15: Análise das variáveis antropométricas, de composição corporal e clínicas segundo genótipo da variante rs495225 (171 C/T) nas CAO.....	53
Tabela 16: Análise das variáveis dietéticas segundo genótipo da variante rs495225 (171 C/T) nas CAO.....	54
Tabela 17: Distribuição da frequência dos genótipo TT da variante rs495225 (171 C/T) nas CAO do sexo masculino, de acordo com o diagnóstico de SM.....	55
Tabela 18: Análise das variáveis laboratoriais e metabólicas segundo genótipo da variante rs495225 (171 C/T) nas CAO.....	56
Tabela 19: Descrição das variáveis clínicas, antropométricas e de composição corporal das duas CAO com genótipo CT da variante rs79053943 (271 C/T).....	59
Tabela 20: Descrição das variáveis do consumo alimentar e do comportamento alimentar das duas CAO com genótipo CT da variante rs79053943 (271 C/T).....	60

Tabela 21: Descrição das variáveis laboratoriais das duas CAO com genótipo CT da variante rs79053943 (271 C/T).....	61
Tabela 22: Descrição das variáveis clínicas, antropométricas e de composição corporal das duas CAO com genótipo CT da variante rs2232168 (432 C/T).....	63
Tabela 23: Descrição das variáveis do consumo alimentar e do comportamento alimentar das duas CAO com genótipo CT da variante rs2232168 (432 C/T).....	64
Tabela 24: Descrição das variáveis laboratoriais das duas CAO com genótipo CT da variante rs2232168 (432 C/T).....	65
Tabela 25: Frequência dos genótipos da variante rs2232169 (447 C/G) no exon 1 do <i>GHSR</i> nas CAO e CAE.....	66
Tabela 26: Análise das variáveis antropométricas, de composição corporal e clínicas segundo genótipo da variante rs2232169 (447 C/G) nas CAO.....	67
Tabela 27: Análise das variáveis dietéticas segundo genótipo da variante rs2232169 (447 C/G) nas CAO.....	68
Tabela 28: Análise das variáveis laboratoriais e metabólicas segundo genótipo da variante rs2232169 (447 C/G) nas CAO.....	70
Tabela 29: Frequência dos genótipos da variante rs572169 (477 G/A) no exon 1 do <i>GHSR</i> nas CAO e CAE.....	71
Tabela 30: Análise das variáveis antropométricas, de composição corporal e clínicas segundo genótipo da variante rs572169 (477 G/A) nas CAO.....	72

Tabela 31: Análise das variáveis dietéticas segundo genótipo da variante rs572169 (477 G/A) nas CAO.....	74
Tabela 32: Análise das variáveis laboratoriais e metabólicas segundo genótipo da variante rs572169 (477 G/A) nas CAO.....	75
Tabela 33: Frequência dos genótipos da variante rs2232165 (60 C/T) em diferentes populações.....	81
Tabela 34: Frequência dos genótipos da variante rs495225 (171 C/T) em diferentes populações.....	83
Tabela 35: Frequência dos genótipos da variante rs2232169 (447 C/G) em diferentes populações.....	87
Tabela 36: Frequência dos genótipos da variante rs572169 (477 G/A) em diferentes populações.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

aa	Aminoácido
ACC	Carboxilase acetil-Coa
AGRP	Proteína ligada ao agouti (<i>Agouti-related protein</i>)
AMPK	Proteína quinase ativada por monofosfato adenosina (<i>adenosine monophosphate activated protein kinase</i>)
ATPIII	<i>Adult Treatment Panel III</i>
AUC	Área sob a curva
CAE	Crianças e adolescentes eutróficos.
CAO	Crianças e adolescentes obesos
CAP	Compulsão alimentar periódica
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina (<i>Corticotropin-releasing hormone</i>)
CT	Colesterol total
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSM-IV	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i> , 4 th Edition
ECAP	Escala de compulsão alimentar periódica
EDTA	Ácido etilenodiamiotetracético
FAS	Sintase de ácido graxo (<i>fatty acid synthase</i>)
GH	Hormônio do crescimento
GHRH	Hormônio estimulante de liberação de GH (<i>Grown-Hormone-Releasing Hormone</i>)

<i>GHS</i>	<i>Growth Hormone Secretagogue</i>
<i>GHSR</i>	<i>Growth-Hormone Secretagogue Receptor</i>
GOAT	Grelina-o-acil-transferase
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HDL	Lipoproteína de alta densidade
<i>HOMA</i>	<i>Homeostasis Model Assessment</i>
HW	Hardy-Weinberg
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IMC	Índice de massa corporal
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NPY	Neuropeptídeo Y
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Polimerase em Cadeia
PCR-RT	Reação de Polimerase em Cadeia- Tempo real
POF	Pesquisa Brasileira do Orçamento Familiar
<i>POMC</i>	Pro-opiomelanocortina
PP	Pré-pubere.
PUB	Púbere .
PYY	Peptídeo YY
QR	Coeficiente respiratório
RCA	Registro do consumo alimentar
RI	Resistência insulínica

SDS	Sódio dodecil sulfato
SM	Síndrome Metabólica
<i>SNP</i>	Polimorfismo de um único nucleotídeo (<i>Single nucleotides polymorphism</i>)
TCAP	Transtorno da compulsão alimentar periódica
TG	Triglicérides
<i>UAG</i>	Grelina não acilada (<i>unacylated ghrelin</i>)
VET	Valor energético total

RESUMO

Arthur T. Influência de variantes no gene do receptor secretagogo do hormônio do crescimento (*GHSR*) na obesidade e no risco de compulsão alimentar e síndrome metabólica em crianças e adolescentes obesos [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

A prevalência da obesidade vem aumentando em todas as idades e na população infantil é considerada um problema de saúde pública. Os fatores relacionados à patogênese da obesidade não estão completamente elucidados, envolvendo questões comportamentais, biológicas, hormonais, culturais e genéticas. O comportamento alimentar é regulado pelo eixo hormonal entero neuroendócrino o qual modula o apetite, os processos fisiológicos, metabólicos e psicológicos. A grelina teria um papel importante neste processo de modulação alimentar, pois está envolvida na regulação central da ingestão alimentar e do balanço energético, estimulando o apetite, a lipogênese e reduzindo a taxa metabólica. Estudos demonstram que na obesidade as concentrações plasmáticas de grelina são significativamente menores e estão negativamente relacionadas ao índice de massa corporal, à porcentagem de gordura corporal, à insulina e à leptina; ainda, a grelina também está implicada na regulação do tecido adiposo, protegendo o estoque de gordura em depósitos sensíveis à sua ação para posterior utilização, sendo um hormônio com múltiplas funções no mecanismo de homeostase do estado de adiposidade e no desenvolvimento da síndrome metabólica. A ação da grelina esta ligada ao eixo grelina/ receptor secretagogo do hormônio do crescimento (*GHSR*) em humanos. O gene *GHSR* localiza-se no cromossomo 3q 26.31, locus que foi associado a múltiplos fenótipos relacionados à obesidade e à síndrome metabólica. Deste modo, o presente estudo avaliou se variantes do *GHSR* poderiam estar associados com o quadro de obesidade e se influenciariam a síndrome metabólica e a compulsão alimentar em crianças e adolescentes obesos. Observamos que a adiposidade influencia o aparecimento da resistência à insulina, as complicações metabólicas e a prevalência de síndrome metabólica, no entanto, nenhuma das variantes analisadas no gene do *GHSR* esteve associada à obesidade infantil. Notamos que a presença do alelo C (homozigose para o alelo ancestral e heterozigose) da variante rs495225 (171 C/T) resultou em maior ingestão de carboidrato e uma tendência a maior ingestão de calorias nas crianças e adolescentes obesos, também associou-se com maior escore para compulsão alimentar periódica nas meninas obesas. Nesta variante, observamos que a presença do alelo T (homozigose para o alelo polimórfico) resultou em maior resistência à ação da insulina nas crianças e adolescentes obesos. Avaliando a variante rs572169 (477 G/A), observamos que a presença do alelo G (homozigose para o alelo ancestral) levou a uma maior ingestão calórica e a maiores valores de colesterol total e LDLc nas crianças e adolescentes obesos. Desta forma, a presença de alterações polimórficas no gene do *GHSR* frequentes na nossa população pode influenciar o comportamento alimentar e as co-morbidades associadas à obesidade infantil e levar a um maior risco de doenças metabólicas e cardiovasculares.

Descritores: 1.Receptores de grelina 2.Genética 3.Obesidade 4.Criança 5.Adolescente 6.Comportamento alimentar

SUMMARY

Arthur T. Influence of growth hormone secretagogue receptor (GHSR) gene variants in obesity and risk of binge eating and metabolic syndrome in obese children and adolescents [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2012.

Obesity's prevalence, which is increasing in all ages, is considered, in children, a public health problem. The factors related to the pathogenesis of obesity are not fully elucidated, and are involving behavioral, biological, hormonal, genetic and cultural factors. The eating behavior is regulated by the hormonal entero neuroendocrine axis which modulates appetite, physiological, metabolic and psychological processes. Ghrelin would have an important role in the modulation of the process of eating. Ghrelin is involved in the central regulation of food intake and energy balance by stimulating appetite, reducing lipogenesis and metabolic rate. Studies show that, in obese the plasma concentrations of ghrelin are significantly smaller and is negatively correlated with body mass index, percent body fat, insulin and leptin levels; yet, this ghrelin is also implicated in the regulation of adipose tissue, protecting the stock of fat deposits sensitive to its action for later use, being an hormone with multiple functions in the homeostasis mechanism of the state of adiposity and development of metabolic syndrome. The action of ghrelin is linked to ghrelin axis/ growth hormone secretagogue receptor (GHSR), in humans. The GHSR gene is located on chromosome 3q 26.31, which locus was associated with multiple phenotypes related to obesity and metabolic syndrome. Thus, the present study evaluated whether the GHSR variants could be associated with obesity and the metabolic syndrome and binge eating in obese children and adolescents. We found that adiposity influences the onset of insulin resistance, metabolic complications and prevalence of metabolic syndrome, however none of the variants analyzed in the GHSR gene was associated with childhood obesity. We note that the presence of the C allele (homozygous and heterozygous ancestral allele) variant rs495225 (171 C/T) resulted in higher carbohydrate intake and a trend toward greater calorie intake in obese children and adolescents, it was also associated with higher scores for periodic binge eating in obese girls. We observed that the presence of the T allele (homozygous for the polymorphic allele) has resulted in increased resistance to insulin action in obese children and adolescents. Assessing the variant rs 572169(477 G/A), we observed that the presence of the G allele (homozygous for the ancestral allele) led to greater caloric intake and higher values of total cholesterol and LDL-c in obese children and adolescents. Thus, the presence of polymorphic alterations in the gene GHSR is frequent in our population and may influence eating behavior and the co-morbidities associated with obesity and lead to an increased risk of metabolic and cardiovascular diseases.

Descriptors: 1.Ghrelin receptors 2.Genetic 3.Obesity 4.Children 5.Adolescents 6.Eating behavior

INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

1.1- Obesidade

Obesidade é uma doença crônica que resulta em excesso de tecido adiposo¹. Este acúmulo anormal ou excessivo de gordura pode resultar em prejuízos à saúde². A patogênese da obesidade não está completamente elucidada, fatores comportamentais e biológicos são influenciados por uma suscetibilidade individual e também por fatores hormonais, culturais e genéticos, que contribuem para o balanço energético positivo e a regulação dos estoques de energia do corpo³.

1.1.1- Obesidade na infância e adolescência

A prevalência da obesidade vem aumentando em todas as idades. Na população infantil, é considerada a doença crônica com maior prevalência⁴. Dados brasileiros indicam que um processo de transição nutricional vem ocorrendo nas últimas três décadas. Wang et al. (2002)⁵ verificaram que a prevalência de sobrepeso e obesidade em crianças e adolescentes de 6 a 18 anos triplicou, passando de 4,1% para 13,9%. Neste mesmo estudo, concluiu-se que as taxas de sobrepeso no país aumentaram cerca de 0,5% ao ano, enquanto as taxas de subnutrição diminuíram, aproximadamente 0,3% ao ano. A avaliação de crianças brasileiras pela POF (Pesquisa Brasileira do Orçamento Familiar) 2008-2009 do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) indica que na faixa etária de 10 a 19 anos, a frequência de excesso de peso é de 21,5%. O aumento de peso nesta faixa

etária foi contínuo nos últimos 34 anos. No sexo masculino, o índice passou de 3,7% para 21,7%, o que representa um acréscimo de seis vezes ; e no sexo feminino, as estatísticas triplicaram: de 7,6% para 19,4% entre os períodos de 1974-75 e 2008-09. A frequência de obesidade na faixa etária de 10 a 19 anos é de 3,4%, este quadro mostra-se menos intenso que o excesso de peso, mas também com tendência ascendente, passando de 0,4% para 5,9% entre meninos e de 0,7% para 4,0% no sexo feminino⁶.

A obesidade infantil é atualmente um problema de saúde pública, pois resulta em impacto psicológico e físico nas crianças e adolescentes, é fator de risco para o desenvolvimento de doenças crônicas como hipertensão, dislipidemia, esteatose hepática, colecistite e colelitíase, síndrome dos ovários policísticos, apneia do sono e, mais tardiamente, diabetes mellitus tipo 2 (DM2), aterosclerose, doença arterial coronariana, cirrose hepática e câncer colo-retal⁷. Além disso, adultos que foram crianças obesas tem duas vezes mais chances de morrer de complicações decorrentes da obesidade na infância⁸. A probabilidade da criança obesa tornar-se um adulto obeso varia de 20% a 50% antes da puberdade e de 50% a 70% após a puberdade. Este risco predispõe a criança obesa a diversas complicações da obesidade na idade adulta⁹.

Vários são os fatores relacionados ao desenvolvimento da obesidade: genéticos¹⁰, ambientais¹¹ e psicológicos¹². Esses, na maioria das vezes, apresentam-se associados em um mesmo indivíduo. Especificamente, de 50% a 70% da variação no IMC (Índice de Massa Corporal) pode ser atribuída a fatores genéticos¹³.

1.1.2- Comportamento alimentar

O comportamento alimentar é um processo que engloba todas as ações feitas em relação ao alimento¹⁴. As interações que formam a psicobiologia do comportamento alimentar envolvem o apetite, os processos fisiológicos e metabólicos e o sistema nervoso, que é determinado por sistemas sensoriais específicos¹⁵. Blundell e Gillett (2001)¹⁵ descrevem estas interações: os processos biológicos que refletem os desejos de comer e os fatores inibitórios de ingestão alimentar e de reserva de tecido adiposo; os processos ambientais que restringem o tempo e a distribuição de episódios alimentares, influenciando o consumo energético por meio do sabor e do conteúdo de nutrientes dos alimentos; e as modulações auto-impostas do padrão de comportamento, que surge da interação entre processos biológicos e ambientais e a tentativa comportamental de autocontrole, frequentemente incerta, porque tende a se opor às tendências biológicas e às pressões ambientais.

Na obesidade, o comportamento alimentar deve ser analisado, pois este pode interferir no resultado do tratamento da doença¹⁵. Estudos demonstraram que dietas ricas em carboidratos influenciam o apetite^{16, 17}. Obesos consomem carboidratos não somente para aliviar a fome, mas para combater tensões, ansiedade, fadiga mental e depressão¹⁶. Há evidências de que a gordura dietética pode influenciar a regulação do consumo energético em obesos, isto é demonstrado pela alteração na sinalização inibitória no período pós-prandial após ingestão de alimentos com alta densidade energética¹⁵.

1.1.3- Transtorno da compulsão alimentar periódica (TCAP)

O transtorno da compulsão alimentar periódica (TCAP) tem como característica principal os episódios de compulsão alimentar, esse é caracterizado por um comportamento específico, definido por um excesso descontrolado de ingestão alimentar. Estima-se que sua prevalência na população geral varia entre 1,5% a 5%¹⁸.

O *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 4th Edition (*DSM-IV*) sugeriu modificações no capítulo dos transtornos alimentares, incluindo o episódio de compulsão alimentar como componente principal da bulimia nervosa e também a proposta de uma nova categoria de diagnóstico, o TCAP¹⁹. A delimitação do conceito do TCAP mostrou-se de grande utilidade clínica, diferenciando um subgrupo de pacientes obesos com características psicopatológicas específicas²⁰. Este transtorno alimentar é detectado também entre crianças e adolescentes e pode manifestar-se em variados níveis, desde um comportamento subclínico até o completo TCAP, atendendo a todos os critérios identificados pelo *DSM-IV*^{21, 22}.

A ocorrência da compulsão alimentar entre obesos foi descrita pela primeira vez como uma ingestão de enormes quantidades de comida em um curto espaço de tempo, seguida por sentimentos de desconforto físico e de auto-condenação²³. Na literatura, estima-se que o transtorno acometa de 20% a 30% dos pacientes que procuram tratamento para emagrecer²³. Um estudo brasileiro com 128 crianças e adolescentes obesos em tratamento para perda de peso mostrou que 39,1% apresentaram sintomas de compulsão alimentar (32% sintomas moderados e 7,1% sintomas graves)²⁴.

A etiologia dos transtornos alimentares, que é instrumento de diversos estudos e investigações, demonstrou a importância de diversas variáveis, entre elas os fatores sociais e psicológicos e também a predisposição genética e a alteração do eixo neuroendócrino²⁵.

1.1.4- Neurotransmissores associados aos transtornos alimentares

Os neurotransmissores têm um importante papel na etiopatogênese dos transtornos alimentares e da obesidade. Os mecanismos de controle da ingestão alimentar envolvem um complexo conjunto de sistemas, incluindo sistema nervoso periférico e central, englobando diversos neuropeptídeos como grelina, hormônio liberador de corticotropina (*CRH: Corticotropin-releasing hormone*), opioides, neuropeptídeo Y (NPY) e peptídeo YY (PYY), vasopressina e oxitocina, colecistoquinina e leptina, e também monoaminas como a serotonina, a dopamina e a norepinefrina²⁶.

1.2- Grelina

A grelina é um neuropeptídeo hormonal produzido predominantemente pelo estômago e está envolvida na regulação central da ingestão alimentar e do balanço energético. Estimula o apetite e a lipogênese e ainda reduz a taxa metabólica²⁷.

1.2.1- Identificação

Estudos identificaram o *Growth Hormone Secretagogue (GHS)* como uma terceira via no controle da secreção do hormônio do crescimento (*GH*:

Growth Hormone), além do hormônio estimulante de liberação de *GH* (*GHRH: Grown-Hormone-Releasing Hormone*) e da somatostatina^{28, 29}.

O *GHS* é um componente sintético com potente função de estimular a liberação de *GH* e funciona através da ativação de um receptor acoplado à proteína G, o *Grown-Hormone Secretagogue Receptor (GHSR)*^{30, 31}. Devido ao *GHS* ser um componente artificial, foi postulado que haveria um ligante endógeno que se ligaria ao *GHSR* e levaria à função similar ao *GHS*, assim seguiu-se a purificação e a identificação do ligante endógeno do *GHSR* produzido no estômago, a grelina^{32, 33}.

1.2.2- Isoformas e Circulação

Existem quatro isoformas de grelina circulante, três aciladas (octanoacilada, decanoacilada e decenoacilada) e uma não acilada³⁴; 80% da grelina circulante esta na forma de grelina não acilada (*UAG: unacylated ghrelin*)³⁵.

A grelina sofre uma acilação pós-transcriptional no terceiro resíduo de aminoácido (serina), resultando na adição de um sítio octanoico³⁶; esta modificação na forma da grelina é essencial para sua atividade biológica³⁷. A acilação é necessária para que a grelina atravessasse a barreira hemato encefálica e ligue-se ao *GHSR*³⁴. A enzima responsável pela acilação da grelina é a grelina-o-acil-transferase (GOAT), o mRNA (ácido ribonucleico mensageiro) da GOAT tem maior expressão no estômago, também detectado no intestino e cólon³⁸ (Figura1).

Figura 1: Acilação da grelina

A meia vida da grelina acilada na circulação é de aproximadamente 30 minutos³⁹, sendo rapidamente desoctanoacilada (perde o grupo octanoico) na circulação pela ação das enzimas carboxilesterase e butirilcolinesterase, transformando-se na forma inativa, a *UAG*⁴⁰. A grelina acilada esta associada a lipoproteínas específicas no plasma⁴¹, e esta presente na circulação predominantemente ligada a proteínas carreadoras, diferente da *UAG*⁴².

A concentração plasmática de grelina em humanos é de 150-180 fmol/ml⁴³. Estudos demonstram a dificuldade na quantificação de grelina circulante devido às múltiplas isoformas e à rápida desacilação da grelina circulante^{42, 44}.

1.2.3- Produção

O primeiro sítio de produção da grelina são as células secretórias das glândulas oxínticas do estômago³², há também a produção de grelina no

duodeno, ceco e cólon⁴⁵. Nos tecidos endócrinos, a grelina é expressa no pâncreas, hipotálamo, hipófise, útero, ovário e endotélio^{32, 46}.

1.2.4- Secreção

A secreção de grelina é regulada segundo as concentrações de suas isoformas circulantes e segundo o ciclo circadiano⁴⁷.

Estudos demonstram que a secreção de grelina esta aumentada em condições de balanço energético negativo, por exemplo na anorexia e caquexia⁴⁸, e diminuída em momentos de balanço energético positivo, como na obesidade infantil⁴⁹.

O jejum, a hipoglicemia induzida por insulina e o sono determinam a secreção de grelina. Os inibidores da secreção são glicose, *GH* exógeno, somatostatina e seus análogos. Há aumento nas concentrações de grelina circulante no período pré-prandial e no período que precede a noite, e há redução após a refeição (Figura 2)⁵⁰.

Figura 2: Secreção da grelina segundo refeições em 24 horas

Em indivíduos saudáveis, a secreção de grelina é suprimida em proporção à ingestão calórica consumida na refeição⁵¹. Há também influência do macronutriente ingerido na refeição, a ingestão de proteína parece ser mais efetiva para a supressão de grelina que os lipídeos, os carboidratos levam à supressão da grelina circulante no momento pós-prandial imediato, mas é seguida de uma hipersecreção (conhecido como “*rebound*”)⁵².

1.2.5- Ação

A grelina é um potente estimulador da liberação de GH nas células somatotróficas da hipófise e possui outras importantes atividades, incluindo estimulação da secreção lactotrófica e corticotrófica, atividade orexígena acoplada ao controle do gasto energético, controle da secreção ácida e da motilidade gástrica, influência sobre a função endócrina pancreática e o metabolismo da glicose e ainda ações cardiovasculares e efeitos antiproliferativos em células neoplásicas^{53, 54, 55, 56}.

A figura 3 mostra as ações da grelina em diversos sistemas e órgãos²⁷.

Figura 3: Ações da grelina

O maior alvo da grelina está no núcleo arqueado do hipotálamo, no qual a grelina age em grupos de neurônios que estimulam o apetite, expressando os potentes neuropeptídeos orexigênicos, como o NPY e a proteína ligada ao agouti (*AGRP: Agouti-related protein*)⁵⁷.

A grelina é um hormônio orexigênico com importante ação ativadora, é secretada no trato gastrointestinal e transportada até a área hipotalâmica onde regula a ingestão alimentar, contrabalanceando os efeitos de múltiplos hormônios anorexígenos como leptina, insulina e PYY⁵⁷. Regula de maneira antagonista a leptina, a síntese e a secreção de neuropeptídeos no hipotálamo que regulam a ingestão alimentar e o balanço energético⁵⁸.

A administração crônica de grelina estimula drasticamente a ingestão alimentar em ratos e aumenta o ganho de peso⁵⁵. Em humanos, a injeção ou a infusão de grelina induz à fome⁵⁹.

1.2.6- Evidências da ação da grelina

Na composição corporal, adiposidade e obesidade

A grelina está implicada na regulação do peso corporal, assim a exposição prolongada à grelina leva ao acúmulo de massa gorda⁵¹. Imagens de ressonância magnética demonstraram que a infusão intravenosa de grelina acilada em ratos alterou significativamente a distribuição de tecido adiposo abdominal, mas sem influência na gordura total e no ganho de peso⁶⁰.

Sabe-se que a injeção intracerebroventricular de grelina tem uma potente ação orexigênica, no entanto, o efeito periférico da grelina é mais ambíguo. Alguns estudos demonstram que o efeito da grelina no acúmulo de gordura age paralelo com o aumento na ingestão alimentar⁶¹; outros estudos demonstram que as ações são independentes^{62, 63}. Davies et al. (2009)⁶⁰ demonstraram que a grelina não eleva a adiposidade abdominal pelo aumento da disponibilidade de substratos circulantes, mas sim pela redução da lipólise.

O efeito da exposição à grelina no adipócito é controverso, uma vez que há estudos que relatam a grelina inibindo⁶⁴ ou ativando a adipogênese^{55, 62}. Estudos sugerem que a grelina influencie o aumento da massa gorda induzindo o aumento dos adipócitos e não a diferenciação dos pré-adipócitos (adipogênese)⁶⁰. A hipertrofia do adipócito seria pela diminuição da lipólise⁴⁷. Desta forma, a grelina parece proteger o estoque de gordura em depósitos sensíveis à sua ação para posterior utilização, sendo um hormônio com múltiplas funções no mecanismo de homeostase do estado

de adiposidade e no desenvolvimento da síndrome metabólica. O efeito obesogênico da grelina possivelmente está associado à influência desta na ação de outros hormônios metabólicos como *GH*, insulina e leptina⁴⁷.

Nos transtornos alimentares

A grelina atua na modificação do consumo alimentar, sua administração intracerebroventricular ativa neurônios orexigênicos contendo NPY no núcleo arqueado, regula a expressão de mRNA do NPY e inibe a ação de neurônios anorexígenos que expressam a *POMC* (*pro-opiomelanocortin*)⁵⁷.

Em pacientes com anorexia nervosa, as concentrações plasmáticas de grelina estão aumentadas, voltando a níveis normais após o ganho de peso^{48,65}. Estudos demonstraram que a concentração circulante de grelina aumenta em resposta à redução da massa corporal, mesmo quando não há redução na ingestão alimentar^{65,66}. Esta pode ser uma adaptação específica, sugerindo uma resposta compensatória às mudanças na homeostase energética em pessoas saudáveis jovens, exibindo uma sensibilidade particular deste grupo de pessoas às alterações na massa corporal⁶⁶.

1.3- Receptor Secretagogo do Hormônio do Crescimento (*GHSR*)

O *GHSR* é um receptor membro da família dos receptores acoplados à proteína G que inclui também os receptores para motilina, neurotensina e neuromedina U⁶⁷.

Existem dois receptores distintos, o *GHSR* tipo 1a (*GHSR*-1a) com características e propriedades funcionais consistentes com as do receptor de grelina; e outro o *GHSR* tipo 1b (*GHSR*-1b) produzido por um mecanismo alternativo (*splicing*)²⁹.

1.3.1- Gene do *GHSR*

Em 1996, Howard et al. clonaram o gene do *GHSR* com sete domínios transmembrana, localizado no cromossomo 3q 26.31³⁰. O gene do *GHSR* tem dois exons: o primeiro exon codifica os domínios transmembrana de 1 a 5 e o exon 2 que codifica os domínios transmembrana 6 e 7 (Figura 4). O *GHSR*-1b é codificado apenas pelo exon 1, sendo formado apenas por 5 dos 7 domínios transmembrana, isto exclui a terminação –COOH observada no *GHSR*-1a, que caracteriza a inatividade farmacológica do *GHSR*-1b³⁴.

Figura 4: Receptor 1a (*GHSR* 1a)

1.3.2- Expressão do *GHSR*

O *GHSR* é expresso nos tecidos centrais e periféricos. No sistema nervoso central, a expressão é maior em áreas hipotalâmicas, incluindo área

lateral e anterior; ainda, encontram-se a expressão de mRNA do *GHSR* em áreas extra-hipotalâmica, como o núcleo motor dorsal do nervo vago e alguns neurônios pré-ganglionares parassimpáticos^{68,69}.

Nos tecidos periféricos endócrinos, o *GHSR* é expresso na hipófise, no pâncreas, na tireoide e nas glândulas adrenais⁷⁰. Análises de PCR-RT (Reação de Polimerase em Cadeia- Tempo real) demonstraram expressão do mRNA do *GHSR* em vários órgãos, incluindo coração, fígado, pulmão, pâncreas, estômago, intestinos, tecido adiposo e células imunológicas, indicando que a grelina tem múltiplas funções nos tecidos corporais^{70,71}. A presença do *GHSR* no tecido adiposo é contraditória, muitos grupos não detectaram este receptor^{70,72}. No entanto, há relatos de expressão no tecido adiposo de *GHSR* e derivados de *GHS*^{71,73}.

1.3.3- Ação do *GHSR*

Há uma multiplicidade de funções ligadas ao eixo grelina/*GHSR*, descritas anteriormente nas funções exercidas pelo hormônio grelina, como mostrou a figura 3.

A figura 5 abaixo apresenta três mecanismos de ação da grelina na ativação do *GHSR*: 1- Através da proteína Gq que age na fosfolipase C e na proteína quinase C nas células da hipófise, aumentando o influxo de cálcio, levando à liberação de GH; 2- Através da proteína Gs que ativa a adenil ciclase, fosforila a proteína quinase A, aumentando o influxo de cálcio nas células do núcleo arqueado, agindo no controle da homeostase energética; 3- Ativação da proteína quinase ativada por monofosfato adenosina (*AMPK*-

adenosine monophosphate activated protein kinase) estimulando a carboxilase acetil-CoA (ACC) e inibindo a sintase de ácido graxo (*FAS- fatty acid synthase*) levando à regulação da ingestão alimentar⁷⁴.

Figura 5: Mecanismo de ação da grelina- ativação do *GHSR* 1a

Modelos animais com nocaute do gene da grelina não evidenciaram alterações importantes no crescimento e no peso, como seria esperado pelas suas ações fisiológicas^{75,76}. No entanto, animais com nocaute do *GHSR* são menores e mais magros quando comparado com os animais controles e apresentam alterações significantes no eixo *GH/IGF-1*⁷⁷.

Estes resultados discordantes podem ser justificados pela alta atividade constitutiva do *GHSR*, o que confere maior importância ao *GHSR* em relação à grelina no controle do crescimento e do peso⁷⁸. O estudo de Davies et al (2009)⁶⁰, mostrou que a indução da grelina na elevação da adiposidade abdominal é dependente de *GHSR*.

1.3.4- Variantes no gene do *GHSR*

A regulação da expressão gênica é resultado da combinação de diversos fatores transcripcionais em múltiplos sítios dentro ou próximo ao gene, e também de vários polimorfismos de um único nucleotídeo (*SNPs-single nucleotides polymorphism*)^{79, 80}.

São descritas 42 variantes no gene do *GHSR*, 28 no exon 1 e 14 no exon 2⁸¹. Existem também variantes na região intrônica e promotora.

1.3.5- Evidências da associação entre variantes no *GHSR* e comorbidades

Em humanos, o gene *GHSR* localiza-se em um locus extremamente associado a múltiplos fenótipos relacionados à obesidade e à síndrome metabólica⁸².

Variantes no *GHSR* e obesidade

Baessler et al. (2005)⁸² verificaram em indivíduos obesos que variantes no gene do *GHSR* se relacionam com o IMC. O estudo de Dossus et al. (2008)⁸³ mostrou associação entre variantes no *GHSR* e aumento do IMC. Wang et al. (2004)⁸⁴ mostraram variações na frequência alélica no gene do *GHSR* em crianças e adolescentes obesos.

No entanto, estudo com a população europeia não observou diferença significativa entre as variantes no *GHSR* e o peso, a altura e o IMC em crianças e adultos⁸⁵. Mager et al. (2008)⁸⁶ não observaram associação entre variantes no gene do *GHSR* e a perda de peso em um programa de

intervenção para perda de peso; e também não observou maior risco de DM2.

Variantes no *GHSR* e transtornos alimentares

Gueorguiev et al. (2009)⁸⁷ demonstraram associação entre a variante rs2232169 no gene do *GHSR* e transtorno alimentar *overeating* em indivíduos obesos.

Myasaka et al. (2006)⁸⁸ demonstraram que a variante rs495225 no gene do *GHSR* é um fator de risco para o desenvolvimento da bulimia nervosa, mas não para anorexia nervosa.

Variantes no *GHSR* e síndrome metabólica

Na população chinesa, Li et al. (2008)⁸⁹ verificaram que variantes no gene *GHSR* estavam associados à síndrome metabólica, ao aumento da circunferência abdominal e à diminuição do HDL.

Considerando os resultados apresentados, o presente estudo pretende elucidar se variantes no receptor secretagogo do hormônio do crescimento (*GHSR*) poderiam estar associadas ao quadro de obesidade infantil e se poderiam influenciar a ingestão e o comportamento alimentar em crianças e adolescentes obesos e se estariam associadas a alterações metabólicas e laboratoriais destas crianças.

OBJETIVOS

2- OBJETIVOS

Em pacientes com obesidade infantil:

2.1- Objetivo geral

Estudar a frequência das variantes polimórficas do exon 1 e 2 do gene do receptor secretagogo do hormônio do crescimento (*GHSR*) e sua associação com a obesidade.

2.2- Objetivos específicos

Associar as variantes polimórficas do exon 1 e 2 do gene do receptor secretagogo do hormônio do crescimento (*GHSR*) com:

- variáveis antropométricas e de composição corporal;
 - compulsão alimentar periódica e consumo alimentar;
 - síndrome metabólica e seus componentes.
-

MÉTODOS

3- MÉTODOS

3.1- Protocolo do estudo

Foi realizado um estudo experimental, com modelo de ensaio clínico, não controlado.

As crianças e adolescentes do estudo foram acompanhadas no Ambulatório de Obesidade Infantil do Grupo de Obesidade da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP). O estudo genético foi realizado no Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular (LIM 25) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

O estudo foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética da Instituição (CAPPesq)(Anexo 1). De acordo com normas do HCFMUSP, o termo de consentimento livre e esclarecido foi assinado pelos responsáveis e pelos pacientes envolvidos no estudo antes do início do mesmo (Anexo 2).

3.2- População do Estudo

Avaliamos clínica e laboratorialmente 518 crianças e adolescentes, 422 obesos e 96 não obesos.

O grupo obeso foi composto por crianças e adolescentes de ambos os sexos, de 7 a 14 anos, que procuraram tratamento para obesidade no serviço de endocrinologia no período de março de 2001 a março de 2011 e que possuíam dados clínicos necessários para a avaliação e soro disponível

para a genotipagem do receptor secretagogo do hormônio do crescimento (*GHSR*).

O grupo não obeso foi composto por crianças e adolescentes de ambos os sexos, de 6 a 14 anos, trazidas pelos pais que se interessaram pela possibilidade de avaliação médica, nutricional e laboratorial oferecida pelo grupo do Ambulatório de Obesidade Infantil. As crianças eutróficas foram selecionadas a partir de cinco escolas públicas de São Paulo próximas ao HCFMUSP e do próprio serviço, filhos de funcionários do HCFMUSP e da Faculdade de Medicina da USP.

Foram critérios para a inclusão do grupo obeso: crianças com idade entre 7 e 14 anos e IMC acima do percentil 95% para a faixa etária, e critérios para exclusão: indivíduos aparentados, com uso crônico de medicação, com descendência oriental ou portadores de síndromes genéticas relacionadas à obesidade.

As crianças foram classificados segundo o estadio puberal de acordo com o critério de Tanner⁹⁰, em pré-púbere (PP) e púbere (PUB).

3.3- Avaliação antropométrica e da composição corporal

3.3.1- Parâmetros antropométricos

Peso (kg): aferido com a utilização de uma balança digital Filizola®, capacidade máxima de 150 kg com graduações de 100 em 100 gramas, estando os participantes da pesquisa descalços e com roupas leves.

Desvio padrão do peso (Z peso): cálculo matemático que ajusta o peso aferido para idade e sexo. $Z \text{ peso} = (\text{peso aferido} - \text{peso esperado}) / \text{desvio padrão do peso}$.

Altura (cm): determinada por estadiômetro, graduado em centímetros e com barra de madeira vertical e fixa, com esquadro móvel para posicionamento sobre a cabeça do indivíduo, estando os mesmos descalços, com os pés unidos, em posição ereta, olhando para frente.

Desvio padrão da altura (Z altura): cálculo matemático que ajusta a altura aferida para idade e sexo. $Z \text{ altura} = (\text{altura aferida} - \text{altura esperada}) / \text{desvio padrão da altura}$.

Índice de Massa Corpórea (IMC): a obesidade avaliada pelo “Índice de Quetelet” ou Índice de Massa Corpórea (IMC), que é definido como o peso do indivíduo (kg) dividido pela sua altura (m) elevada ao quadrado. O indivíduo foi considerado eutrófico quando $IMC < p85$ para idade e sexo e obeso quando $IMC \geq p95$ nas curvas de IMC do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC)⁹¹.

Desvio padrão do IMC (Z score IMC- Z IMC): cálculo que permite a quantificação do grau de obesidade pela fórmula: $Z \text{ score} = 1/S \log_e(Q/M)$, na qual S é o coeficiente de variação individual para sexo e idade; Q é o IMC; M é a mediana.

Circunferência abdominal (CA)(cm): determinada utilizando fita plástica não-elástica com 0,7 cm de largura, na altura da crista ilíaca. A CA foi considerada aumentada quando estivesse acima do p90 para idade e sexo de acordo com recomendações de Fernandez et al. (2004)⁹².

3.3.2- Método de bioimpedância

A análise da bioimpedância utiliza propriedades elétricas do organismo para avaliar a composição corporal. Consiste em administrar uma corrente elétrica entre dois pontos do indivíduo e medir a oposição à passagem da corrente. A quantificação da bioimpedância permite, através de fórmulas conhecidas, avaliar a porcentagem de água corporal, de massa livre de gordura (massa magra) e de massa gorda. A bioimpedância possui dois componentes: a resistência (oposto da condutância R) caracterizada pela oposição primária à passagem da corrente; e a reactância (oposto da capacitância) que é a capacidade do alternador de armazenar durante um período breve uma corrente elétrica.

Para a realização da bioimpedância, os indivíduos estavam adequadamente hidratados e colocados em decúbito dorsal, sobre uma superfície não condutora, com os braços separados do tronco e as pernas separadas entre si a uma distância de 20 cm entre os tornozelos. Após limpeza de pele, foram colocados quatro eletrodos de superfície (dois emissores e dois sensores). A corrente que se administra é inócua e não é sentida pelo indivíduo. O aparelho de bioimpedância elétrica utilizado para a avaliação da composição corporal foi o *Body Composition Analyser* (BiaQuantum RJL Systems, Inc, MI, EUA).

3.4- Métodos laboratoriais

A coleta de sangue venoso periférico foi realizada após 8 a 12 horas de jejum.

Glicemia (mg/dL): realizada no Laboratório Central do HCFMUSP. A concentração plasmática de glicose foi determinada em analisador automático, modelo Cobas Integra da Roche. O intervalo de referência considerado como valores normais de glicemia foi de 75 a 99 mg/dL.

Insulina (mU/L): a concentração sérica de insulina foi determinada no Laboratório de Hormônios do HCFMUSP, utilizando o kit B080-101 Auto DELFIA, PerkinElmer do Brasil. Foram considerados valores normais quando as concentrações séricas de insulina em jejum estavam abaixo de 15 mU/L para indivíduos pré-púberes, e abaixo de 20mU/L para indivíduos púberes^{93, 94}.

Ácido úrico (mg/dL): a concentração sérica de ácido úrico foi determinada no Laboratório Central do HCFMUSP pelo método enzimático colorimétrico automatizado. Foram considerados valores normais para as mulheres: 2,4-5,7 mg/dL, e para os homens: 3,4-7,0 mg/dL.

Lípides plasmáticos: as dosagens plasmáticas de colesterol total (CT)(mg/dL), HDL (mg/dL) e triglicérides (TG)(mg/dL) foram realizadas no Laboratório Central do HCFMUSP pelo em sistema automatizado COBAS MIRA, utilizando kits enzimáticos comerciais da Roche (Mannheim, Alemanha). A concentração de colesterol nas frações LDL (mg/dL) e VLDL (mg/dL) foram determinadas pela equação de Friedwald, onde $VLDL-C = TG/5$ e $LDL-C = CT - (HDL-C + VLDL-C)$.

Adiponectina (µg/mL): a concentração sérica de adiponectina foi determinada no LIM 25 da Faculdade de Medicina da Universidade de São

Paulo por ELISA (Kit EZHADP-61K, marca *Linco Research, Inc. St Charles, Missouri – USA*).

Leptina (ng/mL): os níveis de leptina plasmáticos foram avaliados por ELISA (Kit EZHL-80SK, marca *Linco Research, Inc. St Charles, Missouri – USA*) no LIM 25 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.5- Avaliação dos parâmetros metabólicos

Resistência insulínica: avaliada pelo diagnóstico de hiperinsulinemia e pelo *Homeostasis Model Assesment (HOMA)*.

A hiperinsulinemia é determinada pelos níveis de insulina em jejum⁹⁵. Indivíduos pré-púberes são considerados hiperinsulinêmicos quando esta se encontra $\geq 15\text{mU/L}$ ⁹³, enquanto que para os púberes o nível de corte é 20mU/L , já que na puberdade existe aumento dos níveis de insulina basal⁹⁴.

HOMA é um modelo matemático que se baseia na interação da glicose com a insulina. O HOMA tem sido proposto como um método para avaliar a sensibilidade ou resistência insulínica (RI) e função das células β , a partir das concentrações de insulina e glicose de jejum. Neste método, valores altos denotam baixa sensibilidade à insulina. A análise da HOMA-RI se faz utilizando a seguinte fórmula matemática: $\text{insulina } (\mu\text{U/mL}) \times \text{glicose } (\text{mmol/L}) / 22,5$ ⁹⁶.

HOMA%S: cálculo matemático que infere a sensibilidade à insulina, realizado em um programa de computador fornecido pela Universidade de Oxford⁹⁷.

HOMA%β: cálculo matemático que infere a função da célula beta pancreática no basal, realizado em um programa de computador fornecido pela Universidade de Oxford⁹⁷.

Teste oral de tolerância à glicose (TOTG): neste teste o sangue venoso periférico foi coletado para a determinação das concentrações de glicose e insulina nos tempos 0 (T0), 30 (T30), 60 (T60), 90 (T90) e 120 (T120) minutos após ingestão de 1,75 gramas de glicose anidra ou equivalente pó Kg de peso até o máximo de 75 gramas. O teste tem a finalidade de excluir pacientes com diabetes além de estimar pacientes com RI. Os valores obtidos de glicose e insulina plasmáticas foram utilizados para a determinação da área sob a curva (AUC), através da fórmula: $AUC = ((T0+T30)+(T30+T60)+(T60+T90)+(T90+T120)) \times 30/2$ ⁹⁸, possibilitando o cálculo de AUC da glicose (AUCgli), AUC da insulina (AUCins) e razão da AUC de insulina e glicose (AUCins/AUCgli).

Foram consideradas alterações glicêmicas: glicemia de jejum alterada (GJA) quando a glicemia de jejum encontra-se entre 100mg/dL e 125mg/dL, tolerância à glicose diminuída (TGD) quando a glicemia 120 minutos encontra-se entre 140mg/dL e 199 mg/dL e diabetes mellitus tipo 2 (DM2) quando a glicemia de jejum encontra-se ≥ 126 mg/dL ou também glicemia 120 minutos ≥ 200 mg/dL⁹⁹.

Síndrome Metabólica (SM) em crianças e adolescentes: considerando-se que não existe um consenso em relação à definição de SM em crianças e adolescentes obesos, utilizamos as recomendações do *Adult Treatment Panel III* (ATPIII) adaptada para o grupo pediátrico¹⁰⁰. Portanto, a

SM foi diagnosticada quando existiram três ou mais dos seguintes fatores: CA $\geq$ p90, glicose em jejum $\geq$ 100 mg/dL, triglicérides $\geq$ 110mg/dL, HDL-c $<$ 40 mg/dL, PAS ou PAS $\geq$ p90.

3.6- Avaliação da pressão arterial

Pressão arterial (mmHg): a pressão arterial foi aferida pelo método auscultatório, com obediência às recomendações da *American Heart Association*¹⁰¹, com o indivíduo sentado em uma cadeira por cinco minutos, com as costas apoiadas e o braço esquerdo nu, na altura do coração. Foram feitas duas medições com intervalo de cinco minutos, o valor final foi obtido através da média entre essas duas medidas. Caso as duas primeiras leituras diferissem em mais de 5 mmHg, foram obtidas leituras adicionais e recalculada a média.

Para se avaliar a hipertensão arterial sistêmica (HAS), as concentrações de pressão sistólica (PAS) e diastólica (PAD) foram comparadas aos percentis das Tabelas do *National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Children and Adolescent*¹⁰², para sexo, idade e percentil da altura. A pressão arterial foi considerada alterada quando se encontrasse acima do p90.

3.7- Avaliação do consumo alimentar

O diário alimentar é um instrumento de automonitorização, no qual o paciente registra quais alimentos foram consumidos e suas quantidades, os horários e locais das refeições. Esse registro faz com que o paciente adquira

maior consciência sobre diversos aspectos da sua doença e constantemente exerça disciplina e controle. Neste trabalho, foi utilizado o registro do consumo alimentar (RCA) de três dias, onde cada paciente preencheu a cada mês, em folhas apropriadas fornecidas na consulta precedente, dados referentes às refeições realizadas em três dias diferentes (dois dias de semana e um de final de semana). Podendo contar com o auxílio de seus responsáveis, relataram os alimentos ingeridos, descrevendo as preparações, citando as marcas comerciais caso necessário e expondo as quantidades consumidas. Estes dados embasam a avaliação da ingestão média das crianças. Durante o atendimento mensal, estes registros foram revisados, aprimorando as informações oferecidas, corrigindo eventuais deslizes ou esquecimentos. Para cálculo e análise do conteúdo de energia e de macronutrientes (carboidrato, proteína e lipídeos) da dieta foi utilizado o software Virtual Nutri ®¹⁰³.

A análise dos dados de energia e de cada macronutriente permitiu estabelecer a porcentagem que o macronutriente correspondia do valor energético total.

3.8- Avaliação da Compulsão Alimentar Periódica (CAP)

O instrumento utilizado para avaliar a CAP foi a Escala de Compulsão Alimentar Periódica (ECAP), um questionário auto-aplicável, desenvolvido por Gormally et al. (1982), adequado para discriminar indivíduos obesos de acordo com a gravidade da compulsão alimentar periódica (CAP)¹⁰⁴. O questionário é composto por 16 itens com 62 afirmativas no total, das quais

se deve selecionar, em cada item, aquela que melhor representa a resposta do indivíduo. Cada afirmativa corresponde um número de pontos de 0 a 3, onde 0 corresponde a ausência e 3 gravidade máxima da ECAP, os escores foram fixados e classificados em 3 três subgrupos, CAP ausente (escore menor ou igual a 17 pontos), CAP moderada (escore de 18 a 26 pontos) e CAP grave (escore maior ou igual a 27 pontos); ainda, foi considerada CAP presente quando o escore foi maior que 17 pontos.

Foi utilizada a versão em português da escala proposta por Freitas et al. (2001)¹⁰⁵. A partir da ECAP adaptada de Freitas foi realizado uma simplificação dos termos utilizados para possibilitar sua utilização em crianças e adolescentes obesos, mantendo os mesmos pontos e a classificação da ECAP. Esta escala foi utilizada em estudo anteriormente realizada pelo grupo de estudo²⁴.

3.9- Estudo do gene do receptor secretagogo do hormônio do crescimento (*GHSR*)

A pesquisa genética foi desenvolvida no Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular (LIM 25) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. A genotipagem para determinação das variantes genéticas (SNPs) foi realizada em ácido desoxirribonucleico (DNA) extraído de leucócitos de sangue periférico previamente coletado e armazenado no banco de DNA.

3.9.1- Extração do DNA genômico

Esse procedimento seguiu o protocolo de Miller, Dykes e Polesky¹⁰⁶.

Foram coletados 10 ml de sangue venoso em tubos contendo ácido etilenodiamiotetracético (EDTA 25mM). O *pellet* leucocitário (botão de glóbulos brancos) foi obtido a partir da lise dos glóbulos vermelhos utilizando solução de lise hemácia (1mM NH₄HCO e 114mM NH₄Cl), com incubação a 4°C por 30 minutos, seguida de centrifugação do material a 3000rpm a 4°C por 15 minutos, desprezando o sobrenadante. Esse procedimento foi repetido mais uma vez.

O *pellet* foi então suspenso em 6 ml de tampão TEN, 120µL de sódio dodecil sulfato (SDS) 10% e 80 µL de proteinase K (100 µg/mL) e incubado durante 18 horas a 37°C.

Após este intervalo, foi adicionado 2,4mL de cloreto de sódio (NaCl) saturado. Agitou-se vigorosamente a solução por 15 segundos e o material foi centrifugado por 15 minutos, a 3000 rpm. O sobrenadante contendo DNA desproteinizado foi transferido para outro tubo, adicionado dois volumes de etanol absoluto gelado e homogeneizado cuidadosamente por inversão. O DNA precipitado foi retirado do tubo e lavado duas vezes com etanol gelado a 70% e uma vez com etanol absoluto. Em seguida foi centrifugado a vácuo durante 5 minutos e ressuspenso em solução TE pH 8 (Tris-HCl 10 mM e EDTA 0,1mM).

A concentração do DNA foi estimada a partir da leitura da densidade óptica por espectrofotometria com luz ultravioleta (*Gene Quant pro RNA/DNA calculator*, *Pharmacia Biotech*, Cambridge, England). O grau de pureza foi

avaliado pela relação de absorbância de 260 e 280nm, e a integridade do material verificada após eletroforese em gel de agarose a 1%. As amostras foram armazenadas até sua utilização.

3.9.2- Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) do exon 1 e exon 2 do gene do *GHSR*

As reações de PCR foram realizadas em volume final de 26 µL de reação, utilizando aproximadamente 250ng de DNA como *template*. Os *primers* utilizados estão nas tabelas abaixo:

Tabela 1: Primers para PCR do Exon 1 do gene do *GHSR*

Exon 1	Sense Reverse	Tamanho do fragmento (pb)
Primer (1F/1R)	5' TTCTCCAAGCATCCTCCCTA 3' 5' GAAGGCACAGGGAGAGGATA 3'	997
Primer Interno (1B/1R)	5' CAATTCGTCAGTGAGAGCTG 3' 5' GAAGGCACAGGGAGAGGATA 3'	520

Tabela 2: Primers para PCR do Exon 2 do gene do *GHSR*

Exon 2	Sense Reverse	Tamanho do fragmento (pb)
Primer (2F/2R)	5' CTGTGACATTTCTTGAGCTGAC 3' 5' TGTGCTATGTCTCCGGTTT 3'	382
Primer Interno (2F/2B)	5' CTGTGACATTTCTTGAGCTGAC 3' 5' ACATGTTGTAGTACAGGTTC 3'	200

Para o exon 1, as reações de PCR continham: PCR *buffer* (INVITROGEN Life Technologies) 1X concentração final, 50 mM cloreto de magnésio (MgCl₂) (INVITROGEN Life Technologies), 100 mM dNTP Mix (GIBCO Life Technologies), 20 pmol de cada *primer* (Tabela 1) e 1,25 U de *Go Taq DNA Polymerase* (PROMEGA Life Technologies). Incubamos as amostras durante 5 minutos a 94°C para a denaturaçã o das dupla-fitas de DNA em termociclador (Gene Amp PCR System 9600, Perkin-Elmer, EUA). A seguir, submetemos as mesmas a 35 ciclos (45 segundos a 94°C, 30 segundos a 56°C e 1 minuto a 72°C) e, após o último ciclo, realizamos a etapa de extensão final por 10 minutos a 72°C.

Para o exon 2, as reações de PCR continham: PCR *buffer* (INVITROGEN Life Technologies) 1X concentração final, 50 mM cloreto de magnésio (MgCl₂) (INVITROGEN Life Technologies), 100 mM dNTP Mix (GIBCO Life Technologies), 20 pmol de cada *primer* (Tabela 2) e 1,25 U de *Go Taq DNA Polymerase* (PROMEGA Life Technologies). Incubamos as amostras durante 5 minutos a 94°C para a denaturaçã o das dupla-fitas de DNA em termociclador (Gene Amp PCR System 9600, Perkin-Elmer, EUA). A seguir, submetemos as mesmas a 35 ciclos (45 segundos a 94°C, 30 segundos a 56°C e 1 minuto a 72°C) e, após o último ciclo, realizamos a etapa de extensão final por 10 minutos a 72°C.

Foram realizados os géis de agarose a 2% para demonstrar os produtos da reação de PCR para o exon 1 e exon 2 do *GHSR*.

3.9.3- Sequenciamento dos produtos de PCR do exon 1 e exon 2 do gene do *GHSR*

O sequenciamento foi realizado no LIM-25 em sequenciador automático ABI PRISM 3130 XL Genetic Analyser, Applied Biosystems Foster City, USA. Para a avaliação das variações genéticas no *GHSR* foi utilizado a sequência genômica obtida Ensembl⁸¹.

3.10- Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa SPSS software vs 14 (Statistical Package for Social Science Inc., Chicago, Illinois, USA).

As variáveis contínuas foram expressas como média e desvio padrão da média e as variáveis categóricas foram expressas como número de casos e porcentagem de indivíduos afetados dentre os avaliados para a variável.

Utilizamos o programa Helix TreeTM para calcular o Equilíbrio de Hardy-Weinberg. As análises foram feitas no modelo dominante e recessivo.

O teste do quiquadrado (χ^2) de Pearson foi utilizado para avaliar a frequência dos polimorfismos entre os pacientes obesos e eutróficos, as diferenças clínicas iniciais entre os dois grupos estudados, bem como a associação entre os genótipos das variantes no gene do *GHSR* e as variáveis antropométricas, de composição corporal, clínicas, dietética, laboratoriais e metabólicas.

A magnitude do risco conferido por cada variável significativamente

diferente foi estimada usando *Odds Ratio* (OR) com intervalo de confiança (IC) de 95%. Foi realizado o OR por regressão logística para possíveis fatores de confusão: sexo e estadio puberal. O nível de significância adotado (p) foi $<0,05$.

RESULTADOS

4- RESULTADOS

4.1- Avaliação da população de estudo

Foram feitas análises dos dados iniciais de 422 crianças e adolescentes obesos (CAO) e 96 crianças e adolescentes eutróficos (CAE).

As variáveis clínicas analisadas nas CAO e CAE estão descritas na tabela 3.

Tabela 3: Análise das variáveis clínicas nas CAO e CAE.

Variável	CAO (n= 422)	CAE (n= 96)	p
Sexo F/M (%) [*]	62,8/37,2	57,3/42,7	0,32
Estadio puberal PP/PUB (%) [*]	54,2/45,8	45,6/54,4	0,14
Idade (anos)	10,7 (± 1,43)	10,6 (± 1,51)	0,56
Peso (kg)	69,3 (± 16,2)	35,1 (± 8,44)	<0,001
Z peso	2,50 (± 0,51)	-0,14 (± 0,92)	<0,001
Altura (cm)	149,7 (± 9,84)	142,9 (± 10,0)	<0,001
Z altura	1,03 (± 1,02)	0,13 (± 0,98)	<0,001
IMC (Kg/m ²)	30,6 (± 4,60)	17,0 (± 2,40)	<0,001
Z IMC	2,32 (± 0,28)	-0,29 (± 0,99)	<0,001
CA (cm)	96,9 (± 10,9)	63,3 (± 7,60)	<0,001
Massa Gorda (%)	36,9 (± 4,34)	18,4 (± 6,05)	<0,001
PAS (mmHg)	111,9 (± 13,7)	102,6 (± 12,5)	<0,001
PAD (mmHg)	69,3 (± 11,4)	67,0 (± 11,7)	0,08

Dados apresentados: média (± desvio padrão). ^{*} % dos casos observados.

Não houve diferença na frequência de sexo e estadio puberal, e na distribuição das idades entre os dois grupos estudados. Todas as variáveis laboratoriais mostraram-se diferentes estatisticamente entre as CAO e CAE. Analisando a pressão arterial observamos diferença estatisticamente significativa para a PAS, mas não para a PAD (69,3 mmHg vs 67,0 mmHg, $p=0,08$).

A ingestão calórica e o risco de compulsão alimentar foram mensurados e estão apresentados na tabela 4, observamos diferenças estatisticamente significante nas variáveis analisadas entre as CAO e CAE.

Tabela 4: Análise da ingestão calórica e do risco de compulsão alimentar nas CAO e CAE.

Variável	CAO (n= 214)	CAE (n= 77)	p
Calorias (Kcal)	2065,5 ($\pm$ 650,8)	1814,5 ($\pm$ 584,6)	0,003
Escore CAP	15,8 ($\pm$ 7,76)	6,95 ($\pm$ 5,29)	<0,001
Com risco de CAP (%) [*]	41,1%	2,40%	<0,001

Dados apresentados: média ($\pm$ desvio padrão). * % dos casos observados.

Resultados

As variáveis laboratoriais e metabólicas analisadas estão apresentadas na tabela 5, observamos diferenças significantes entre os dois grupos (CAO e CAE) para todas as variáveis, exceto colesterol total (159,3 mg/dL vs 156,4 mg/dL, $p=0,37$).

Tabela 5: Análise das variáveis laboratoriais e metabólicas nas CAO e CAE.

Variável	CAO (n= 422)	CAE (n= 96)	p
Glicemia (mg/dL)	87,0 ($\pm 7,86$)	82,7 ($\pm 7,43$)	<0,001
Insulina (mU/L)	18,4 ($\pm 10,4$)	5,02 ($\pm 3,01$)	<0,001
Ácido úrico (mg/dL)	5,01 ($\pm 1,09$)	3,88 ($\pm 0,88$)	<0,001
Colesterol total (mg/dL)	159,3 ($\pm 30,2$)	156,4 ($\pm 24,8$)	0,37
LDL (mg/dL)	96,4 ($\pm 27,0$)	85,3 ($\pm 20,4$)	<0,001
HDL (mg/dL)	42,0 ($\pm 9,23$)	57,9 ($\pm 12,4$)	<0,001
Triglicérides (mg/dL)	103,7 ($\pm 46,9$)	66,2 ($\pm 23,0$)	<0,001
Adiponectina ($\mu\text{g/mL}$)	12,5 ($\pm 5,58$)	15,1 ($\pm 4,98$)	0,001
Leptina (ng/mL)	41,1 ($\pm 20,4$)	5,45 ($\pm 4,47$)	<0,001
Hiperinsulinemia (%)*	41,9	0	<0,001
HOMA-IR	4,00 ($\pm 2,36$)	1,04 ($\pm 0,64$)	<0,001
HOMA%S	46,4 ($\pm 25,2$)	157,1 ($\pm 59,0$)	<0,001
HOMA% β	190,7 ($\pm 70,0$)	90,4 ($\pm 32,8$)	<0,001
AUCgli (mg/dL/120 min)	13671 (± 2252)	na	na
AUCins ($\mu\text{UI/dL/120 min}$)	13355 (± 8677)	na	na
AUCins/AUCgli	124,4 ($\pm 51,4$)	na	na

Dados apresentados: média ($\pm$ desvio padrão). * % dos casos observados.
na: não avaliado.

A tabela 6 apresenta as frequências dos parâmetros utilizados para o diagnóstico da SM e a frequência da SM, observamos diferenças significantes em todos os parâmetros analisados entre os dois grupos (CAO e CAE).

Tabela 6: Análise da frequência de SM e de seus parâmetros nas CAO e CAE.

Parâmetro	CAO (n= 422)	CAE (n= 96)	p
CA $\geq$ p90	98,1	4,30	<0,001
Glicemia $\geq$ 100 mg/dL	6,30	1,00	0,04
HDL < 40 mg/dL	48,1	4,20	<0,001
TG $\geq$ 110 mg/dL	35,9	5,20	<0,001
HAS (PA > p90)	44,3	31,5	0,02
SM	42,6	1,10	<0,001

Dados apresentados em percentual de casos observados.

4.2- Avaliação do gene do receptor secretagogo do hormônio do crescimento (*GHSR*)

Foram descritas até o presente momento 42 variantes no exon 1 e no exon 2 do gene do *GHSR*⁸¹ (Anexo 3), todas estas variantes foram avaliadas na nossa casuística e são apresentadas à seguir.

4.2.1- Variante rs2232165 (60 C/T)

A distribuição dos genótipos da variante rs2232165 (60 C/T) na população estudada foi consistente com o equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW) ($p= 0,16$) (tabela 7). Não houve diferença na frequência de sexo e

estadio puberal, e na distribuição das idades segundo os genótipos da variante rs2232165 (60 C/T).

Tabela 7: Frequência dos genótipos da variante rs2232165 (60 C/T) no exon 1 do *GHSR* nas CAO e CAE.

Genótipo variante rs2232165	Total (n= 476)	CAO (n= 381)	CAE (n= 95)
CC (%)	92,2	92,4	91,6
CT (%)	7,40	7,10	8,40
TT (%)	0,40	0,50	0,00

Análise de acordo com obesidade e variáveis antropométricas, de composição corporal e clínicas

A análise da associação dos genótipos da variante rs2232165 (60 C/T) à obesidade ($IMC \geq p95$) não evidenciou diferenças significantes entre os grupos de CAO ($IMC \geq p95$) e de CAE ($IMC < p85$) ($p = 0,79$), também não foi observado resultado significativo segundo sexo e estadio puberal.

Nas CAO, avaliamos a influência da variante rs2232165 (60 C/T) nas variáveis antropométricas, de composição corporal e clínicas. Os indivíduos foram divididos em dois grupos de acordo com a presença ou não do alelo T (CC e CT/TT). Não foi observada nenhuma diferença significativa nestas variáveis analisadas segundo os genótipos da variante rs2232165 (60 C/T) (tabela 8).

Tabela 8: Análise das variáveis antropométricas, de composição corporal e clínicas segundo genótipo da variante rs2232165 (60 C/T) nas CAO.

Variável	CC (n= 352)	CT/TT (n= 29)	p
Sexo F/M (%)*	63,9/36,1	69,0/31,0	0,59
Estadio puberal PP/PUB (%)*	52,0/48,0	65,5/34,5	0,16
Idade (anos)	10,7 ($\pm$ 1,35)	10,5 ($\pm$ 1,57)	0,54
Peso (kg)	70,1 ($\pm$ 16,2)	64,3 ($\pm$ 15,2)	0,06
Z peso	2,53 ($\pm$ 0,50)	2,36 ($\pm$ 0,44)	0,08
Altura (cm)	150,0 ($\pm$ 9,74)	147,1 ($\pm$ 10,3)	0,13
Z altura	1,09 ($\pm$ 0,99)	0,81 ($\pm$ 0,78)	0,13
IMC (Kg/m ²)	30,8 ($\pm$ 4,65)	29,2 ($\pm$ 3,79)	0,08
Z IMC	2,33 ($\pm$ 0,28)	2,26 ($\pm$ 0,25)	0,20
CA (cm)	97,4 ($\pm$ 10,8)	94,7 ($\pm$ 11,8)	0,23
Massa Magra (kg)	43,6 ($\pm$ 9,18)	40,3 ($\pm$ 8,80)	0,06
Massa Gorda (kg)	26,1 ($\pm$ 7,96)	23,4 ($\pm$ 7,00)	0,08
Massa Gorda (%)	37,0 ($\pm$ 4,33)	36,4 ($\pm$ 3,63)	0,47
PAS (mmHg)	112,1 ($\pm$ 13,8)	111,1 ($\pm$ 14,0)	0,72
PAD (mmHg)	69,5 ($\pm$ 11,8)	67,6 ($\pm$ 8,82)	0,40

Dados apresentados: média ($\pm$ desvio padrão).

Ao avaliar as CAO segundo o sexo, observamos que os pacientes do sexo masculino com genótipo CC estavam associados aos maiores valores de Z altura quando comparados aos pacientes com genótipo CT/TT ($1,21 \pm 1,04$ vs $0,42 \pm 1,01$; $p= 0,03$).

Análise de acordo com compulsão alimentar periódica e variáveis dietéticas

A análise da associação dos genótipos da variante rs2232165 (60 C/T) com o risco de CAP nas CAO não evidenciou diferenças significantes entre os grupos sem risco de CAP (escore $\leq$ 17) e com risco de CAP (escore $>$ 17) ($p = 0,85$), também não foi observado resultado significativo segundo sexo e estadio puberal.

Analizamos nas CAO a influência da variante rs2232165 (60 C/T) nas variáveis dietéticas, para tal, as crianças foram divididas em dois grupos de acordo com a presença ou não do alelo T (CC e CT/TT). Não observamos nenhum resultado significativo nesta análise (tabela 9).

Tabela 9: Análise das variáveis dietéticas segundo genótipo da variante rs2232165 (60 C/T) nas CAO.

Variável	CC (n= 181)	CT/TT (n= 15)	p
Calorias (Kcal)	2080,4 ($\pm$ 660,7)	1953,5 ($\pm$ 727,8)	0,49
Ingestão de Carboidrato (g)	257,8 ($\pm$ 90,1)	227,9 ($\pm$ 66,1)	0,23
Ingestão de Carboidrato (%VET)	50,0 ($\pm$ 8,57)	49,1 ($\pm$ 13,1)	0,71
Ingestão de Proteína (g)	81,6 ($\pm$ 30,3)	90,8 ($\pm$ 39,5)	0,29
Ingestão de Proteína (%VET)	16,1 ($\pm$ 4,13)	18,4 ($\pm$ 6,08)	0,18
Ingestão de Lipídeos (g)	80,2 ($\pm$ 34,9)	77,3 ($\pm$ 46,2)	0,78
Ingestão de Lipídeos(%VET)	33,1 ($\pm$ 7,65)	31,1 ($\pm$ 9,56)	0,37
Escore CAP	16,0 ($\pm$ 7,85)	15,4 ($\pm$ 7,96)	0,78
Com risco de CAP (%) [*]	42,5	40,0	0,85

Dados apresentados: média ($\pm$ desvio padrão). ^{*} % dos casos observados.

Análise de acordo com síndrome metabólica e variáveis laboratoriais.

A análise da associação dos genótipos da variante rs2232165 (60 C/T) ao SM nas CAO não evidenciou diferenças significantes entre os grupos com e sem diagnóstico de SM ($p= 0,20$), também não foi observado resultado significativo segundo sexo e estadio puberal.

Nas CAO, avaliamos a influência da variante rs2232165 (60 C/T) nos parâmetros para diagnóstico de SM e nas variáveis laboratoriais, para isso, as crianças foram divididas em dois grupos de acordo com a presença ou não do alelo T (CC e CT/TT). Não observamos nenhum resultado significativo nesta avaliação (tabela 10).

Tabela 10: Análise das variáveis laboratoriais e metabólicas segundo genótipo da variante rs2232165 (60C/T) nas CAO.

Variável	CC (n= 349)	CT/TT (n= 29)	p
CA $\geq$ p90*	98,9	96,3	0,26
Glicemia $\geq$ 100 mg/dL *	6,60	3,40	0,50
HDL < 40 mg/dL *	47,4	51,7	0,66
TG $\geq$ 110 mg/dL *	37,7	24,1	0,14
HAS (PA > p90)*	46,2	37,0	0,36
SM*	43,6	30,8	0,20
Glicemia (mg/dL)	87,1 ($\pm$ 8,04)	85,5 ($\pm$ 7,61)	0,30
Insulina (mU/L)	18,6 ($\pm$ 10,4)	16,9 ($\pm$ 8,74)	0,33
Ácido úrico (mg/dL)	5,03 ($\pm$ 1,04)	5,06 ($\pm$ 1,28)	0,90
Colesterol total (mg/dL)	158,7 ($\pm$ 30,2)	160,6 ($\pm$ 26,5)	0,74
LDL c (mg/dL)	95,7 ($\pm$ 26,9)	99,7 ($\pm$ 25,7)	0,44
HDL c (mg/dL)	41,8 ($\pm$ 9,02)	41,2 ($\pm$ 8,39)	0,70
Triglicérides (mg/dL)	104,5 ($\pm$ 46,7)	98,0 ($\pm$ 43,3)	0,47
Adiponectina (μ g/mL)	12,2 ($\pm$ 5,36)	15,5 ($\pm$ 8,03)	0,08
Leptina (ng/mL)	41,5 ($\pm$ 20,8)	38,0 ($\pm$ 16,4)	0,39
Hiperinsulinemia*	42,5	41,4	0,90
HOMA-IR	4,05 ($\pm$ 2,38)	3,52 ($\pm$ 1,91)	0,25
HOMA%S	45,1 ($\pm$ 25,4)	53,4 ($\pm$ 23,9)	0,41
HOMA% β	189,7 ($\pm$ 68,6)	198,9 ($\pm$ 75,4)	0,74
AUCgli (mg/dL/120 min)	13679 ($\pm$ 2277)	13317 ($\pm$ 2314)	0,42
AUCins (μ UI/dL/120 min)	13514 ($\pm$ 8765)	11358 ($\pm$ 6665)	0,21
AUCins/AUCgli	120,3 ($\pm$ 67,8)	103,6 ($\pm$ 53,9)	0,20

Dados apresentados: média ($\pm$ desvio padrão). * % dos casos observados.

4.2.2- Variante rs2232166 (144 C/T)

A distribuição dos genótipos da variante rs2232166 (144 C/T) na população de estudo estava em equilíbrio de HW ($p= 0,89$). Foi observado nas CAO o genótipo CT em 5 (1,30%) pacientes dos 381 analisados, e nas 95 CAE foi observado o genótipo CT em apenas uma paciente (1,05%).

Os resultados das variáveis clínicas, antropométricas e de composição corporal das cinco CAO com genótipo CT estão apresentados na tabela 11. Observamos que todos os cinco pacientes apresentaram hipertensão arterial e $CA > p90$.

Tabela 11: Descrição das variáveis clínicas, antropométricas e de composição corporal das cinco CAO com genótipo CT da variante rs2232166 (144 C/T).

Variável	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3	Paciente 4	Paciente 5
Sexo	Feminino	Feminino	Masculino	Feminino	Feminino
Estadio puberal	Pré-púbere	Pré-púbere	Púbere	Púbere	Pré-púbere
Idade (anos)	8,23	10,5	11,1	11,0	10,2
Peso (kg)	58,9	64,5	70,0	66,7	55,5
Z peso	3,06	2,40	2,53	2,33	2,08
Altura (cm)	136,5	140,7	160,5	140,0	143,9
Z altura	1,25	-0,04	2,29	-0,52	0,73
Z altura mãe	na	-2,03	2,13	-1,87	-0,53
Z altura pai	na	-2,51	0,50	na	na
IMC (Kg/m ²)	31,6	32,6	27,2	34,0	26,8
Z IMC	2,71	2,50	2,11	2,54	2,11
IMC mãe (Kg/m ²)	na	25,8	25,5	30,3	35,8
IMC pai (Kg/m ²)	na	na	27,4	na	na
CA (cm)	94,5	108,0	91,0	104,0	84,0
Massa Gorda (%)	37,0	40,0	33,0	43,0	35,0
PAS (mmHg)	150,0	130,0	120,0	110,0	110,0
PAD (mmHg)	90,0	80,0	60,0	85,0	76,0

O genótipo CT da variante rs2232166 (144 C/T) foi observado em uma paciente eutrófica do sexo feminino, púbere e com 13,4 anos. Na avaliação antropométrica a paciente apresentou 49,0Kg, 0,17 de Z peso, 161,8 cm de altura, 0,45 de Z altura, -0,70 de Z altura da mãe, -1,46 de Z altura do pai, 18,7 Kg/m² de IMC, -0,09 de Z IMC, 70,5 cm de CA e 8,00% de

massa gorda. A avaliação da pressão arterial mostrou PAS de 105,0 mmHg e PAD de 65,0 mmHg.

Os dados do consumo alimentar e do comportamento alimentar foram avaliados em duas (paciente 4 e paciente 5) das cinco CAO com genótipo CT da variante rs2232166 (144 C/T) e estão apresentados na tabela 12.

Tabela 12: Descrição das variáveis do consumo alimentar e do comportamento alimentar de duas CAO com genótipo CT da variante rs2232166 (144 C/T).

Variável	Paciente 4	Paciente 5
Calorias (Kcal)	2.140,3	2.836,8
Ingestão de Carboidrato (g)	288,3	346,2
Ingestão de Carboidrato (%VET)	53,8	48,6
Ingestão de Proteína (g)	78,0	94,7
Ingestão de Proteína (%VET)	14,7	13,2
Ingestão de Lipídeos (g)	75,2	121,5
Ingestão de Lipídeos (%VET)	31,5	38,2
Escore CAP	23,0	19,0

A avaliação dietética da paciente eutrófica com genótipo CT da variante rs2232166 (144 C/T) mostrou ingestão de 1947,1 Kcal, 322,8 gramas (65,9% do VET) de carboidrato, 97,8 gramas (20,0% do VET) de proteína e 30,7 gramas (14,1% do VET) de lipídeos. Não foi avaliado o comportamento alimentar desta paciente.

Resultados

A tabela 13 apresenta os resultados das variáveis laboratoriais das cinco CAO com genótipo CT da variante rs2232166 (144 C/T).

Tabela 13: Descrição das variáveis laboratoriais das cinco CAO com genótipo CT da variante rs2232166 (144 C/T).

Variável	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3	Paciente 4	Paciente 5
Glicemia (mg/dL)	78,0	89,0	92,0	94,0	103,0
Insulina (mU/L)	14,8	11,9	7,20	20,5	24,4
Ácido úrico (mg/dL)	4,80	6,10	5,20	4,30	4,10
Colesterol total (mg/dL)	152,0	158,0	114,0	173,0	151,0
LDL c (mg/dL)	81,0	105,0	66,0	102,0	82,0
HDL c (mg/dL)	29,0	36,0	38,0	51,0	34,0
Triglicérides (mg/dL)	211,0	84,0	50,0	98,0	174,0
Adiponectina (µg/mL)	12,9	10,6	21,3	na	na
Leptina (ng/mL)	59,2	63,0	29,6	79,9	34,1
HOMA-IR	2,85	2,61	1,63	4,75	6,20
HOMA%S	54,8	130,9	87,2	170,4	161,5
HOMA%β	196,8	65,4	106,2	38,0	31,5
AUCgli (mg/dL/120 min)	10905	18000	12855	12795	16620
AUCins (µUI/dL/120 min)	11866	7717	6576	8041	na
AUCins/AUCgli	136,2	53,7	64,0	78,6	na

na: não avaliado

Analisando as variáveis metabólicas, observamos que a paciente 4 e a paciente 5 apresentaram hiperinsulinemia (40,0%) e todos os cinco exceto a paciente 4 tinham diagnóstico de SM (80,0%).

A avaliação laboratorial da paciente eutrófica com genótipo CT da variante rs2232166 (144 C/T) resultou em glicemia: 78,0 mg/dL, insulina: 2,80 mU/L, ácido úrico: 4,10 mg/dL, colesterol total: 143,0 mg/dL, LDL c: 78,0 mg/dL, HDL c: 56 mg/dL, triglicérides: 46,0 mg/dL, adiponectina: 16,1 µg/mL, leptina: 1,16 ng/mL e HOMA-IR: 0,54. Não foi feito a avaliação do HOMA%S e HOMA%β pois a insulina estava abaixo de 2,90 mU/L. A AUC de glicemia e de insulina não foi calculada, pois não foi feito o TOTG desta paciente.

Não foi feito estudo de associação entre os genótipos da variante rs2232166 (144 C/T) e as variáveis analisadas devido à baixa casuística para permitir poder estatístico.

4.2.3- Variante rs495225 (171 C/T)

A distribuição dos genótipos da variante rs495225 (171 C/T) na população estudada foi consistente com o equilíbrio de HW ($p = 0,06$) (tabela 14). Não houve diferença na frequência de sexo e estadio puberal, e na distribuição das idades segundo os genótipos da variante rs495225 (171 C/T) em nenhuma das duas populações.

Tabela 14: Frequência dos genótipos da variante rs495225 (171 C/T) no exon 1 do *GHSR* nas CAO e CAE.

Genótipo variante rs495225	Total (n= 476)	CAO (n= 381)	CAE (n= 95)
CC (%)	18,7	18,9	17,9
CT (%)	44,1	43,6	46,3
TT (%)	37,2	37,5	35,8

Análise de acordo com obesidade e variáveis antropométricas, de composição corporal e clínicas

A análise da associação dos genótipos da variante rs495225 (171 C/T) com obesidade ($IMC \geq p95$) não evidenciou diferenças significantes entre os grupos de CAO ($IMC \geq p95$) e de CAE ($IMC < p85$) em nenhum dos modelos avaliados ($p = 0,72$), também não foi observado resultado significativo segundo sexo e estadio puberal.

Nas CAO, avaliamos a influência da variante rs495225 (171 C/T) nas variáveis antropométricas, de composição corporal e clínicas. Foi utilizado o modelo recessivo e os indivíduos foram divididos em dois grupos de acordo com a presença do alelo C (CC/CT e TT). Não foi observada nenhuma diferença significativa nestas variáveis analisadas segundo os genótipos da variante rs495225 (171 C/T) (tabela 15).

Tabela 15: Análise das variáveis antropométricas, de composição corporal e clínicas segundo genótipo da variante rs495225 (171 C/T) nas CAO.

Variável	CC/CT (n= 237)	TT (n= 144)	p
Sexo F/M (%)*	62,9/37,1	66,7/33,3	0,45
Estadio puberal PP/PUB (%)*	56,1/43,9	47,9/52,1	0,12
Idade (anos)	10,6 (± 1,40)	10,8 (± 1,30)	0,11
Peso (kg)	68,9 (± 16,2)	70,9 (± 16,1)	0,24
Z peso	2,52 (± 0,50)	2,52 (± 0,49)	0,92
Altura (cm)	149,3 (± 9,60)	150,7 (± 10,1)	0,16
Z altura	1,07 (± 0,97)	1,07 (± 0,99)	0,97
IMC (Kg/m ²)	30,5 (± 4,71)	30,9 (± 4,44)	0,48
Z IMC	2,33 (± 0,28)	2,33 (± 0,27)	0,99
CA (cm)	97,1 (± 11,2)	97,3 (± 10,3)	0,90
Massa Magra (kg)	42,8 (± 9,02)	44,1 (± 9,43)	0,21
Massa Gorda (kg)	25,5 (± 8,02)	26,4 (± 7,75)	0,26
Massa Gorda (%)	36,8 (± 4,41)	37,2 (± 4,06)	0,33
PAS (mmHg)	111,4 (± 13,8)	113,1 (± 13,8)	0,26
PAD (mmHg)	69,3 (± 11,5)	69,5 (± 11,9)	0,92

Dados apresentados: média (± desvio padrão).

Análise de acordo com compulsão alimentar periódica e variáveis dietéticas

A análise da associação dos genótipos da variante rs495225 (171 C/T) com o risco de CAP nas CAO não evidenciou diferenças significantes entre os grupos sem risco de CAP (escore ≤ 17) e com risco de CAP (escore > 17) (p= 0,24), também não foi observado resultado significativo segundo sexo e estadio puberal.

Avaliamos nas CAO a influência da variante rs495225 (171 C/T) nas variáveis dietéticas, para tal, as crianças foram divididas em dois grupos de acordo com a presença ou não do alelo C (CC/CT e TT). Foi observado que os pacientes obesos com o genótipo CC/CT apresentaram maiores valores médios de ingestão de carboidrato em gramas e em porcentagem do VET quando comparados com os casos com genótipo TT (tabela 16).

Tabela 16: Análise das variáveis dietéticas segundo genótipo da variante rs495225 (171 C/T) nas CAO.

Variável	CC/CT (n= 111)	TT (n= 85)	p
Calorias (Kcal)	2141,1 (± 704,3)	1971,8 (± 595,9)	0,09
Ingestão de Carboidrato (g)	271,0 (± 92,5)	233,8 (± 78,5)	0,005
Ingestão de Carboidrato (%VET)	51,5 (± 8,40)	47,9 (± 9,35)	0,008
Ingestão de Proteína (g)	83,7 (± 33,2)	80,5 (± 27,9)	0,49
Ingestão de Proteína (%VET)	15,9 (± 4,53)	16,8 (± 4,02)	0,18
Ingestão de Lipídeos (g)	81,5 (± 36,8)	77,8 (± 34,5)	0,49
Ingestão de Lipídeos(%VET)	32,6 (± 7,81)	33,3 (± 7,82)	0,59
Escore CAP	16,6 (± 7,87)	15,0 (± 7,74)	0,16
Com risco de CAP (%)*	45,9	37,6	0,24

Dados apresentados: média (± desvio padrão). * % dos casos observados.

Ao avaliar as CAO segundo o sexo, observamos que as pacientes do sexo feminino com genótipo CC/CT da variante rs495225 (171 C/T) estavam associadas a maiores valores no escore de CAP quando comparadas às pacientes com genótipo TT ($17,0 \pm 8,02$ vs $14,5 \pm 6,91$; $p=0,05$). No entanto, não observamos maior risco de CAP nas meninas com genótipo CC/CT quando comparadas às meninas com o genótipo TT (48,8% vs 35,9%, OR=

0,60; IC 95% 0,30 - 1,18; $p= 0,14$), também não foi observada diferença quando feito o ajuste para idade e estadio puberal.

Análise de acordo com síndrome metabólica e variáveis laboratoriais.

A análise da associação dos genótipos da variante rs495225 (171 C/T) com SM nas CAO não evidenciou diferenças significantes entre os grupos com e sem diagnóstico de SM ($p= 0,08$), também não foi observado resultado significativo segundo sexo e estadio puberal.

Quando foi feita a análise no modelo recessivo da casuística separada por sexo encontrou-se uma maior frequência do genótipo TT nos pacientes do sexo masculino com SM (OR: 2,41; IC 95% 1,16-5,13; $p=0,04$) (tabela 17).

Tabela 17: Distribuição da frequência dos genótipo TT da variante rs495225 (171 C/T) nas CAO do sexo masculino, de acordo com o diagnóstico de SM.

Genótipo	Com SM	Sem SM	p
TT	27/57 (47,4%)	19/70 (27,1%)	0,04

Nas CAO, avaliamos a influência da variante rs495225 (171 C/T) nos parâmetros para diagnóstico de SM e nas variáveis laboratoriais, as crianças foram divididas em dois grupos de acordo com a presença ou não do alelo C (CC/CT e TT). Foi observado que os pacientes com o genótipo CC/CT apresentaram menores valores médios de insulina, HOMA-IR, HOMA % β , AUCinsulina e AUCins/AUCgli quando comparados com os casos com o

genótipo TT. A análise no modelo recessivo da casuística mostrou uma maior frequência do genótipo TT nos pacientes com triglicérides aumentado (TG $\geq$ 110 mg/dL) (OR: 1,97; IC 95% 1,28 - 3,03; p= 0,002) (tabela 18).

Tabela 18: Análise das variáveis laboratoriais e metabólicas segundo genótipo da variante rs495225 (171 C/T) nas CAO.

Variável	CC/CT (n= 235)	TT (n= 144)	p
CA $\geq$ p90*	98,3	99,3	0,41
Glicemia $\geq$ 100 mg/dL *	4,70	9,00	0,09
HDL < 40 mg/dL *	48,1	47,2	0,87
TG $\geq$ 110 mg/dL*	30,6	46,5	0,002
HAS (PA > p90)*	46,3	44,3	0,70
SM*	39,1	48,6	0,08
Glicemia (mg/dL)	86,5 ($\pm$ 7,27)	87,7 ($\pm$ 9,07)	0,19
Insulina (mU/L)	17,5 ($\pm$ 9,29)	20,1 ($\pm$ 11,7)	0,02
Ácido úrico (mg/dL)	5,01 ($\pm$ 1,01)	5,08 ($\pm$ 1,12)	0,53
Colesterol total (mg/dL)	158,9 ($\pm$ 31,3)	158,7 ($\pm$ 27,5)	0,93
LDL c (mg/dL)	97,0 ($\pm$ 27,5)	94,3 ($\pm$ 25,5)	0,34
HDL c (mg/dL)	41,7 ($\pm$ 8,76)	42,0 ($\pm$ 9,33)	0,74
Triglicérides (mg/dL)	101,0 ($\pm$ 44,7)	109,0 ($\pm$ 48,9)	0,10
Adiponectina (μ g/mL)	12,9 ($\pm$ 5,82)	11,8 ($\pm$ 5,37)	0,14
Leptina (ng/mL)	41,1 ($\pm$ 20,8)	41,3 ($\pm$ 20,1)	0,94
Hiperinsulinemia*	39,3	47,6	0,12
HOMA-IR	3,75 ($\pm$ 2,00)	4,43 ($\pm$ 2,79)	0,01
HOMA%S	51,4 ($\pm$ 29,1)	38,5 ($\pm$ 16,9)	0,38
HOMA%β	184,8 ($\pm$ 69,4)	197,9 ($\pm$ 68,0)	0,02
AUCgli (mg/dL/120 min)	13491 ($\pm$ 2250)	13919 ($\pm$ 2309)	0,08
AUCins (μUI/dL/120 min)	12325 ($\pm$ 7552)	15023 ($\pm$ 9970)	0,01
AUCins/AUCgli	112,0 ($\pm$ 61,8)	130,3 ($\pm$ 73,2)	0,02

Dados apresentados: média ($\pm$ desvio padrão). * % dos casos observados.

Nesta casuística, avaliamos a influência da variante rs495225 (171 C/T) nos tempos do TOTG, as crianças foram divididas em dois grupos de acordo com a presença ou não do alelo C (CC/CT e TT) (Anexo 4). Com os dados obtidos, foram construídos os gráficos 1 e 2 que apresentam as médias da glicemia e insulina respectivamente nos tempos do TOTG segundo os genótipos da variante rs495225 (171 C/T). Não houve diferença entre os valores da glicose no TOTG. Entretanto, os pacientes com genótipo TT apresentaram uma maior secreção de insulina nos tempos basal, 60, 90 e 120 min quando comparado aos pacientes com genótipo CC/CT.

Gráfico 1: Médias da glicemia nos tempos do TOTG segundo os genótipos da variante rs495225 (171 C/T).

Gráfico 2: Médias da insulina nos tempos do TOTG segundo os genótipos da variante rs495225 (171 C/T).

4.2.4- Variante rs79053943 (271 C/T)

A distribuição dos genótipos da variante rs79053943 (271 C/T) na população de estudo estava em equilíbrio de HW ($p = 0,96$). Foi observado nas CAO o genótipo CT em dois (0,52%) pacientes dos 387 analisados, e nas 95 CAE analisadas não foi observado o genótipo CT.

Os resultados das variáveis clínicas, antropométricas e de composição corporal das duas CAO com genótipo CT estão apresentados na tabela 19. Observamos que ambos os pacientes apresentaram $CA > p90$ e foi feito diagnóstico de hipertensão arterial apenas no paciente 1.

Tabela 19: Descrição das variáveis clínicas, antropométricas e de composição corporal das duas CAO com genótipo CT da variante rs79053943 (271 C/T).

Variável	Paciente 1	Paciente 2
Sexo	Masculino	Feminino
Estadio puberal	Pré-púbere	Púbere
Idade (anos)	9,16	11,23
Peso (kg)	100,0	70,3
Z peso	3,62	2,42
Altura (cm)	156,0	158,2
Z altura	3,33	1,77
Z altura mãe	2,13	-0,03
Z altura pai	na	-0,25
IMC (Kg/m ²)	41,1	28,1
Z IMC	2,82	2,10
IMC mãe (Kg/m ²)	41,5	25,9
IMC pai (Kg/m ²)	na	30,7
CA (cm)	109,0	95,0
Massa Gorda (%)	44,0	34,0
PAS (mmHg)	129,0	110,0
PAD (mmHg)	73,0	61,0

na: não avaliado

Os resultados do consumo alimentar e do comportamento alimentar das duas CAO com genótipo CT da variante rs79053943 (271 C/T) são apresentados na tabela 20.

Tabela 20: Descrição das variáveis do consumo alimentar e do comportamento alimentar das duas CAO com genótipo CT da variante rs79053943 (271 C/T).

Variável	Paciente 1	Paciente 2
Calorias (Kcal)	1870,9	2781,2
Ingestão de Carboidrato (g)	281,9	378,6
Ingestão de Carboidrato (%VET)	60,6	59,2
Ingestão de Proteína (g)	65,6	74,0
Ingestão de Proteína (%VET)	14,0	11,6
Ingestão de Lipídeos (g)	52,5	82,9
Ingestão de Lipídeos(%VET)	25,4	29,2
Escore CAP	32,0	22,0

A tabela 21 apresenta os resultados das variáveis laboratoriais das duas CAO com genótipo CT.

Tabela 21: Descrição das variáveis laboratoriais das duas CAO com genótipo CT da variante rs79053943 (271 C/T).

Variável	Paciente 1	Paciente 2
Glicemia (mg/dL)	109,0	85,0
Insulina (mU/L)	20,5	26,0
Ácido úrico (mg/dL)	4,80	4,80
Colesterol total (mg/dL)	173,0	128,0
LDL c (mg/dL)	97,0	67,0
HDL c (mg/dL)	51,0	41,0
Triglicérides (mg/dL)	126,0	100,0
Adiponectina (µg/mL)	na	na
Leptina (ng/mL)	68,5	26,2
HOMA-IR	5,51	5,45
HOMA%S	36,7	31,1
HOMA%β	128,5	243,2
AUCgli (mg/dL/120 min)	13890	15135
AUCins (µUI/dL/120 min)	5433	14437
AUCins/AUCgli	48,9	119,4

na: não avaliado

Analisando as variáveis metabólicas, as duas CAO apresentaram hiperinsulinemia (100,0%) e apenas o paciente 1 apresentou diagnóstico de SM (50,0%).

Não foi feito estudo de associação entre os genótipos da variante rs79053943 (271 C/T) com as variáveis analisadas devido à baixa casuística para permitir poder estatístico.

4.2.5- Variante rs2232168 (432 C/T)

A distribuição dos genótipos da variante rs2232168 (432 C/T) na população de estudo estava em equilíbrio de HW ($p= 0,96$). Foi observado nas CAO o genótipo CT em dois (0,53%) pacientes dos 377 analisados, e nas 95 CAE analisadas não foi observado o genótipo CT.

Os resultados das variáveis clínicas, antropométricas e de composição corporal das duas CAO com genótipo CT estão apresentados na tabela 22. Observamos que ambos os pacientes apresentaram $CA > p90$ e apenas a paciente 1 tinha diagnóstico de hipertensão arterial.

Tabela 22: Descrição das variáveis clínicas, antropométricas e de composição corporal das duas CAO com genótipo CT da variante rs2232168 (432 C/T).

Variável	Paciente 1	Paciente 2
Sexo	Feminino	Masculino
Estadio puberal	Pubere	Pré-pubere
Idade (anos)	12,6	10,4
Peso (kg)	86,4	55,0
Z peso	2,54	2,10
Altura (cm)	163,0	145,4
Z altura	1,09	0,76
Z altura mãe	-1,20	-2,37
Z altura pai	-0,56	0,05
IMC (Kg/m ²)	32,5	26,0
Z IMC	2,28	2,10
IMC mãe (Kg/m ²)	30,7	37,2
IMC pai (Kg/m ²)	23,9	29,7
CA (cm)	101,0	92,0
Massa Gorda (%)	36,0	35,0
PAS (mmHg)	120,0	80,0
PAD (mmHg)	92,0	66,0

Os resultados do consumo alimentar e do comportamento alimentar das duas CAO com genótipo CT da variante rs2232168 (432 C/T) são apresentados na tabela 23.

Tabela 23: Descrição das variáveis do consumo alimentar e do comportamento alimentar das duas CAO com genótipo CT da variante rs2232168 (432 C/T).

Variável	Paciente 1	Paciente 2
Calorias (Kcal)	2640,2	1404,6
Ingestão de Carboidrato (g)	452,0	190,6
Ingestão de Carboidrato (%VET)	66,4	52,5
Ingestão de Proteína (g)	66,5	48,7
Ingestão de Proteína (%VET)	10,1	13,9
Ingestão de Lipídeos (g)	68,9	52,5
Ingestão de Lipídeos(%VET)	23,5	33,6
Escore CAP	25,0	8,0

A tabela 24 apresenta os resultados das variáveis laboratoriais das duas CAO com genótipo CT da variante rs2232168 (432 C/T).

Tabela 24: Descrição das variáveis laboratoriais das duas CAO com genótipo CT da variante rs2232168 (432 C/T).

Variável	Paciente 1	Paciente 2
Glicemia (mg/dL)	95,0	78,0
Insulina (mU/L)	23,4	14,8
Ácido úrico (mg/dL)	6,60	3,80
Colesterol total (mg/dL)	161,0	157,0
LDL c (mg/dL)	88,0	102,0
HDL c (mg/dL)	44,0	37,0
Triglicérides (mg/dL)	147,0	89,0
Adiponectina (µg/mL)	5,92	na
Leptina (ng/mL)	26,2	40,1
HOMA-IR	5,48	2,85
HOMA%S	182,9	196,8
HOMA%β	33,4	54,8
AUCgli (mg/dL/120 min)	13215	15465
AUCins (µUI/dL/120 min)	22912	6793
AUCins/AUCgli	217,0	55,0

na: não avaliado

Analisando as variáveis metabólicas observamos que apenas a paciente 1 apresentou quadro de hiperinsulinemia (50,0%) e SM (50,0%).

Não foi feito estudo de associação entre os genótipos da variante rs2232168 (432 C/T) com as variáveis analisadas devido à baixa casuística para permitir poder estatístico.

4.2.6- Variante rs2232169 (447 C/G)

A distribuição dos genótipos da variante rs2232169 (447 C/G) nas populações estudadas foi consistente com o equilíbrio de HW ($p= 0,68$) (tabela 25). Não houve diferença na frequência de sexo e estadio puberal, e na distribuição das idades segundo os genótipos desta variante nas CAO e nas CAE.

Tabela 25: Frequência dos genótipos da variante rs2232169 (447 C/G) no exon 1 do *GHSR* nas CAO e CAE.

Genótipo variante rs2232169	Total (n= 477)	CAO (n= 382)	CAE (n= 95)
CC (%)	92,7	92,9	91,7
CG (%)	7,10	6,80	8,30
GG (%)	0,20	0,30	0,00

Análise de acordo com obesidade e variáveis antropométricas, de composição corporal e clínicas

A análise da associação dos genótipos da variante rs2232169 (447 C/G) com obesidade ($IMC \geq p95$) não evidenciou diferenças significantes entre os grupos de CAO ($IMC \geq p95$) e de CAE ($IMC < p85$) em nenhum dos modelos avaliados ($p= 0,94$), também não foi observado resultado significativo segundo sexo e estadio puberal.

Avaliamos a influência da variante rs2232169 (447 C/G) nas variáveis antropométricas, de composição corporal e clínicas nas CAO. Os indivíduos foram divididos em dois grupos de acordo com a presença ou não do alelo G (CC e CG/GG). Não foi observada nenhuma diferença significativa nestas

variáveis analisadas segundo os genótipos da rs2232169 (447 C/G) (tabela 26).

Tabela 26: Análise das variáveis antropométricas, de composição corporal e clínicas segundo genótipo da variante rs2232169 (447 C/G) nas CAO.

Variável	CC (n= 355)	CG/GG (n= 27)	p
Sexo F/M (%)*	63,4/36,6	66,7/33,3	0,73
Estadio puberal PP/PUB (%)*	52,1/47,9	59,3/40,7	0,47
Idade (anos)	10,7 ($\pm$ 1,35)	10,7 ($\pm$ 1,59)	0,90
Peso (kg)	70,0 ($\pm$ 16,0)	67,4 ($\pm$ 17,2)	0,43
Z peso	2,53 ($\pm$ 0,51)	2,45 ($\pm$ 0,46)	0,43
Altura (cm)	149,9 ($\pm$ 9,59)	149,7 ($\pm$ 10,9)	0,88
Z altura	1,07 ($\pm$ 1,01)	1,04 ($\pm$ 0,85)	0,90
IMC (Kg/m ²)	30,8 ($\pm$ 4,60)	29,6 ($\pm$ 3,82)	0,19
Z IMC	2,33 ($\pm$ 0,28)	2,26 ($\pm$ 0,25)	0,31
CA (cm)	97,4 ($\pm$ 10,7)	95,2 ($\pm$ 12,1)	0,33
Massa Magra (kg)	43,6 ($\pm$ 9,12)	42,4 ($\pm$ 9,88)	0,52
Massa Gorda (kg)	26,1 ($\pm$ 7,87)	24,5 ($\pm$ 7,80)	0,33
Massa Gorda (%)	37,0 ($\pm$ 4,30)	36,3 ($\pm$ 3,79)	0,38
PAS (mmHg)	112,2 ($\pm$ 13,9)	109,8 ($\pm$ 14,0)	0,40
PAD (mmHg)	69,5 ($\pm$ 11,8)	67,5 ($\pm$ 9,24)	0,39

Dados apresentados: média ($\pm$ desvio padrão).

Análise de acordo com compulsão alimentar periódica e variáveis dietéticas

A análise da associação dos genótipos da variante rs2232169 (447C/G) com o risco de CAP nas CAO não evidenciou diferenças

significantes entre os grupos sem risco de CAP (escore ≤ 17) e com risco de CAP (escore > 17) ($p = 0,92$), também não foi observado resultado significativo segundo sexo e estadio puberal.

Avaliamos nas CAO a influência da variante rs2232169 (447 C/G) nas variáveis dietéticas, as crianças foram divididas em dois grupos de acordo com a presença ou não do alelo G (CC e CG/GG). Não foi observado nenhum resultado significativo nesta avaliação (tabela 27).

Tabela 27: Análise das variáveis dietéticas segundo genótipo da variante rs2232169 (447 C/G) nas CAO.

Variável	CC (n= 181)	CG/GG (n= 16)	p
Calorias (Kcal)	2080,4 ($\pm 660,7$)	2018,9 ($\pm 745,6$)	0,73
Ingestão de Carboidrato (g)	257,8 ($\pm 90,1$)	237,9 ($\pm 74,5$)	0,41
Ingestão de Carboidrato (%VET)	50,0 ($\pm 8,57$)	49,2 ($\pm 12,6$)	0,73
Ingestão de Proteína (g)	81,6 ($\pm 30,3$)	90,0 ($\pm 38,2$)	0,32
Ingestão de Proteína (%VET)	16,1 ($\pm 4,13$)	17,9 ($\pm 6,19$)	0,28
Ingestão de Lipídeos (g)	80,2 ($\pm 34,9$)	80,8 ($\pm 46,5$)	0,95
Ingestão de Lipídeos(%VET)	33,1 ($\pm 7,65$)	31,6 ($\pm 9,43$)	0,49
Escore CAP	16,0 ($\pm 7,85$)	15,7 ($\pm 7,82$)	0,91
Com risco de CAP (%)*	42,5	43,8	0,92

Dados apresentados: média ($\pm$ desvio padrão). * % dos casos observados.

Análise de acordo com síndrome metabólica e variáveis laboratoriais.

A análise da associação dos genótipos da variante rs2232169 (447C/G) com SM nas CAO não evidenciou diferenças significantes entre os

grupos com e sem diagnóstico de SM ($p= 0,33$), também não foi observado resultado significativo segundo sexo e estadio puberal.

Avaliamos nas CAO a influência da variante rs2232169 (447 C/G) nos parâmetros para diagnóstico de SM e nas variáveis laboratoriais, as crianças foram divididas em dois grupos de acordo com a presença ou não do alelo G (CC e CG/GG). Não foi observado nenhuma associação nesta avaliação (tabela 28).

Tabela 28: Análise das variáveis laboratoriais e metabólicas segundo genótipo da variante rs2232169 (447 C/G) nas CAO.

Variável	CC (n= 353)	CG/GG (n= 26)	p
CA $\geq$ p90*	98,9	96,2	0,24
Glicemia $\geq$ 100 mg/dL *	6,50	6,10	0,17
HDL < 40 mg/dL *	47,9	61,5	0,18
TG $\geq$ 110 mg/dL *	37,7	23,1	0,14
HAS (PA > p90)*	46,3	38,5	0,44
SM*	43,4	33,3	0,33
Glicemia (mg/dL)	87,3 ($\pm$ 7,96)	84,4 ($\pm$ 7,10)	0,08
Insulina (mU/L)	18,6 ($\pm$ 10,4)	17,0 ($\pm$ 9,48)	0,44
Ácido úrico (mg/dL)	5,03 ($\pm$ 1,05)	5,06 ($\pm$ 1,34)	0,87
Colesterol total (mg/dL)	159,0 ($\pm$ 30,2)	152,1 ($\pm$ 28,9)	0,26
LDL c (mg/dL)	95,9 ($\pm$ 26,9)	92,5 ($\pm$ 26,1)	0,53
HDL c (mg/dL)	41,8 ($\pm$ 9,04)	40,1 ($\pm$ 8,86)	0,35
Triglicérides (mg/dL)	105,1 ($\pm$ 47,6)	97,3 ($\pm$ 44,0)	0,42
Adiponectina (μ g/mL)	12,3 ($\pm$ 5,55)	12,3 ($\pm$ 5,46)	0,96
Leptina (ng/mL)	41,6 ($\pm$ 20,6)	35,5 ($\pm$ 17,6)	0,15
Hiperinsulinemia*	42,7	33,3	0,34
HOMA-IR	4,06 ($\pm$ 2,38)	3,54 ($\pm$ 2,03)	0,27
HOMA%S	45,2 ($\pm$ 25,4)	53,4 ($\pm$ 23,9)	0,41
HOMA% β	189,7 ($\pm$ 68,6)	198,9 ($\pm$ 75,4)	0,74
AUCgli (mg/dL/120 min)	13699 ($\pm$ 2263)	13199 ($\pm$ 2391)	0,28
AUCins (μ UI/dL/120 min)	13509 ($\pm$ 8755)	12301 ($\pm$ 7463)	0,50
AUCins/AUCgli	120,0 ($\pm$ 67,3)	112,9 ($\pm$ 62,8)	0,60

Dados apresentados: média ($\pm$ desvio padrão). * % dos casos observados.

4.2.7- Variante rs572169 (477 G/A)

A distribuição dos genótipos da variante rs572169 (477 G/A) nas populações estudadas foi consistente com o equilíbrio de HW ($p= 0,66$) (tabela 29). Não houve diferença na frequência de sexo e estadio puberal, e na distribuição das idades segundo os genótipos da variante rs572169 (477 G/A) em nenhuma das duas populações.

Tabela 29: Frequência dos genótipos da variante rs572169 (477 G/A) no exon 1 do *GHSR* nas CAO e CAE.

Genótipo variante rs572169	Total (n= 484)	CAO (n= 389)	CAE (n= 95)
GG (%)	65,3	66,1	61,9
GA (%)	31,4	30,8	34,0
AA (%)	3,30	3,10	4,10

Análise de acordo com obesidade e variáveis antropométricas, de composição corporal e clínicas

A análise da associação dos genótipos da variante rs572169 (477 G/A) com obesidade ($IMC \geq p95$) não evidenciou diferenças significantes entre os grupos de CAO ($IMC \geq p95$) e de CAE ($IMC < p85$) ($p= 0,59$), também não foi observado resultado significativo segundo sexo e estadio puberal.

Nas CAO, analisamos a influência da variante rs572169 (477 G/A) nas variáveis antropométricas, de composição corporal e clínicas. Os indivíduos foram divididos em dois grupos de acordo com a presença ou não do alelo A (GG e GA/AA). Não foi observada nenhuma diferença significativa

nestas variáveis analisadas segundo os genótipos da rs572169 (477 G/A) (tabela 30).

Tabela 30: Análise das variáveis antropométricas, de composição corporal e clínicas segundo genótipo da variante rs572169 (477 G/A) nas CAO.

Variável	GG (n= 257)	GA/AA (n= 132)	p
Sexo F/M (%)*	61,5/38,5	67,4/32,6	0,25
Estadio puberal PP/PUB (%)*	54,1/45,9	51,5/48,5	0,63
Idade (anos)	10,7 ($\pm$ 1,41)	10,6 ($\pm$ 1,30)	0,83
Peso (kg)	69,8 ($\pm$ 16,4)	69,3 ($\pm$ 15,4)	0,76
Z peso	2,52 ($\pm$ 0,51)	2,51 ($\pm$ 0,49)	0,88
Altura (cm)	149,8 ($\pm$ 10,1)	149,8 ($\pm$ 9,09)	0,98
Z altura	1,06 ($\pm$ 1,03)	1,09 ($\pm$ 0,95)	0,77
IMC (Kg/m ²)	30,7 ($\pm$ 4,56)	30,6 ($\pm$ 4,54)	0,80
Z IMC	2,34 ($\pm$ 0,27)	2,32 ($\pm$ 0,28)	0,46
CA (cm)	97,2 ($\pm$ 11,0)	97,1 ($\pm$ 10,4)	0,90
Massa Magra (kg)	43,5 ($\pm$ 9,52)	42,8 ($\pm$ 8,41)	0,45
Massa Gorda (kg)	25,8 ($\pm$ 7,93)	26,0 ($\pm$ 7,70)	0,78
Massa Gorda (%)	36,7 ($\pm$ 4,34)	37,4 ($\pm$ 4,09)	0,15
PAS (mmHg)	111,8 ($\pm$ 13,8)	112,5 ($\pm$ 14,1)	0,63
PAD (mmHg)	69,3 ($\pm$ 11,2)	69,6 ($\pm$ 12,5)	0,85

Dados apresentados: média ($\pm$ desvio padrão).

Ao avaliar as CAO segundo o sexo, observamos que os pacientes do sexo masculino com genótipo GG apresentavam menores valores de porcentagem de massa gorda quando comparados aos pacientes com genótipo GA/AA ($35,7 \pm 4,36$ vs $37,5 \pm 4,58$; $p= 0,03$).

Também observamos que os meninos obesos com genótipo GG apresentavam menores valores médios de PAS ($111,9 \pm 12,6$ vs $118,2 \pm 16,2$; $p= 0,009$) e PAD ($70,3 \pm 10,6$ vs $74,8 \pm 14,1$; $p= 0,004$) quando comparados com os meninos obesos com genótipo GA/AA, análise ajustada para idade, altura e estadio puberal. No entanto, não observamos menor risco de HAS nos meninos com genótipo GG quando comparados aos meninos com o genótipo GA/AA (52,6% vs 60,0%, OR= 1,35; IC 95% 0,64 – 2,89; $p= 0,43$).

Análise de acordo com compulsão alimentar periódica e variáveis dietéticas

A análise da associação dos genótipos da variante rs572169 (477 G/A) com o risco de CAP nas CAO não evidenciou diferenças significantes entre os grupos sem risco de CAP (escore ≤ 17) e com risco de CAP (escore > 17) ($p= 0,70$), também não foi observado resultado significativo segundo sexo e estadio puberal.

Avaliamos nas CAO a influência da variante rs572169 (477 G/A) nas variáveis dietéticas, as crianças foram divididas em dois grupos de acordo com a presença ou não do alelo A (GG e GA/AA). Observamos que os pacientes com o genótipo GG apresentaram maior ingestão calórica e de gramas de proteína quando comparados com os pacientes que com genótipo GA/AA (tabela 31).

Tabela 31: Análise das variáveis dietéticas segundo genótipo da variante rs572169 (477 G/A) nas CAO.

Variável	GG (n= 129)	GA/AA (n= 67)	p
Calorias (Kcal)	2151,1 (± 680,8)	1933,0 (± 621,1)	0,04
Ingestão de Carboidrato (g)	264,3 (± 90,0)	240,5 (± 85,9)	0,09
Ingestão de Carboidrato (%VET)	50,3 (± 7,84)	49,3 (± 10,8)	0,47
Ingestão de Proteína (g)	86,3 (± 32,6)	74,7 (± 26,2)	0,02
Ingestão de Proteína (%VET)	16,5 (± 4,43)	15,7 (± 4,20)	0,31
Ingestão de Lipídeos (g)	83,2 (± 37,0)	74,8 (± 33,3)	0,14
Ingestão de Lipídeos(%VET)	32,6 (± 7,52)	33,6 (± 8,37)	0,40
Escore CAP	15,7 (± 7,56)	16,5 (± 8,40)	0,53
Com risco de CAP (%)*	41,9	44,8	0,70

Dados apresentados: média (± desvio padrão). * % dos casos observados.

Análise de acordo com síndrome metabólica e variáveis laboratoriais.

A análise da associação dos genótipos da variante rs572169 (477 G/A) com SM nas CAO não evidenciou diferenças significantes entre os grupos com e sem diagnóstico de SM ($p=0,69$), também não foi observado resultado significativo segundo sexo e estadio puberal.

Nas CAO, avaliamos a influência da variante rs572169 (477 G/A) nos parâmetros para diagnóstico de SM e nas variáveis laboratoriais, as crianças foram divididas em dois grupos de acordo com a presença ou não do alelo A (GG e GA/AA). Foi observado que os pacientes com o genótipo GG apresentaram maiores valores médios de CT e LDLc quando comparados com os pacientes com genótipo GA/AA (tabela 32).

Tabela 32: Análise das variáveis laboratoriais e metabólicas segundo genótipo da variante rs572169 (477 G/A) nas CAO.

Variável	GG (n= 255)	GA/AA (n= 131)	p
CA $\geq$ p90*	98,0	100,0	0,11
Glicemia $\geq$ 100 mg/dL *	6,30	5,30	0,69
HDL < 40 mg/dL *	49,4	47,3	0,70
TG $\geq$ 110 mg/dL *	36,9	35,9	0,85
HAS (PA > p90)*	47,8	41,7	0,26
SM*	43,3	41,1	0,69
Glicemia (mg/dL)	87,1 ($\pm$ 7,78)	86,9 ($\pm$ 8,03)	0,80
Insulina (mU/L)	18,8 ($\pm$ 10,9)	17,9 ($\pm$ 9,29)	0,40
Ácido úrico (mg/dL)	5,03 ($\pm$ 1,12)	5,02 ($\pm$ 0,99)	0,93
Colesterol total (mg/dL)	161,6 ($\pm$ 31,2)	154,0 ($\pm$ 27,1)	0,02
LDL c (mg/dL)	99,1 ($\pm$ 27,1)	90,4 ($\pm$ 25,7)	0,003
HDL c (mg/dL)	41,1 ($\pm$ 8,44)	42,9 ($\pm$ 9,91)	0,07
Triglicérides (mg/dL)	105,2 ($\pm$ 48,1)	103,3 ($\pm$ 45,4)	0,71
Adiponectina (μ g/mL)	12,5 ($\pm$ 5,50)	12,5 ($\pm$ 5,83)	0,94
Leptina (ng/mL)	40,8 ($\pm$ 21,2)	41,2 ($\pm$ 18,8)	0,88
Hiperinsulinemia*	42,9	41,2	0,75
HOMA-IR	4,10 ($\pm$ 2,49)	3,86 ($\pm$ 2,07)	0,34
HOMA%S	47,9 ($\pm$ 27,9)	40,5 ($\pm$ 18,7)	0,21
HOMA% β	190,6 ($\pm$ 66,7)	194,9 ($\pm$ 73,7)	0,78
AUCgli (mg/dL/120 min)	13679 ($\pm$ 2252)	13523 ($\pm$ 1989)	0,51
AUCins (μ UI/dL/120 min)	13521 ($\pm$ 8929)	12737 ($\pm$ 7426)	0,42
AUCins/AUCgli	120,7 ($\pm$ 69,6)	114,7 ($\pm$ 59,8)	0,43

Dados apresentados: média ($\pm$ desvio padrão). * % dos casos observados.

4.2.8- Demais variantes descritas

Como a leitura do sequenciamento do gene do *GHSR* após PCR demonstrou frequência de 100% do genótipo ancestral para todas as demais variantes do *GHSR*, não foi possível realizar o estudo de associação com obesidade e suas alterações antropométricas, metabólicas e dietéticas.

DISCUSSÃO

5- DISCUSSÃO

5.1- População de estudo

As duas populações de estudo (CAO e CAE) apresentaram características clínicas (sexo, estadio puberal e idade) semelhantes.

Obesidade é uma doença crônica que resulta em excesso de tecido adiposo¹, resultando em maiores valores de peso, Z peso, IMC, Z IMC, CA e massa gorda quando comparadas à população eutrófica.

A obesidade é uma doença multifatorial determinada pelo balanço energético positivo³, observamos que as CAO apresentaram maior ingestão calórica quando comparadas com as CAE. Também observamos maior escore de CAP e maior risco de CAP nas CAO quando comparadas às CAE, a compulsão alimentar é observada em 20 a 30 % das pessoas obesas que procuram tratamento²³.

Analisando os hormônios, níveis diminuídos de adiponectina e níveis elevados de leptina são esperados na obesidade¹⁰⁷. As CAO apresentam níveis aumentados de leptina, consideramos os limites de referência propostos por Huang K.C. et al (2004)¹⁰⁸, que determina a normalidade entre 4,9 a 24,0 ng/mL. O valor médio de leptina encontrado nas CAO foi 41,1 ng/mL e nas CAE foi 12,5 ng/mL, estando nossos resultados em concordância com outros estudos que apontam que altos níveis de leptina são esperados em crianças e adolescentes obesos¹⁰⁸. Ao contrário da leptina, a adiponectina está diminuída na obesidade¹⁰⁹, em uma casuística semelhante ao nosso estudo, composta por crianças púberes e pré-púberes

Reinehr T et al (2004)¹¹⁰ encontraram uma média de adiponectina de 12,3 µg/mL, próxima à média de 12,5 µg/mL que encontramos nas CAO.

Considerando a forte associação entre a obesidade e alterações laboratoriais e metabólicas, observamos que as CAO apresentaram maiores valores de glicemia, insulina, ácido úrico, LDL c, triglicérides e menores valores de HDL c em relação às CAE.

As CAO envolvidas nesta pesquisa apresentaram maior resistência à insulina evidenciada pela maior frequência de hiperinsulinemia (41,9%) e maiores valores de *HOMA-IR* (média: 4,00), nas CAE a hiperinsulinemia não foi evidenciada e observamos menores valores de *HOMA-IR* (média: 1,04). Os valores para determinação de *HOMA-IR* que determinem a resistência à insulina não estão estabelecidos na população jovem brasileira, porém Silva RC et al (2005)¹¹¹ em estudo com adolescentes com história familiar de DM2 utilizaram para definição de resistência à insulina *HOMA-IR* > 2,5, e o estudo de Alvarez MM et al (2006)¹¹² avaliaram adolescentes do sexo feminino eutróficos e acima do peso e encontrou níveis de *HOMA-IR* mais elevados nas crianças e adolescentes com sobrepeso em relação às crianças eutróficas (2,25 IC: 1,4-3,0 vs 1,91 IC: 1,32-2,5), valores semelhantes ao observado em nosso estudo.

Os valores que encontramos estão de acordo com as evidências de que as concentrações elevadas de insulina são frequentemente encontradas em obesos, por conta do aumento da secreção de insulina pelas células beta pancreáticas, como uma compensação para resistência à sua ação¹¹³.

A frequência de SM foi de 42,6% nas CAO e de 1,10% nas CAE. As divergências nos critérios são responsáveis por uma grande diferença observada nas frequências de SM em diferentes estudos. Estudos mais antigos como o de Csábi G et al (2000)¹¹⁴ utilizaram a presença de hiperinsulinemia nos critérios, sendo observada prevalência de SM em 0,4% em crianças do grupo controle e 8,90% em crianças obesas. Posteriormente, Viner RM et al (2005)¹¹⁵ avaliaram crianças e adolescentes obesos, encontraram um terço dos jovens obesos com SM. No Brasil, o estudo de Silva RC et al (2005)¹¹¹ com adolescentes obesos e não obesos, mostrou prevalência de 26,0% de SM nos obesos.

Nossos dados comprovam que a adiposidade influencia o aparecimento da resistência à insulina, complicações metabólicas e prevalência de SM nas CAO quando comparadas com as CAE.

5.2- Gene do receptor secretagogo do hormônio do crescimento (GHSR)

Variante rs2232165 (60 C/T)

A distribuição alélica da variante rs2232165 (60 C/T) descritas em diversas populações⁸¹, encontram-se na tabela 33. No nosso estudo, observamos uma frequência de 92,2% do genótipo CC, estes valores se aproximam dos dados observados na população de europeus.

Tabela 33: Frequência dos genótipos da variante rs2232165 (60 C/T) em diferentes populações⁸¹.

Genótipo	Europeus	Chineses	Japoneses	Nigerianos	Africanos	Desc. de europeus
CC	95,0%	100,0%	100,0%	83,3%	77,3%	87,5%
CT	5,00%	0,00%	0,00%	16,7%	22,7%	12,5%
TT	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

Os dados coletados nas duas populações demonstram que a variante rs2232165 (60 C/T) não está associada à obesidade, mesmo ajustando para sexo e estadio puberal. Nossos dados são semelhantes aos observados por Wang H.J. et al (2004)⁸⁴ que não demonstraram associação entre a variante rs2232165 (60 C/T) e o estado nutricional (obesidade, peso normal e baixo peso) de crianças alemãs e por Gueorguiev M et al (2009)⁸⁷ que também não demonstraram associação desta variante à obesidade.

Ao avaliar as variáveis antropométricas e de composição corporal observamos que os pacientes que apresentam o genótipo CC tem uma tendência a maior Z peso ($p=0,08$) e IMC ($p=0,08$) quando comparados aos pacientes com genótipo CT/TT, no entanto o ZIMC não mostrou resultados significantes. O estudo de Landgren S. et al (2010)¹¹⁶ com mulheres adultas da Suécia ocidental mostrou que o estudo haplótipos com 4 SNPs (um da região intrônica e três localizados no exon 1) está associado a menor IMC. Neste estudo, houve contribuição do alelo C da variante rs2232165 (60 C/T).

Ao avaliar as CAO do sexo masculino, observamos que a presença do genótipo CC associou-se a maior Z altura ($p=0,03$). Nesta população, 71,1% dos meninos avaliados são pré-púberes, podendo evidenciar a

influência desta variante do *GHSR* na altura sem a adição dos hormônios sexuais. Wang H.J. et al (2004)⁸⁴ não encontraram associação desta variante com baixa estatura em crianças alemãs analisando ambos os sexos.

Avaliando as variáveis dietéticas das CAO, não observamos associação da variante rs2232165 (60 C/T) com risco de CAP e com ingestão calórica e de macronutrientes. Gueorguiev M et al (2009)⁸⁷ avaliando o consumo e o comportamento alimentar de uma coorte europeia com 2334 adultos e crianças, com pacientes obesos e não obesos, não mostraram associação da variante rs2232165 (60 C/T) com compulsão alimentar.

Nas variáveis metabólicas e laboratoriais, não encontramos associação com a variante rs2232165 (60 C/T) em nossa população de CAO. O estudo de Garcia E.A. et al (2009)¹¹⁷ não mostrou associação desta variante com DM2 em pacientes caucasianos e Gueorguiev M et al (2009)⁸⁷ não observaram relação positiva da variante rs223165 (60 C/T) com os valores e áreas de glicemia e insulina após teste de sobrecarga a glicose na população adulta europeia.

Variante rs2232166

Ao estudar esta variante nas nossas populações observamos apenas 5 casos em heterozigose nas CAO e um caso nas CAE.

Esta variante foi descrita e validada pela *1000 genomes* e também pelo *cluster*⁸¹. Não existe até o momento nenhum estudo publicado que

descreva a frequência desta variante e estudos de associação com outras variáveis antropométricas, de composição corporal, dietéticas, laboratoriais e metabólicas.

Variante rs495225 (171 C/T)

A tabela 34 apresenta a frequência alélica da variante rs495225 (171 C/T) em diversas populações, os nossos resultados mostram uma frequência de 18,7% do genótipo CC e 37,2% do genótipo TT, uma distribuição próxima da população africana.

Tabela 34: Frequência dos genótipos da variante rs495225 (171 C/T) em diferentes populações⁸¹.

Genótipo	Europeus	Chineses	Japoneses	Nigerianos	Africanos
CC	50,9%	45,5%	40,9%	8,30%	30,4%
CT	43,9%	47,7%	50,0%	56,7%	34,8%
TT	5,30%	6,80%	9,10%	35,0%	34,8%

Para o estudo de associação desta variante com as variáveis analisadas utilizamos o modelo recessivo.

Não observamos associação desta variante com obesidade ao avaliar as crianças e adolescentes. Os dados antropométricos, de composição corporal e clínicos das CAO não estão associados à variante rs495225 (171 C/T). O estudo com a população de Danes avaliando 15.854 adultos obesos e não obesos também não demonstrou associação entre esta variante com obesidade, peso, altura, IMC e circunferência abdominal¹¹⁸. Outros estudos

também não observaram associação entre a variante com peso, altura e IMC na população adulta^{83, 86, 87} e infantil⁸⁵.

Wang H.J. et al (2004)⁸⁴ mostraram maior frequência do alelo T nos casos obesos (75,0%) ao comparar com os controles (70,2%), no entanto este dado não apresentou associação significativa ($p=0,14$).

O estudo de Landgren S. et al (2010)¹¹⁶ com 325 mulheres adultas da Suécia ocidental mostrou na análise de haplótipos com 4 SNPs (um da região intrônica e três localizados no exon 1) associação com menor IMC, neste estudo houve contribuição do alelo C da variante rs495225 (171 C/T).

Resultado positivo também foi observado no estudo de Chung W.K. et al (2008) ao associar IMC com a variante rs495225 (171 C/T) ($p=0,02$) na população europeia adulta que vive em Nova Iorque¹¹⁹.

Ao avaliar o comportamento alimentar nas CAO, não observamos associação significativa desta variante ao risco de CAP, no entanto ao analisar o sexo feminino observamos que as pacientes que eram portadoras do genótipo CC/CT apresentaram maior escore de CAP quando comparadas às meninas com o genótipo TT. Miyasaka K et al (2006)⁸⁸ estudando a população feminina japonesa com transtornos alimentares e controles, mostraram associação positiva entre a presença do alelo C da variante rs495225 (171 C/T) com maior frequência de bulimia nervosa ($p=0,035$) mas não observado para o quadro de anorexia nervosa. No entanto, Gueorguiev M et al (2009)⁸⁷ avaliando o consumo e o comportamento alimentar de uma coorte europeia com 2334 adultos e crianças, obesos e

não obesos, não mostraram associação da variante rs495225 (171 C/T) com compulsão alimentar.

Ao analisar o consumo alimentar, observamos que as CAO com genótipo CC/CT apresentavam maior ingestão de carboidrato e uma tendência a maior ingestão de calorias ($p= 0,09$) quando comparadas às CAO com genótipo TT, quadro não observado por Gueorguiev M et al (2009)⁸⁷ ao associarem a variante rs495225 (171 C/T) a *overeating*.

Ao analisar o perfil metabólico e laboratorial das CAO, observamos uma tendência a maior frequência de SM nos pacientes com o genótipo TT quando comparados aos portadores do genótipo CC/CT. Quando esta análise foi realizada nos pacientes do sexo masculino observamos associação significativa da SM com o genótipo TT da variante rs495225 (171 C/T).

Observamos que os pacientes com o genótipo TT apresentavam maior frequência de hipertrigliceridemia ($TG > 110$) e maiores valores médios de insulina, *HOMA-IR*, *HOMA%β* e AUCinsulina quando comparados aos pacientes com o genótipo CC/CT. A análise do TOTG mostrou que os pacientes com o genótipo TT também apresentavam maiores valores médios de insulina nos tempos 60, 90 e 120 minutos quando comparados com os pacientes com o genótipo CC/CT, quadro não observado nos tempos de glicemia, indicando secreção aumentada de insulina observada quando ocorre resistência à ação da insulina. O estudo de Mager U et al (2008)⁸⁶ não mostrou associação entre risco de DM2 e a variante rs495225 (171 C/T) e Gueorguiev M et al (2009)⁸⁷ estudando a população adulta

européia não observaram relação positiva da variante rs495225 (171 C/T) com os valores e a área de glicemia e insulina nos tempos do TOTG.

Variante rs79053943 (271 C/T)

Ao estudar esta variante na nossa população observamos apenas 3 pacientes em heterozigose (CT).

Esta variante foi descrita e validada pela *1000 genomes* e também pelo *cluster*⁸¹. Não existe até o momento nenhum estudo publicado que descreva a frequência desta variante e estudos de associação com as variáveis analisadas em nosso estudo.

Variante rs2232168 (432 C/T)

Ao estudar esta variante nas nossas populações observamos apenas 2 casos em heterozigose nas CAO e na população de CAE observamos 100% do alelo ancestral.

Esta variante foi descrita e validada pela *1000 genomes* e também pelo *cluster*⁸¹. Não existe até o momento nenhum estudo publicado que descreva a frequência desta variante e estudos de associação com as variáveis analisadas em nosso estudo.

Variante rs2232169 (447 C/G)

A distribuição alélica da variante rs2232169 (447 C/G) descritas em diversas populações⁸¹, encontram-se na tabela 35. Na nossa população, a

distribuição do alelo CC foi de 92,7%, esta distribuição é semelhante a dos europeus.

Tabela 35: Frequência dos genótipos da variante rs2232169 (447 C/G) em diferentes populações⁸¹.

Genótipo	Caucasianos	Europeus	Chineses	Japoneses	Nigerianos	Africanos	Desc. de europeus
CC	96,7%	94,8%	100,0%	100,0%	83,3%	73,9%	87,5%
CG	3,30%	5,20%	0,00%	0,00%	16,7%	26,1%	12,5%
GG	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

Ao avaliarmos as CAO e as CAE não observamos associação desta variante do *GHSR* com obesidade, resultado semelhante ao observado por Gueorguiev M. et al (2009)⁸⁷, que ao analisarem a população europeia adulta não mostraram associação significativa desta variante do *GHSR* com obesidade e também por Garcia E.A. et al (2008)⁸⁵ que avaliaram 843 crianças e 5807 adultos do Reino Unido e não observaram associação significativa desta variante com peso, altura ou IMC. Wang H.J. et al (2004)⁸⁴ corroborando os estudos não observaram associação entre a variante rs2232169 (447 C/G) e o estado nutricional (obesidade, peso normal e baixo peso) de crianças alemãs.

Nas CAO, não observamos associação da variante rs2232169 (447 C/G) ao risco de CAP e SM, bem como com as variáveis antropométrica, de composição corporal, clínica, dietética, laboratorial e metabólica.

Gueorguiev M. et al (2009)⁸⁷ avaliando o consumo alimentar e o comportamento alimentar de uma coorte europeia com 2334 adultos e

crianças, obesos e não obesos, não evidenciaram associação da variante com compulsão alimentar, quadro que se assemelha com nossa população de CAO, na qual não foi observada associação com risco de CAP; neste mesmo estudo foi observado associação com *overeating* ($p=0,02$), no entanto, em nossa casuística não observamos associação significativa da variante rs2232169 (447 C/G) à ingestão de calorias e de macronutrientes.

Na literatura, encontramos estudos que avaliaram a variante rs2232169 (447 C/G) com variáveis metabólicas, Garcia E.A. et al (2009)¹¹⁷ não mostraram associação desta variante com DM2 em pacientes caucasianos e Gueorguiev M et al (2009)⁸⁷ estudando a população adulta europeia não observaram relação positiva da variante com os valores e a área de glicemia e insulina nos tempos do TOTG.

Variante rs572169 (477 G/A)

A tabela 36 apresenta a frequência alélica da variante rs572169 (477 G/A) em diversas populações⁸¹, os dados de nossa população de estudo apresenta-se mais próxima a distribuição da população caucasiana, nossa casuística mostra uma frequência de 65,3% do alelo GG.

Tabela 36: Frequência dos genótipos da variante rs572169 (477 G/A) em diferentes populações⁸¹.

Genótipo	Caucasianos	Europeus	Chineses	Nigerianos	Africanos	Desc. de europeus
GG	74,1%	45,0%	26,7%	90,0%	85,7%	45,8%
GA	14,8%	45,0%	51,1%	10,0%	14,3%	50,0%
AA	11,1%	10,0%	22,2%	0,00%	0,00%	4,20%

A obesidade não se mostrou associada a esta variante do *GHSR* ao avaliar CAO e CAE, e não observamos relação com variáveis antropométricas, de composição corporal e clínicas. O estudo com a população de Danes avaliando 15.854 adultos obesos e não obesos não mostrou associação entre a variante rs572169 (477 G/A) do gene do *GHSR* com peso, altura, IMC e circunferência abdominal, assim como obesidade¹¹⁸. Garcia E.A. et al (2008)⁸⁵ estudando uma coorte do Reino Unido com 5807 adultos e 843 crianças também não observaram associação positiva entre a variante rs572169 (477 G/A) com o peso, a altura e o IMC dos casos avaliados. Esses resultados negativos foram observados também por Wang H.J. et al (2004)⁸⁴ estudando crianças e adolescentes obesos e controles, que não mostraram relação desta variante com os fenótipos de obesidade. O estudo de Dossus L et al (2008)⁸³ com uma coorte da população do oeste europeu observou associação positiva entre a variante rs572169 (477 G/A) com altura ($p=0,002$), mas associação não significativa com IMC e obesidade.

No entanto, Gueorguiev M. et al (2009)⁸⁷ estudando uma coorte europeia mostraram associação positiva desta variante com obesidade, o

alelo GG mostra-se mais frequente na população obesa quando comparado ao alelo GA/AA (58,0% vs 44,0%, $p = 0,001$), resultado conflitante com os estudos de Baessler A. et al (2005)⁸², que mostrou maior risco da presença do alelo polimórfico (GA/AA) da variante rs572169 (477 G/A) com obesidade (OR: 1,62 IC: 1,12-2,34 $p = 0,01$) quando comparado com o alelo GG e de Landgren S. et al (2010)¹¹⁶, com mulheres adultas da Suécia ocidental que mostrou em um estudo de haplótipos com 4 SNPs (um da região intrônica e três localizados no exon 1) a associação com menor IMC, neste estudo houve contribuição do alelo G da variante rs572169 (477 G/A).

Nas CAO, não observamos associação da variante rs572169 (477 G/A) com risco de CAP, Gueorguiev M. et al (2009)⁸⁷ estudando uma coorte europeia também não mostraram associação entre a variante rs572169 (477 G/A) e a compulsão alimentar.

A presença do genótipo GG está associado significativamente com maior ingestão calórica quando comparado com as CAO com o genótipo GA/AA. Hoed M den et al (2008) estudando a variante rs572169 (477 G/A) em 103 descendentes europeus observaram que os casos que carregam o alelo A apresentavam maior restrição dietética e desinibição ($p < 0,05$) quando comparados aos casos GG, a percepção de fome também foi significativamente diferente entre os dois grupos, sendo menor nos casos com o alelo A ($p < 0,05$)¹²⁰, observamos associação positiva também com a ingestão de proteína em gramas, mas não em porcentagem do VET.

Ao avaliar SM nas CAO, não foi observado associação com a variante rs572169 (477 G/A), o estudo de Li W.J. et al (2008)⁸⁹ com população adulta

chinesa que apresentavam SM e controles também não mostrou associação desta variante do *GHSR* com o quadro de SM, variáveis antropométricas e laboratoriais.

Observamos associação significativa da presença do genótipo GG com maiores valores de CT e LDLc, e uma tendência a menor HDLc ($p=0,07$). Não há na literatura estudos que avaliaram o perfil lipídico e a variante do *GHSR*.

Não observamos associação desta variante do *GHSR* com as demais variáveis laboratoriais e metabólicas. O estudo de Gueorguiev M. et al (2009)⁸⁷ com uma coorte europeia não mostrou associação com os resultados do TOTG e o estudo de Garcia E.A.et al (2009)¹¹⁷ também não mostrou associação desta variante com DM2 em pacientes caucasianos.

CONCLUSÕES

6- CONCLUSÕES

1- A adiposidade influencia o aparecimento da resistência à insulina, complicações metabólicas e prevalência de SM;

2- As variantes do gene do *GHSR* analisadas não estão associadas à obesidade infantil;

3- A presença do genótipo CC da variante rs2232165 (60 C/T) foi um fator que se associou a maior Z altura nas CAO do sexo masculino;

4- A presença do alelo C (homozigose para o alelo ancestral e heterozigose) da variante rs495225 (171 C/T) resultou em maior ingestão de carboidrato e uma tendência a maior ingestão de calorias nas CAO;

5- A presença do alelo C (homozigose para o alelo ancestral e heterozigose) da variante rs495225 (171 C/T) resultou em maior escore de CAP nas meninas obesas;

6- A presença do alelo T (homozigose para o alelo polimórfico) da variante rs495225 (171 C/T) foi fator de risco para SM nos meninos obesos;

7- A presença do alelo T (homozigose para o alelo polimórfico) da variante rs495225 (171 C/T) resultou em maior resistência à ação da insulina e maior risco de hipertrigliceridemia nas CAO;

8- A presença do alelo A (homozigose para o alelo polimórfico e heterozigose) variante rs572169 (477 G/A) foi fator de risco para maiores valores médios de PAS e PAD nos meninos obesos;

9- A presença do alelo G (homozigose para o alelo ancestral) da variante rs572169 (477 G/A) foi fator de risco para maior ingestão calórica e maiores valores médios de CT e LDLc nas CAO;

Com estas observações podemos concluir que a presença de alterações polimórficas do gene do *GHSR*, frequentes na nossa população, não teriam grande contribuição para o desenvolvimento da obesidade poligênica, embora algumas variantes poderiam influenciar o comportamento alimentar e as co-morbidades associadas à obesidade com manifestação mais precoce como ocorre na obesidade infantil e poderiam levar a um maior risco de doenças metabólicas e cardiovasculares.

ANEXOS

7- ANEXOS**ANEXO 1** **APROVAÇÃO**

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 16/12/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1033/09**, intitulado: **"VARIANTES NO GENE DO RECEPTOR SECRETAGOGO DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO (GHSR) EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES OBESOS"**, apresentado pelo Departamento de **CLÍNICA MÉDICA**, inclusive Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **PROFA. DRA. SANDRA MARA FERREIRA VILLARES**

Pesquisador (a) Executante: **THAÍS ARTHUR**

CAPPesq, 17 de Dezembro de 2009

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

ANEXO 2

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I- DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:.....
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐
 DATA NASCIMENTO:/...../.....
 ENDEREÇO Nº APTO:
 BAIRRO: CIDADE
 CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
 NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐
 DATA NASCIMENTO:/...../.....
 ENDEREÇO Nº APTO:
 BAIRRO: CIDADE
 CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

II- DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Variantes no gene do receptor secretagogo do hormônio de crescimento (GHSR) em crianças e adolescentes obesos.
2. PESQUISADOR : Thaís Arthur
 CARGO/FUNÇÃO: Nutricionista INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº: CRN: 23980
 UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Clínica Médica—Disciplina de Endocrinologia e Metabologia
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
 RISCO MÍNIMO: X RISCO MÉDIO: ☐
 RISCO BAIXO: ☐ RISCO MAIOR: ☐
4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos (24 meses)

III- REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU AO SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

1. Justificativa e Objetivos do projeto: A obesidade é um problema mundial, crianças obesas podem apresentar alterações metabólicas, de composição corporal e de comportamento alimentar que podem dificultar a perda de peso. Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa investigar polimorfismos no gene do receptor secretagogo do hormônio do crescimento (GHSR) em crianças e adolescentes obesas e sua relação com comportamento alimentar, ingestão alimentar (ingestão de carboidrato, proteínas e gorduras), parâmetros antropométricos (peso, altura, circunferência abdominal), de composição corporal (quantificação da gordura corporal), parâmetros metabólicos (glicemia, insulina, colesterol total, HDL-C, LDL-C e triglicérides) e pressão arterial; com o objetivo final de identificar a resposta ao tratamento multidisciplinar de mudança do estilo de vida (com profissionais da saúde: médico, nutricionista, psicóloga e educador físico).
2. Procedimentos que serão utilizados e seus propósitos: serão realizadas avaliações antropométricas, radiológicas, laboratoriais e de comportamento alimentar para posterior associação com os polimorfismos no gene do receptor secretagogo do hormônio do crescimento (GHSR). Será realizada coleta de sangue para os exames laboratoriais de dosagem de glicemia, insulina, colesterol total, HDL-C, LDL-C e triglicérides. Da amostra de sangue, será extraído o DNA e realizados genotipagem do GHSR. O comportamento alimentar será avaliado pelo questionário de múltipla escolha "Escala de Comportamento Alimentar Periódica".
3. Desconfortos e riscos esperados: pode-se ter desconforto ao ser punccionada a veia para coleta de sangue.
4. Os pacientes serão avaliados clínica e laboratorialmente. Quaisquer alterações encontradas serão comunicadas ao paciente e/ou responsável.
5. Benefícios para os participantes: não há vantagens ou benefícios diretos em se submeter ao procedimento.

IV-ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

1. Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, o(a) sr(a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para esclarecer eventuais dúvidas. O principal investigador é a **Nutricionista Thais Arthur**, que pode ser encontrada no endereço: **Av. Dr Arnaldo, 455 – sala 4305. Telefone: 3061- 7253/ ramal 18**. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225/ 5º andar/ tel: 3069-6442 ramais: 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal: 26. Email: cappesq@hcnet.usp.br.
 2. A qualquer momento (a) sr(a) pode deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade do seu tratamento na Instituição
 3. Todos os dados pessoais fornecidos pelo paciente e adquiridos durante a pesquisa são confidenciais e serão mantidos em sigilo, guardando sua total privacidade.
 4. Caso haja danos à saúde decorrentes da pesquisa, o Laboratório de Nutrição Humana e Doenças Metabólicas- LIM 25, disponibilizará assistência ao paciente.
 5. A indenização não é viável porque a pesquisa não traz danos aos pacientes, apenas visa ao diagnóstico e à orientação do paciente
-

3

V- CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, de de 200_.

Assinatura do paciente/representante legal

Data / /

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Thaís Arthur - Responsável pelo estudo

Data / /

ANEXO 3: Variantes descritas no gene do *GHSR*.

Variante	Troca de bases	aa
rs144006748 (não sinônimo)	C/A	5
rs138443343 (não sinônimo)	T/A	19
rs2232165 (sinônimo)	C/T	20
rs149430564 (não sinônimo)	C/T	23
rs137953416 (sinônimo)	G/T	29
rs150293762 (não sinônimo)	T/C	34
rs140224509 (não sinônimo)	C/G	42
rs2232166 (sinônimo)	C/T	48
rs144640317 (não sinônimo)	C/T	49
rs112095561 (sinônimo)	G/A	51
rs495225 (sinônimo)	C/T	57
COSM95917 (sinônimo)	G/T	90
rs79053943 (não sinônimo)	C/T	91
rs2232167 (sinônimo)	C/T	118
rs142733811 (não sinônimo)	A/G	123
rs4988511 (não sinônimo)	T/C	134
CM077845 (desconhecido)	-	134
rs2232168 (sinônimo)	C/T	144
rs2232169 (sinônimo)	C/G	149
rs572169 (sinônimo)	G/A	159
CM077844 (desconhecido)	-	160
rs4988509 (sinônimo)	C/A	177
rs147274466 (sinônimo)	C/T	191
rs145402261 (não sinônimo)	C/G	194
rs121917883 (não sinônimo)	C/A	204
CM061011 (desconhecido)	-	204
COSM95916 (sinônimo)	G/A	205
COSM77771 (não sinônimo)	T/A	210
COSM39423 (não sinônimo)	G/A	249
COSM94373 (não sinônimo)	C/T	252
rs140134927 (não sinônimo)	G/T	259
rs147508651 (não sinônimo)	C/T	266
rs141596022 (não sinônimo)	A/G	273
CM045917 (desconhecido)	-	279
rs148371213 (<i>stop gained</i>)	C/T	283
rs145560801 (sinônimo)	C/G	308
rs149249522 (não sinônimo)	T/A	325
rs138507814 (sinônimo)	A/G	339
rs144720427 (sinônimo)	C/T	340
rs73039031 (sinônimo)	C/T	343
rs138063648 (não sinônimo)	T/A	355
rs150344113 (não sinônimo)	G/A	358

ANEXO 4:

Análise das médias de glicemia e insulina nos tempos do TOTG segundo genótipo da variante rs495225 (171 C/T) nas CAO.

Variável	CC/CT (n= 229)	TT (n= 137)	p
Glicemia basal(mg/dL)	86,5 (± 7,27)	87,7 (± 9,07)	0,19
Glicemia T30 (mg/dL)	127,2 (± 21,6)	135,4 (± 61,7)	0,07
Glicemia T60 (mg/dL)	116,9 (± 28,6)	122,3 (± 27,5)	0,08
Glicemia T90 (mg/dL)	108,1 (± 24,1)	112,3 (± 25,5)	0,11
Glicemia T120 (mg/dL)	106,7 (± 21,9)	109,8 (± 20,6)	0,17
Insulina basal (mU/L)	17,5 (± 9,29)	20,1 (± 11,7)	0,02
Insulina T30(mU/L)	136,4 (± 101,6)	154,4 (± 108,4)	0,11
Insulina T60(mU/L)	109,8 (± 74,6)	143,3 (± 112,4)	0,002
Insulina T90(mU/L)	101,3 (± 82,9)	123,2 (± 101,6)	0,03
Insulina T120(mU/L)	99,3 (± 90,4)	132,3 (± 125,7)	0,009

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-
- ¹ Gregoire FM. Adipocyte Differentiation: From Fibroblast to Endocrine Cell. *Exp Biol Méd.* 2001; 226(11):997-1002.
- ² WHO – World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. WHO technical report series 894. Geneva. 2000: 101-155.
- ³ Goran MI. Energy metabolism and obesity. *Med Clin North Am.* 2000;84:347-62.
- ⁴ Ogdenc L, Flegal KM, Carroll MD. Prevalence and Trends in Overweight Among US Children and Adolescents. *J Am Med Association.* 2002; 288:1728-32.
- ⁵ Wang Y, Monteiro C, Popkin BM. Trends of obesity and underweight in older children and adolescents in the United States, Brazil, China and Russia. *Am J Clin Nutr.* 2002; 75:971-7.
- ⁶ Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Antropometria e análise do estado nutricional de crianças e adolescentes no Brasil. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009. Rio de Janeiro, 2011.
- ⁷ Eissa MAH, Gunner KB. Evaluation and Management of Obesity in Children and Adolescents. *J Pediatr Health Care.* 2004; 18(1):35-38.
- ⁸ Must A, Strauss RS. Risks and Consequences of Childhood and Adolescent Obesity. *Int J Obes.* 1999; 23:S2-S11.
- ⁹ Whitaker RC, Wright JA, Pepe MS, Seidel KD, Dietz WH. Predicting obesity in young adulthood from childhood and parental obesity. *N Engl J Med.* 1997; 337:869-73.
- ¹⁰ Rosenbaun M, Leibel R. Pathophysiology of Childhood Obesity. *Advance Pediatrics.* 1988; 35:73-137.
- ¹¹ Birch LL, Fisher JO. Development of Eating Behaviors Among Children and Adolescents. *Pediatrics.* 1998; 101:539-549.
-

-
- ¹² Barlow SE, Dietz WH. Obesity Evaluation and Treatment: Expert Committee Recommendations. *Pediatrics*. 1998; 102:E29.
- ¹³ Allison DB, Kaprio J, Korkeila M, Koskenvuo M, Neale MC, Hayakawa K. The heritability of body mass index among an international sample of monozygotic twins reared apart. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1996; 20:501–506.
- ¹⁴ Diez Garcia RW. Representações Sociais da Comida no Meio Urbano: algumas considerações para o estudo dos aspectos simbólicos da alimentação. *Rev. Cad. Debate*. 1994; 2:12-24.
- ¹⁵ Blundell JE, Gillett A. Control of food intake in the obese. *Obes Res*. 2001; 4: 263S-70S.
- ¹⁶ Blundell JE, Green S, Burley V. Carbohydrates and appetite. *Am J Clin Nutr*. 1994; 3: 728S-34S.
- ¹⁷ Lavin JH, Wittert G, Sun WM, Horowitzl M, Morleyl JE, Read NW. Appetite regulation by carbohydrate: role of blood glucose and gastrointestinal hormones. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 1996; 271: 209E-14E.
- ¹⁸ Appolinario JC. Binge eating disorder: an emerging entity that responds to pharmacotherapy. *Rev. Bras. Psiquiatr*. 2004; 26: 75-76.
- ¹⁹ American Psychiatric Association – Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth.
- ²⁰ de Zwann M. Status and utility of a new diagnostic category: Binge eating disorder. *Eur Eating Disord Rev*. 1997; 4: 226-40.
- ²¹ Decaluwé V, Braet C. Assessment of eating disorder psychopathology in obese children and adolescents: interview versus self-report questionnaire. *Behav Res Ther*. 2004; 42(7):799-811.
- ²² Decaluwé V, Braet C, Fairburn CG. Binge eating in obese children and adolescents. *Int J Eat Disord*. 2003; 33(1):78-84.
-

-
- ²³ Stunkard AJ. Eating patterns and obesity. *Psychiatr Quarterly*. 1959; 33: 284-95.
- ²⁴ Lourenço BH, Arthur T, Rodrigues MD, Guazzelli I, Frazzatto E, Deram S, Nicolau CY, Halpern A, Villares SM. Binge eating symptoms, diet composition and metabolic characteristics of obese children and adolescents. *Appetite*. 2008; 50(2-3):223-30.
- ²⁵ Hinney A, Remschmidt H, Hebebrand J. Candidate gene polymorphism in eating disorders. *Eur. J. Pharmacol*. 2000; 410: 147-159.
- ²⁶ Bailer UF, Kaye WH. A review of neuropeptide and neuroendocrine dysregulation in anorexia and bulimia nervosa. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. 2003; 2(1):53-9.
- ²⁷ Van der Lely AJ, Tschop M, Heiman ML, Ghigo E. Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocr Rev*. 2004; 25:426-57.
- ²⁸ Dickson SL, Bailey AR, Leng G. Growth hormone (GH) secretagogues and neuroendocrine regulation of GH secretion. *Growth Horm IGF Res*. 1999; 9 Suppl A:89-91.
- ²⁹ Ghigo E, Arvat E, Broglio F, Giordano R, Gianotti L, Muccioli G, et al. Endocrine and non-endocrine activities of growth hormone secretagogues in humans. *Horm Res*. 1999; 51 Suppl 3:9-15.
- ³⁰ Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberatore PA, Rosenblum CI, et al. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science*. 1996; 273:974–977.
- ³¹ Korbonits M, Ciccarelli E, Ghigo E, Grossman AB. The growth hormone secretagogue receptor. *Growth Horm IGF Res*. 1999; 9 Suppl A:93–99.
- ³² Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 1999; 402:656–660.
-

-
- ³³ Kojima M, Hosoda H, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *Trends Endocrinol Metab.* 2001; 12:118–122.
- ³⁴ Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev.* 2005; 85: 495-522.
- ³⁵ Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 279:909-13.
- ³⁶ Hosoda H, Kojima M, Mizushima T, Shimizu S, Kangawa K. Structural divergence of human ghrelin. Identification of multiple ghrelin-derived molecules by post-translational processing. *J Biol Chem.* 2003; 278:64-70.
- ³⁷ Hosoda H, Kojima M, Kangawa K. Biological, physiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *J Pharmacol Sci.* 2006; 100(5):398-410.
- ³⁸ Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin NV, Goldstein JL. Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell.* 2008; 132:387–96.
- ³⁹ Tolle V, Bassant M-H, Zizzari P, Poindessous-Jazat F, Tomasetto C, Epelbaum J, et al. Feeding behaviour, and sleep-wake patterns in rats. *Endocrinology.* 2002; 143:1353-61.
- ⁴⁰ De Vriese C, Gregoire F, Lema-Kisoka R, Waelbroeck M, Robberecht P, Delporte C. Ghrelin degradation by serum and tissue homogenates: identification of cleavage sites. *Endocrinology.* 2004; 145:4997-5505.
- ⁴¹ De Vrise C, Hacquebard M, Gregoire F, Carpentier Y, Delporte C. Ghrelin interacts with human plasma lipoproteins. *Endocrinology.* 2007; 148: 2355-62.
-

-
- ⁴² Patterson M, Murphy KG, le Roux CW, Ghatei MA, Bloom SR. Characterization of ghrelin-like immunoreactivity in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90:2205-11
- ⁴³ Tschöp M, Wawarta R, Riepl RL, Friedrich S, Bidlingmaier M, Landgraf R, et al. Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest.* 2001; 24(6): RC19-21.
- ⁴⁴ Hotta M, Ohwada R, Katakami H, Shibasaki T, Hizuka N, Takano K. Plasma levels of intact and degraded ghrelin and their responses to glucose infusion in anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89:5707-12.
- ⁴⁵ Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, et al. Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86:4753-8.
- ⁴⁶ Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology.* 2000 Nov; 141(11):4255-61.
- ⁴⁷ Wells T. Ghrelin- Defender of fat. *Prog Lipid Res.* 2009; 48(5): 257-74.
- ⁴⁸ Otto B, Cuntz U, Fruehauf E, Wawarta R, Folwaczny C, Riepl RL, Heiman ML, Lehnert P, Fichter M & Tschop M. Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa. *European Journal of Endocrinology.* 2001; 145:669-673.
- ⁴⁹ Bacha F & Arslanian SA. Ghrelin suppression in overweight children: a manifestation of insulin resistance? *J Clin Endocrinol and Metab.* 2005; 90: 2725-2730.
-

-
- ⁵⁰ Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes*. 2001;50(8):1714-9.
- ⁵¹ le Roux CW, Patterson M, Vincent RP, Hunt C, Ghatei MA, Bloom SR. Postprandial plasma ghrelin is suppressed proportional to meal calorie content in normal weight but not obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:1068–71.
- ⁵² Foster-Schubert KE, Overduin J, Prudom CE, Liu J, Callahan HS, Gaylinn BD, et al. Acyl and total ghrelin are suppressed strongly by ingested proteins, weakly by lipids, and biphasically by carbohydrates. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93:1971-9.
- ⁵³ Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Sugihara H, Wakabayashi I. Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. *Diabetes*. 2001; 50(11):2438-43.
- ⁵⁴ Muccioli G, Broglio F, Valetto MR, Ghé C, Catapano F, Graziani A, et al. Growth hormone-releasing peptides and the cardiovascular system. *Ann Endocrinol*. 2000; 61(1):27-31.
- ⁵⁵ Tschöp M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*. 2000; 407(6806): 908-13.
- ⁵⁶ Arvat E, Maccario M, Di Vito L, Broglio F, Benso A, Gottero C, et al. Endocrine activities of ghrelin, a natural growth hormone secretagogue (GHS) in humans: comparison and interactions with hexarelin, a nonnatural peptidyl GHS, and GH-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86(5):1169-74.
- ⁵⁷ Holst B, Schwartz TW. Constitutive ghrelin receptor activity as a signaling set-point in appetite regulation. *Trends Pharmacol Sci*. 2004; 25(3):113-7.
- ⁵⁸ Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, et al. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature*. 2001; 409:194-198.
-

-
- ⁵⁹ Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, Brynes AE, Frost GS, Murphy KG, et al. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86:5992-5995.
- ⁶⁰ Davies JS, Kotokorpi P, Eccles SR, Barnes SK, Tokarczuk PF, Allen SK, et al. Ghrelin induces abdominal obesity via GHS-R-dependent lipid retention. *Mol Endocrinol.* 2009; 23(6):914-24.
- ⁶¹ Lall S, Tung LYC, Ohlsson C, Jansson J-O, Dickson SL. Growth hormone (GH)-independent stimulation of adiposity by GH secretagogues. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 280:132-8.
- ⁶² Theander-Carrillo C, Wiedmer P, Cettour-Rose P, Nogueiras R, Perez-Tilve D, Pfluger P, et al. Ghrelin action in the brain controls adipocyte metabolism. *J Clin Invest* 2006; 116:1983-93.
- ⁶³ Longo KA, Charoenthongtrakul S, Giuliana DJ, Govek EK, McDonagh T, Qi Y, et al. Improved insulin sensitivity and metabolic flexibility in ghrelin receptor knockout mice. *Regul Peptides* 2008; 150:55-61.
- ⁶⁴ Zhang W, Zhao L, Lin TR, Chai B, Fan Y, Gantz I, Mulholland MW. Inhibition of adipogenesis by ghrelin. *Mol Biol Cell.* 2004; 15: 2484-2491.
- ⁶⁵ Soriano-Guillen L, Barrios V, Campos-Barros A, Argente J. Ghrelin levels in obesity and anorexia nervosa: effect of weight reduction or recuperation. *J Pediatr.* 2004; 144:36-42.
- ⁶⁶ Foster-Schubert KE, McTiernan A, Frayo RS, Schwartz RS, Rajan KB, Yasui Y, et al. Human plasma ghrelin levels increase during a one-year exercise program. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90(2): 820-5.
- ⁶⁷ Muccioli G, Baragli A, Granata R, Papotti M, Ghigo E. Heterogeneity of ghrelin growth hormone secretagogue receptors. *Neuroendocrinology.* 2007; 86:147-64.
-

-
- ⁶⁸ Guan X-M, Yu H, Palyha OC, McKee KK, Feighner SD, Sirinathsinghji DJS, et al. Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Mol Brain Res*. 1997; 48:23-9.
- ⁶⁹ Zigman JM, Jones JE, Lee CE, Saper CB, Elmquist JK. Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and mouse brain. *J Comp Neurol*. 2006; 494:528-48.
- ⁷⁰ Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P, et al. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87:2988-91.
- ⁷¹ Hattori N, Saito T, Yagyu T, Jiang BH, Kitagawa K, Inagaki C. GH, GH receptor, GH secretagogue receptor, and ghrelin expression in human T cells, B cells, and neutrophils. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86:4284-4291.
- ⁷² Muccioli G, Pons N, Ghè C, Catapano F, Granata R, Ghigo E. Ghrelin and des-acyl ghrelin both inhibit isoproterenol-induced lipolysis on rat adipocytes via a non-type 1a growth hormone secretagogue receptor. *Eur J Pharmacol*. 2004; 498:27-35.
- ⁷³ Zhang W, Chai B, Li J, Wang L, Mulholland MW. Effect of des-acyl ghrelin on adiposity and glucose metabolism. *Endocrinology*. 2008; 149:4710-6.
- ⁷⁴ Castañeda TR, Tong J, Datta R, Culler M, Tschöp MH. Ghrelin in the regulation of body weight and metabolism. *Front Neuroendocrinol*. 2010 ; 31(1):44-60.
- ⁷⁵ Sun Y, Ahmed S, Smith RG. Deletion of ghrelin impairs neither growth nor appetite. *Mol Cell Biol*. 2003; 23(22):7973-81.
- ⁷⁶ Wortley KE, Anderson KD, Garcia K, Murray JD, Malinova L, Liu R, Moncrieffe M, Thabet K, Cox HJ, Yancopoulos GD, Wiegand SJ, Sleeman MW. Genetic deletion of ghrelin does not decrease food intake but influences metabolic fuel preference. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101(21): 8227-32.
-

-
- ⁷⁷ Sun Y, Wang P, Zheng H, Smith RG. Ghrelin stimulation of growth hormone release and appetite is mediated through the growth hormone secretagogue receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101(13):4679-84.
- ⁷⁸ Shuto Y, Shibasaki T, Otagiri A, Kuriyama H, Ohata H, Tamura H, Kamegai J, Sugihara H, Oikawa S, Wakabayashi I. Hypothalamic growth hormone secretagogue receptor regulates growth hormone secretion, feeding, and adiposity. *J Clin Invest*. 2002; 109(11):1429-36.
- ⁷⁹ Pennacchio LA, Rubin EM: Genomic strategies to identify mammalian regulatory sequences. *Nat Rev Genet*. 2001; 2:100-109.
- ⁸⁰ Mattick JS: RNA regulation: a new genetics? *Nat Rev Genet*. 2004; 5:316-323.
- ⁸¹ Ensembl 2012. Flicek P, Aken BL, Beal K, Ballester B, Caccamo M, Chen Y, Clarke L, Coates G, et al. *Nucleic Acids Res*. 2008; 36(Database issue):D707-14.
- ⁸² Baessler A, Hasinoff MJ, Fischer M, Reinhard W, Sonnenberg GE, Olivier M, Erdmann J, Schunkert H, Doering A, Jacob HJ, Comuzzie AG, Kissebah AH, Kwitek AE. Genetic linkage and association of the growth hormone secretagogue receptor (ghrelin receptor) gene in human obesity. *Diabetes*. 2005; 54(1):259-67.
- ⁸³ Dossus L, McKay JD, Canzian F, Wilkening S, Rinaldi S, Biessy C, Olsen A, Tjønneland A, Jakobsen MU, Overvad K, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, et al . Polymorphisms of genes coding for ghrelin and its receptor in relation to anthropometry, circulating levels of IGF-I and IGFBP-3, and breast cancer risk: a case-control study nested within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Carcinogenesis*. 2008; 29(7):1360-6.
- ⁸⁴ Wang HJ, Geller F, Dempfle A, Schäuble N, Friedel S, Lichtner P, Fontenla-Horro F, Wudy S, Hagemann S, Gortner L, Huse K, Remschmidt H, Bettecken T, Meitinger T, Schäfer H, Hebebrand J, Hinney A. Ghrelin receptor gene: identification of several sequence variants in extremely obese children and adolescents, healthy
-

normal-weight and underweight students, and children with short normal stature. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89(1):157-62.

⁸⁵ Garcia EA, Heude B, Petry CJ, Gueorguiev M, Hassan-Smith ZK, Spanou A, Ring SM, Dunger DB, Wareham N, Sandhu MS, Ong KK, Korbonits M. Ghrelin receptor gene polymorphisms and body size in children and adults. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93(10):4158-61.

⁸⁶ Mager U, Degenhardt T, Pulkkinen L, Kolehmainen M, Tolppanen AM, Lindström J, Eriksson JG, Carlberg C, Tuomilehto J, Uusitupa M; Variations in the ghrelin receptor gene associate with obesity and glucose metabolism in individuals with impaired glucose tolerance. *PLoS One.* 2008; 3(8):e2941.

⁸⁷ Gueorguiev M, Lecoœur C, Meyre D, Benzinou M, Mein CA, Hinney A, Vatin V, Weill J, Heude B, Hebebrand J, Grossman AB, Korbonits M, Froguel P. Association studies on ghrelin and ghrelin receptor gene polymorphisms with obesity. *Obesity (Silver Spring).* 2009; 17(4):745-54.

⁸⁸ Miyasaka K, Hosoya H, Sekime A, Ohta M, Amono H, Matsushita S, Suzuki K, Higuchi S, Funakoshi A. Association of ghrelin receptor gene polymorphism with bulimia nervosa in a Japanese population. *J Neural Transm.* 2006; 113(9):1279-85.

⁸⁹ Li WJ, Zhen YS, Sun K, Xue H, Song XD, Wang YB, Fan XH, Han YF, Hui RT. Ghrelin receptor gene polymorphisms are associated with female metabolic syndrome in Chinese population. *Chin Med J (Engl).* 2008; 121(17):1666-9.

⁹⁰ Grumbach MM, Styre DM. Puberty: ontogeny, neuroendocrinology, physiology and disorders. In: Wilson JD & Foster DW. *Willians textbook of endocrinology*. 8ed. Philadelphia: WB Saunders company; 1992.1139-1221.

⁹¹ NCHS - National Center for Health Statistics [on line]. *CDC Growth Charts*. Hyattsville, MD: U.S. Centers for Disease Control and Prevention, 2000. Available from: <http://www.cdc.gov>

-
- ⁹² Fernandez JR, Redden DT, Pietrobelli A, Allison DB. Waist circumference percentiles in nationally representative samples of African-American, European-American, and Mexican-American children and adolescents. *J Pediatrics*. 2004; 145:439-444.
- ⁹³ Ten S, Maclaren N. Insulin resistance in children. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89: 2526-39.
- ⁹⁴ Goran MI, Gower BA. Longitudinal study on pubertal insulin resistance. *Diabetes*. 2001; 50: 2444-50.
- ⁹⁵ Reaven GM, Chen YD, Hollenbeck CB, Sheu WH, Ostrega D, Polonsky KS. Plasma insulin, C-peptide, and proinsulin concentrations in obese and nonobese individuals with varying degrees of glucose tolerance. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993; 76:44-48.
- ⁹⁶ 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; 28:412-419.
- ⁹⁷ <http://www.ox.ac.uk>
- ⁹⁸ Purves RD. Optimum numerical integration methods for estimation of area-under-the-curve (AUC) and area-under-the-moment-curve (AUMC). *J Pharmacokin Biopharm*. 1992; 20: 211-227.
- ⁹⁹ American Diabetes Association. Type 2 diabetes in children and adolescents. *Pediatrics*. 2000; 105:671-80.
- ¹⁰⁰ Dhuper S, Cohen HW, Daniel J, Gumidyala P, Agarwalla V, St Victor R. Utility of the modified ATP III defined metabolic syndrome and severe obesity as predictors of insulin resistance in overweight children and adolescents: a cross-sectional study. *Cardiovasc Diabetol*. 2007; 14:6-4.
-

-
- ¹⁰¹ Perloff D, Grim C, Flack J, Frohlich ED, Hill M, McDonald M, Morgenstern BZ. Human blood pressure determination by sphygmomanometry. *Circulation*. 1993; 88:2460-70.
- ¹⁰² National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Children and Adolescents. The fourth report on the diagnosis, evaluation, and treatment of high blood pressure in children and adolescents. *Pediatrics*. 2004; 114: 555-76.
- ¹⁰³ Philippi ST, Szarfarc SC, Latterza AR. Virtual Nutri [programa de computador]. Versão 1.0 for Windows. São Paulo: Departamento de Nutrição Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 1996.
- ¹⁰⁴ Gormally J, Black S, Daston S, Rardin D. The assessment of binge eating severity among obese persons. *Addict Behav*. 1982;7(1):47-55.
- ¹⁰⁵ Freitas SL, Lopes CS, Coutinho W, Appolinario JC. Tradução e adaptação para o português da Escala de Compulsão Alimentar Periódica. *Rev. Bras. Psiquiatr*. 23(4): 215-220.
- ¹⁰⁶ Miller SA, Dykes DD, Polesky FH. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988; 16: 1215.
- ¹⁰⁷ Vendrell J, Broch M, Vilarras N, Molina A, Gomez JM, Gutierrez C et al. Resistin, adiponectin, ghrelin, leptin and proinflammatory cytokines: relationships in obesity. *Obes Res*. 2004; 12:962-71.
- ¹⁰⁸ Huang KC, Lin RCY, Normas N, Lee LT, Chen CY, Gill TP, Caterson ID. Plasma leptin is associated with insulin resistance independent of age, body mass index, fat mass, lipids and pubertal development in nondiabetic adolescents. *Int J Obes*. 2004; 28:470-5.
-

-
- ¹⁰⁹ Stefan N, Blunt JC, Salbe AD, Funahashi T, Matsuazawa Y, Tataranni PA. Plasma adiponectin concentrations in children: relationships with obesity and insulinemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87:4652-6.
- ¹¹⁰ Reinehr T, Roth C, Menke T, Andler W. Adiponectin before and after Weight Loss in Obese Children. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89:3790-4.
- ¹¹¹ Metabolic syndrome and insulin resistance in normal glucose tolerant brazilian adolescents with family history of type 2 diabetes. da Silva RC, Miranda WL, Chacra AR, Dib SA. *Diabetes Care.* 2005; 28(3):716-8.
- ¹¹² Insulin resistance in Brazilian adolescent girls: association with overweight and metabolic disorders. Alvarez MM, Vieira AC, Moura AS, da Veiga GV. *Diabetes Res Clin Pract.* 2006; 74(2):183-8.
- ¹¹³ Steinberger J. Diagnosis of metabolic syndrome in children. *Curr Op Lipidol.* 2003; 14:555-9.
- ¹¹⁴ Presence of metabolic cardiovascular syndrome in obese children. Csábi G, Török K, Jeges S, Molnár D. *Eur J Pediatr.* 2000; 159(1-2):91-4.
- ¹¹⁵ Prevalence of the insulin resistance syndrome in obesity. Viner RM, Segal TY, Lichtarowicz-Krynska E, Hindmarsh P. *Arch Dis Child.* 2005; 90(1):10-4.
- ¹¹⁶ Landgren S, Jerlhag E, Hallman J, Orelund L, Lissner L, Strandhagen E, Thelle DS, Zetterberg H, Blennow K, Engel JA. Genetic variation of the ghrelin signaling system in females with severe alcohol dependence. *Alcohol Clin Exp Res.* 2010 Sep 1;34(9):1519-24.
- ¹¹⁷ Garcia EA, King P, Sidhu K, Ohgusu H, Walley A, Lecoœur C, Gueorguiev M, Khalaf S, Davies D, Grossman AB, Kojima M, Petersenn S, Froguel P, Korbonits M. The role of ghrelin and ghrelin-receptor gene variants and promoter activity in type 2 diabetes. *Eur J Endocrinol.* 2009; 161(2):307-15.
-

-
- ¹¹⁸ Gjesing AP, Larsen LH, Torekov SS, Hainerová IA, Kapur R, Johansen A, Albrechtsen A, Boj S, Holst B, Harper A, Urhammer SA, Borch-Johnsen K, Pisinger C, Echwald SM, Eiberg H, Astrup A, Lebl J, Ferrer J, Schwartz TW, Hansen T, Pedersen O. Family and population-based studies of variation within the ghrelin receptor locus in relation to measures of obesity. *PLoS One*. 2010; 5(4):e10084.
- ¹¹⁹ Chung WK, Patki A, Matsuoka N, Boyer BB, Liu N, Musani SK, Goropashnaya AV, Tan PL, Katsanis N, Johnson SB, Gregersen PK, Allison DB, Leibel RL, Tiwari HK. Analysis of 30 genes (355 SNPS) related to energy homeostasis for association with adiposity in European-American and Yup'ik Eskimo populations. *Hum Hered*. 2009; 67(3):193-205.
- ¹²⁰ den Hoed M, Smeets AJ, Veldhorst MA, Nieuwenhuizen AG, Bouwman FG, Heidema AG, Mariman EC, Westerterp-Plantenga MS, Westerterp KR. SNP analyses of postprandial responses in (an)orexigenic hormones and feelings of hunger reveal long-term physiological adaptations to facilitate homeostasis. *Int J Obes (Lond)*. 2008; 32(12):1790-8.
-