ALEXANDRE GALVÃO DA SILVA

**Influência dos polimorfismos do receptor de leptina e
o impacto da dieta e treinamento físico sobre as
variáveis antropométricas, metabólicas e
neurovasculares em mulheres obesas**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de: Endocrinologia

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Mara Ferreira Villares

São Paulo

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Alexandre Galvão da

Influência dos polimorfismos do receptor de leptina e o impacto da dieta e treinamento físico sobre as variáveis antropométricas, metabólicas e neurovasculares em mulheres obesas / Alexandre Galvão da Silva. -- São Paulo, 2010.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Sandra Mara Ferreira Villares.

Descritores: 1.Obesidade 2.Receptor de leptina 3.Polimorfismos

USP/FM/DBD-510/10

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Nutrição Humana e Doenças Metabólicas – LIM/25, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e no Ambulatório de Obesidade da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Apoio: CAPES

Dedicatória

À minha Nega e a minha filhinha Bruna que me acompanharam intensamente nesta jornada. Por todo o seu amor, dedicação e apoio, pela realização de mais essa etapa de vida conquistada

Agradecimentos

Dra Sandra, agradeço a oportunidade da realização desse estudo. Sou grato por todo aprendizado que tive com a senhora durante esses 9 anos de convívio, até os momentos difíceis que passamos refletiram-se em aprendizado e amadurecimento pessoal.

Eli, minha mãe paulistana querida! Muito obrigada pela força e colaboração nesse estudo, sem sua persistência, sua companhia, as conversas, não teria conseguido finalizar esta tese de doutorado. MUITO OBRIGADO!!!!

Minha grande amiga e professora Ivani, agradeço pelo carinho e atenção dados a mim em todos esse anos de caminhada. Fui recebido por você de braços abertos em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis, sua passagem por minha tese e vida são inesquecíveis. Admiro muito a Ivani pesquisadora e pessoa! Espero continuar usufruindo desta fonte de conhecimento e amizade!

Ao meu Professor Cadu, presto meu sincero agradecimento. Poder trabalhar ao seu lado é aprender constantemente. Você é um exemplo de profissional a ser seguido. Tenho o Professor como um grande ídolo, sou seu fã!

Bel, grande companheira e amiga, minha tia paulistana, agradeço muito pela paciência ajuda e apoio. Muito obrigado pelo profissionalismo e constante auxílio na elaboração desta pesquisa.

A querida Cris, por sua pronta disponibilidade e sua disposição em ajudar sempre. Ressalto a ajuda essencial que você me deu nas estatísticas finais desta tese! Valeu Cris!!!!

Dr Éneas Rocco e minha amiga Marcinha, muito obrigado pela amizade e carinho nos momentos difíceis. Agradeço todos os bons momentos e as experiências trocadas e sempre apreendidas.

Meus pais, André e Elia, por minha formação de vida. Mesmo longe sempre tive vocês ao meu lado!!!!

Dea e Tuca, meus irmãos!!! Muito obrigado por vocês existirem e por me apoiarem em tudo!!!

Minha querida Cida! Obrigado pela ajuda, disponibilidade e paciência constantes com este típico bahiano que gosta muito de você .

Caríssima Senária, não tenho como agradecer o que você fez por mim! Você foi o anjo da guarda que me protegeu no momento certo! OBRIGADO!!!!!!!

Rafa, Thais, Mari, Sofia, Simone, Melissa, obrigada pela companhia, pelos bons momentos, pela ajuda e desabafos. Muito obrigado por todos esses bons momentos de convivência nesses anos!

Meu querido Danilo, seu jeito todo especial de ser me cativou muito, obrigado por tudo, continuaremos nossa jornada na pesquisa e também na vida! Um abraço!!!!

Ao meu querido Marão e Liloca, obrigado por compartilhar as angústias desta jornada de vida

Salve meus Amigos! Dico, Dani, João Marcelo, Guria, Renatão, Recra, Cunha, Pedrão, Mau, muito obrigado por estarem ao meu lado....

Agradeço à todos do LIM/25

Agradeço especialmente à unidade de reabilitação do Instituto do coração por ter feito parte de um centro de excelência deste porte!

Muito obrigado as voluntárias que participaram deste estudo, sem elas, este estudo não teria acontecido.

Agradeço à CAPES pela bolsa concedida.

Sumário

Lista de abreviaturas

Resumo

Summary

1. Introdução.....	1
1.1. Obesidade.....	1
1.2. Leptina, atividade nervosa simpática e obesidade.....	2
1.3. Receptor de leptina.....	6
1.4. Polimorfismo do receptor de leptina.....	9
1.5. Polimorfismo do receptor de leptina e obesidade.....	11
1.6. Polimorfismo do receptor de leptina e atividade nervosa simpática.....	14
1.7. Leptina, polimorfismo do receptor de leptina e exercício.....	15
2. Justificativa.....	19
3. Hipótese.....	20
4. Materiais e métodos.....	21
4.1. População do estudo.....	21
4.2. Avaliação da composição corporal.....	23
4.2.1. Parâmetros antropométricos.....	23
4.2.2. Análise da composição corporal pelo método da densitometria.....	24
4.3. Análise do gasto energético pela calorimetria indireta.....	24
4.4. Métodos laboratoriais.....	26
4.5. Análise dos parâmetros metabólicos.....	27
4.6. Avaliação molecular.....	28
4.6.1. Extração de DNA.....	28
4.6.2. Genotipagem.....	29
4.7. Avaliação dos parâmetros hemodinâmicos e neurovasculares.....	30
4.8. Avaliação da capacidade cardiorrespiratória durante o exercício.....	32
4.9. Determinação do limiar anaeróbio e PDR.....	33

4.10. Protocolo experimental.....	34
4.11. Protocolo de dieta hipocalórica.....	36
4.12. Protocolo de treinamento físico.....	38
4.13. Sequência experimental.....	38
4.14. Análise estatística.....	41
4.14.1. Análise da influência dos polimorfismos do LEPR sobre as características antropométricas, metabólicas e neurovasculares.....	41
4.14.2. Influência da mudança do hábito de vida nos polimorfismos do LEPR sobre as características antropométricas, metabólicas e neurovasculares.....	42
5. Resultados.....	43
5.1. Avaliação basal.....	43
5.1.1. SNP – rs1137100.....	44
5.1.2. SNP – rs1137101.....	44
5.1.3. SNP – rs8179183.....	45
5.2. Exercício físico leve.....	52
5.3. Exercício físico moderado.....	52
5.4. Stress mental.....	53
5.4. Protocolo de intervenção.....	63
5.4.1. Medidas basais.....	63
5.4.2. Exercício físico leve.....	74
5.4.3. Exercício físico moderado.....	78
5.4.4. Stress mental.....	82
6. Discussão.....	86
7. Conclusão.....	97
8. Referências.....	98
9. Anexos.....	120

Lista de abreviaturas e siglas

Arg - Arginina

AMPK - Proteína cinase ativada por adeninamonofosfato

Asn - Asparina

AUCins/AUCgli - Razão da área sob a curva de insulina e área sob a curva
de glicose

Apo - Apolipoproteína

CA - Circunferência abdominal

cDNA - Ácido desoxirribonucleico complementar

CO₂ - Dióxido de carbono

CT - Colesterol total

db/db - Camundongos com resistência à leptina

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DM2 - Diabetes mellitus do tipo 2

DTF - Dieta e treinamento físico

Gln - Glutamina

HAS - Hipertensão arterial sistêmica

HDLC - Lipoproteína de alta densidade

HOMA-IR - *Homeostasis model assessment insulin resistance*

IMC - Índice de massa corpórea

JAK-1 - Janus kinase

JAK-2 - Janus kinase

LA - Limiar Anaeróbio

Lys - Lisina

LDLC - Lipoproteína de baixa densidade

LEPR - Receptor de Leptina

LMW - Baixo peso molecular

O₂ - Oxigênio

ob/ob - Camundongos deficientes em leptina

Ob-Ra - Receptor de leptina forma curta

Ob-Rb - Receptor de leptina forma Longa

PAD - Pressão arterial diastólica

PAS - Pressão arterial sistólica

PCR - Reação de polimerase em cadeia

PetO₂ - Pressão parcial de oxigênio

PDR - Ponto de descompensação respiratória

PPAR - Receptor ativado por proliferadores de peroxissomos

RER - Razão de troca respiratória

SNC - Sistema Nervoso Central

SNS - Sistema Nervoso Simpático

SNP - Polimorfismo em um único nucleotídeo

STAT-3 - *Signal transduceres and activa-tor of transcription*

VE - Ventilação pulmonar

VE/VO₂ - Equivalente Respiratório

VLDL - Lipoproteína de muito baixa densidade

$\text{VO}_{2\text{pico}}$ - Consumo de oxigênio no pico do exercício

Resumo

Da Silva AG. Influência dos polimorfismos do receptor de leptina e o impacto da dieta e treinamento físico sobre as variáveis antropométricas, metabólicas, neuro vasculares em mulheres obesas.

A leptina é um componente importante do complexo sistema fisiológico que regula o armazenamento, o equilíbrio e o uso de energia pelo organismo. É descrito na literatura que a concentração plasmática de leptina e/ou a quantidade de mRNA de leptina nos adipócitos, correlacionam-se positivamente com o gênero, a ingesta calórica, o IMC, e a massa de tecido adiposo. A leptina pode aumentar o gasto energético por meio da estimulação nervosa simpática. A ação tecidual da leptina se dá através de sua ligação com seu receptor. O receptor de leptina apresenta heterogeneidade na população humana, com naturais ocorrências de polimorfismos que codificam para o aminoácido das posições 109, 223 e 656 entre outros. Acredita-se que mutações no gene do receptor podem modificar sua função e afetar os níveis séricos de leptina na população em geral, sugerindo que este polimorfismo possa contribuir para a correlação da obesidade com a doença cardiovascular associado à atividade nervosa simpática. Neste estudo, avaliamos a relação entre as variantes alélicas do gene do receptor de leptina e mudanças na composição corporal, nas variáveis metabólicas, neurovasculares e hemodinâmicas de mulheres obesas antes e após um programa de treinamento físico e dieta hipocalórica. Como achado principal do nosso estudo, observamos que as pacientes obesas com polimorfismo Gln223Arg/Arg223Arg apresentaram maior massa gorda em comparação ao grupo de mulheres obesas Gln223Gln no período inicial do estudo. Não foram encontradas diferenças nas demais variáveis antropométricas, metabólicas, neurovasculares e hemodinâmicas do códon 223. As variáveis antropométricas, metabólicas, neurovasculares e hemodinâmicas permaneceram semelhantes entre as formas genéticas dos códons 109, 656. Como esperado, a mudança no hábito de vida impactou em algumas das variáveis antropométricas, metabólicas, neurovasculares e hemodinâmicas, porém as variantes genéticas de cada códon não alteraram essas variáveis. A partir dos dados apresentados, podemos dizer que o polimorfismo Gln223Arg/Arg223Arg influencia no aumento de massa gorda em mulheres obesas. Entretanto, após quatro meses de intervenção nos hábitos de vida dessas pacientes, a associação entre o polimorfismo citado e

o aumento da massa gorda não se manteve, o que pode ser atribuído à melhora da resistência a ação da leptina, que sabidamente é favorecida por perda de peso, como ocorreu na nossa população.

Descritores: 1. Obesidade 2. Receptor de Leptina 3. Polimorfismo 4. Mudança no hábito de vida

Summary

Da Silva AG. Influence of leptin polymorphisms and the impact of diet and exercise training on the anthropometric, metabolic, neurovascular and hemodynamic variables in obese women

Leptin is an important component of a complex physiological system that contributes to the regulation of the organic energy balance. Leptin plasmatic concentration or mRNA quantities are positive related to gender, caloric intake, BMI and fat mass. Energy expenditure can be altered by leptin action through the nervous sympathetic stimulus. Leptin acts via its specific receptor. These receptor presents heterogeneity in human population, with natural occurrences of polymorphisms that codify to different proteins. Mutations in gene receptor can modify the leptin level and consequently its action. This suggests that the polymorphism of leptin receptor could contribute to the relation of obesity and cardiovascular disease, and the sympathetic nervous system is involved in this process. In this study we evaluate the relation between allelic variants of leptin receptor gene with changes in corporal composition, metabolic, neurovascular and hemodynamic variables in obese women, before and after a life style change program. The main result of this investigation is that the women that carrier a polymorphism in codon 223, with mutation of glicina to arginina presented higher fat mass than the other polymorphisms. There are no differences in the other antropometric, metabolic, neurovascular and hemodynamic variables in this codon. All the studied variables were similar between the genetic forms 109 and 656. As expected, the life style changes positive impact in some of the anthropometric, metabolic, neurovascular and hemodynamic variables, but the allelic variants did not alter these variables. In conclusion, the data presented permit us to say that the Gln223Arg/Arg223Arg polymorphism influences the fat mass gain in obese women. However, after four months of exercise training and diet, this difference in fat mass gain did not keep, wich can be atributted to the improvement in the leptin resistance and the weigh loss, which occurred in our population.

Descriptors: 1. Obesity 2. Leptin Receptor 3. Polymorphism 4. Life style change

1. Introdução

1.1.Obesidade

A obesidade é uma doença crônica cuja prevalência vem aumentando, em proporções epidêmicas, tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento (Ravussin et., 1999). A obesidade pode ser conceituada como uma condição de acúmulo anormal ou excessivo de gordura no organismo, levando a um prejuízo na condição de saúde (WHO – World Health Organization). Ela representa o resultado final de um balanço energético positivo, cuja patogênese não está completamente elucidada. Fatores comportamentais e biológicos, que contribuem para o balanço energético e regulação dos estoques de energia do corpo, são influenciados por uma suscetibilidade individual e por fatores hormonais, culturais e genéticos.

Apesar das evidências de que fatores genéticos têm uma grande importância na etiologia da obesidade, é evidente que o fator ambiental é o principal determinante da epidemia da obesidade que vivemos hoje. Isto pode ser explicado pela dissociação entre o período que houve o aumento expressivo da obesidade, principalmente relacionado à mudança nos hábitos e estilo de vida, e o período necessário para estabelecer alterações genéticas substanciais. Um consenso da causa do aumento da obesidade no mundo industrializado é o consumo de grande proporção de calorias

derivadas da gordura (BRAY et., 1998), associado a um estilo de vida sedentário (FRENCH et., 2001; JEBB et., 1999).

De fato, estes dados demonstram que a obesidade é um problema de saúde pública, que merece destaque e atenção dos profissionais da saúde, objetivando minimizar os efeitos nocivos do excesso de gordura corporal.

1.2. Leptina, atividade nervosa simpática e obesidade

O sistema fisiológico que regula o consumo de alimento para a geração de energia e a manutenção do peso corporal foi postulado por Kennedy, em 1953, que propôs a existência de um fator regulador produzido pelo tecido adiposo que atua no hipotálamo, denominado leptina (AHIMA et., 1996).

A leptina é uma adipocina composta por 167 aminoácidos, similar a outras citocinas (ZHANG et., 1997). Codificado pelo gene ob, que circula como um monômero de 16 Kilodaltons. É produzida primariamente no tecido adiposo mas é expressa por uma variedade de outros tecidos incluindo a placenta, ovários, epitélio mamário, medula óssea (MARGETIC et., 2002) e tecidos linfóides (MATARESE et., 2005). Os níveis de leptina são pulsáteis e apresentam um ritmo circadiano com níveis mais elevados entre meia noite e começo da manhã e os níveis mais baixos no início e meio da tarde. A leptina circula em pequena quantidade na forma livre e em grande parte ligada a isoformas pequenas do receptor da leptina (OB Ra e OB Rc), que tem um papel importante no transporte da leptina através da barreira hemato encefálica. (HILEMAN et., 2002).

A leptina atua via alça regulatória composta por três passos distintos: 1 - sensor, representado pela produção de leptina pelas células gordurosas, que monitoriza as concentrações de leptina nos estoques de energia; 2 - centros hipotalâmicos que recebem e integram a intensidade da sinalização através dos receptores de leptina; 3 - sistemas efetores, incluindo o sistema nervoso simpático, os quais controlam os dois principais determinantes do balanço energético; tanto da ingestão alimentar como no gasto energético (JÉQUIER et., 2002).

É descrito que, a concentração plasmática de leptina e/ou a quantidade de mRNA de leptina nos adipócitos, correlacionam-se positivamente com o gênero feminino, a ingesta calórica, o IMC, e a massa de tecido adiposo (CONSIDINE et., 1996, MAFFEI et., 1995). Desta forma, indivíduos obesos apresentam concentração plasmática de leptina aumentada e ao contrário do que se possa imaginar, a maioria das pessoas obesas não sofre de deficiência de leptina (CONSIDINE et., 1996, MAFFEI et., 1995). Os níveis circulantes de leptina proporcionais a quantidade de gordura, flutuam com modificações agudas da ingestão calórica, sendo muito sensíveis em estados de privação de energia com diminuição de 40% dos níveis basais. (CHAN et., 2003).

Estudos sugerem que a obesidade poderia ocorrer devido à interrupção no sinal da leptina nos seus sítios alvos localizados no sistema nervoso central, levando à falha na ativação dos mediadores neuroendócrinos, reguladores do peso corporal (ZHANG et., 2005).

A leptina liga-se aos seus receptores (Ob RS) que são expressos no em todo o sistema nervoso central e em particular no hipotálamo onde regula a homeostase energética e funções neuroendócrinas (FEI et., 1997). A leptina, após liga-se ao receptor promove a ativação deste que desencadeia uma série de vias de transdução do sinal. Dentre estas, JAK2/STAT3 que tem um papel crucial na homeostase energética induzindo a transcrição do neuropeptídeo anorexígeno proopiomelanocortina (POMC), no núcleo arcuado do hipotálamo. Além disso, a ativação da via JAK2/STAT3 também inibe os neurônios AgRP/NPY no núcleo arqueado, que produzem neuropeptídeos orexigênicos: peptídeo relacionado ao Aguti e neuropeptídeo Y (NPY), mas em menor grau.

Estudos *in vivo* e *in vitro* sugerem que a leptina estimula a via fosfatidil inositol 3 quinase (PI3K) no hipotálamo (MORRIS et., 2009). O estímulo da PI3K no hipotálamo contribui para o efeito anorético e perda de peso da leptina. Similar a via STAT3, a via PI3K ativa os neurônios da POMC pela ativação dos canais de potássio sensível ao ATP. Recentemente uma outra via de sinalização Forkhead box O1 (FOXO1), um fator de transcrição que estimula a AgRP e NPY e inibe a expressão da POMC, foi demonstrando ter um efeito mediador com a via PI3K. A expressão e a ativação de FOXO1 no hipotálamo é inibida pela leptina através da via PI3K. A PI3K pode também estar envolvida na regulação simpática (RAHMOUNI et., 2003), mas os mecanismos permanecem não elucidados.

O sistema nervoso simpático (SNS) tem um importante papel na regulação do balanço energético tanto no controle da ingestão alimentar

como no gasto energético. O SNS aumenta a oxidação lipídica, estimula a lipólise, regula a permeabilidade e tônus vascular de órgãos endócrinos responsáveis pelo metabolismo e é modulado por hormônios e citocinas produzidas por esses órgãos, dentre esses a leptina (SNITKER et., 2000, LAWRENCE & COPPACK 2000).

A hiperleptinemia crônica presente na obesidade pode gerar aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca na tentativa de aumentar o gasto energético e regular o peso do corpo à custa de uma maior atividade nervosa simpática, reforçando o conceito de que a leptina pode ser um importante elo entre a obesidade, aumento da atividade simpática e hipertensão. (HALL et., 2000, CARLYLE et., 2002).

Simultaneamente, a leptina tem efeito sobre a vasomotricidade, que estimula a formação de óxido nítrico e aumenta a sensibilidade à insulina, contrapondo-se ao aumento da atividade nervosa simpática (McAULEY et., 1993, HALL et., 2001).

Considera-se que a obesidade é um estado onde há resistência à ação da leptina, à semelhança do que se postula em relação à insulina no DM2. Foi observado em pacientes obesos que poderia haver uma insuficiência do sistema de transporte da leptina para dentro do cérebro; haja vista que pacientes obeso têm uma diminuição da concentração líquórica de leptina, quando comparada ao nível do hormônio no plasma (CARO et., 1996).

Postula-se também que um acúmulo excessivo de leptina, a curto prazo, poderia levar a uma “*down-regulation*” dos receptores centrais e a um reajuste do seu efeito inibitório sobre o apetite. Desta maneira, uma

concentração supranormal de leptina seria necessária para o mesmo efeito inibitório sobre o apetite (RODRIGUES et al. 2003).

1.3. Receptor de leptina

As atividades biológicas da leptina nos tecidos alvo, são realizadas através do receptor da leptina formado por único segmento transmembrana, o qual dimeriza-se quando a leptina liga-se em seu domínio extracelular (TOUW et., 2000).

Existem seis variações ou isoformas descritas do receptor de leptina, (*ObRa*, *ObRb*, *ObRc*, *ObRd*, *ObRe* e *ObRf*) que, segundo alguns autores, (Chua *et al.*, 1997; Tartaglia et.,1997) são basicamente divididos em três classificações: forma solúvel, forma longa e forma curta. A forma solúvel do receptor, possui apenas domínio extracelular e é capaz de ligar-se com a leptina circulante, possivelmente regulando a concentração de leptina livre na circulação. As formas curta e longa do receptor apresentam domínio extracelular idêntico, além de semelhança dos 29 aminoácidos que seguem na porção intracelular, a diferença entre os dois receptores será notada na sequência secundária decorrente do *splicing* alternativo no éxon 3. A forma longa do receptor (*ObRb*) é a mais conservada entre as espécies, e possui aproximadamente 300 aminoácidos em sua porção intracelular. Ao contrário da forma curta do receptor, a função do receptor longo é bem conhecida e de extrema importância para a ação da leptina. (TARTAGLIA et., 1995). Este receptor encontra-se nos mais diversos órgãos incluindo pâncreas, rim,

medula adrenal, placenta, ovários e tecido adiposo e em algumas regiões do cérebro respondendo às ações centrais da leptina (EMILSSON et., 2000, KARLSSON et., 1997).

Figura 1- Receptor Curto (OB-Rs) e Receptor de forma Longa (OB-RL).

(TARTAGLIA et., 1995)

Ainda não está claro o mecanismo de transporte da leptina para dentro do sistema nervoso central (SNC). A isoforma Ob-Ra do receptor é encontrada no endotélio capilar de roedores e de humanos, podendo exercer o papel de transportador ativo da leptina para dentro do cérebro (BANKS et., 1996). Cabe aqui ressaltar, que a obesidade de camundongos *db/db* é causada por uma mutação no gene do receptor Ob-Rb (LEE et., 1996). Estes animais produzem leptina, porém são incapazes de transmitir o sinal de ligação através do receptor anômalo. A mutação ocorrida nos camundongos *db/db* também já foi descrita em humanos, e está associada à obesidade mórbida nestes indivíduos (CLEMENT et., 1998).

O receptor Ob-Rb faz parte da família de receptores das citocinas, ativando o sistema JAK/STAT de transdução do sinal, após sua ligação com a leptina (TOUW et., 2000). O domínio citoplasmático do receptor de leptina (LEPR) possui regiões de interação e ativação das JAK-1 e JAK-2 (AHIMA et., 2004, FRUHBECK et., 2006). A JAK-2 sofre fosforização e ativa a transcrição da proteína STAT-3. Esta proteína se dimeriza e se transloca para o núcleo, ligando-se a regiões promotoras de genes orexigênicos e anorexigênicos, inibindo ou ativando a sua transcrição (BANKS et., 1996).

Figura 2. Interação da Leptina com o seu receptor. (AHIMA et., 2004)

Estudos têm demonstrado que o gene codificador do LEPR, pertence ao cromossomo 1(1p31), e contém 20 éxons (THOMPSON et., 1997). A proteína tem três domínios, sendo o domínio extracelular codificado pelos éxons 3 a 17, o domínio transmembrana pelo éxon 18 e o domínio intracelular pelos éxons 19 e 20.

Figura 3. Gene receptor de leptina

Há forte expressão do gene do receptor Ob-Rb nos diversos núcleos hipotalâmicos que regulam a ingestão alimentar e o controle do gasto energético (WHITE et., 1997). Além disso, a leptina quando injetada dentro dos ventrículos cerebrais, *in vivo*, leva à expressão do fator de transcrição STAT3 e ativação neuronal em núcleos do hipotálamo (Lin et., 2007). Estas evidências dão crédito à idéia de que os efeitos da leptina sobre o balanço energético são mediados pela interação com receptores localizados na região neuronal.

1.4. Polimorfismos do receptor de leptina

O LEPR apresenta heterogeneidade na população humana (CONSIDINI et., 1996), com naturais ocorrências de polimorfismo que codificam para o aminoácido das posições 109 do éxon 4, 223 (éxon 6), 656 (éxon 14), 36 (éxon 17), 85 (éxon 17), 37 (éxon 19), 52 (éxon 19) e 1019

(éxon 20) , entre outros (MATSUOKA et., 1997, THOMPSON et., 1997, YIANNAKOURIS et., 2001, MAMMES et., 2001).

Três polimorfismos têm sido os mais estudados por estarem localizados na região extracelular do LEPR e afetarem os domínios de interação com a leptina (YIANNAKOURIS et., 2001, MAMMES et., 2001).

O polimorfismo Lys109Arg consiste na troca de um aminoácido lisina (Lys) por um aminoácido arginina (Arg) no códon 109 do éxon 4. O polimorfismo Gln223Arg devido à substituição do aminoácido glutamina (Gln) por um aminoácido arginina (Arg) no códon 223 do éxon 6, e o polimorfismo Lys656Asn do aminoácido lisina (Lys) para o aminoácido asparina (Asn) no códon 656 localizado no éxon 14.

Figura 4. Polimorfismos do Receptor de Leptina

Muitos estudos a respeito desses polimorfismos vem sendo conduzidos, a fim de aprofundar o conhecimento sobre as consequências que este e outros polimorfismos podem ocasionar, bem como as interações dos polimorfismos com fatores externos como estilo de vida.

Os estudos investigam a relação do polimorfismo com a regulação do peso corporal, a obesidade, a distribuição da massa gorda (CABRERA et., 2001), o nível de leptina sérica (QUINTON et., 2001), o risco de diabetes

mellitus (SALOPOURO et., 2005), o câncer de mama (WOO et., 2005) e o ganho de peso (VAN ROSSUN et., 2003), entre outros.

Acredita-se que mutações no gene do receptor podem modificar sua função e afetar os níveis séricos de leptina na população em geral (VAN ROSSUN et., 2003).

1.5. Polimorfismo do receptor de leptina e obesidade

Polimorfismos nos receptores da leptina (LEPR) e suas influências na fisiopatologia da obesidade vêm sendo estudados, com resultados que variam de acordo com a população estudada, o gênero, a variante genética, o grau de obesidade e o comportamento alimentar (WAUTERS et., 2001).

Em 1997, Thompson DB et al (1997) e Gotoda T et al (1997) foram os primeiros a descrever a associação entre o polimorfismo no LEPR e o IMC. Esses autores demonstraram que mulheres portadoras do alelo LEPR Lys109Arg apresentaram aumento de peso, na população caucasiana inglesa. Chagnon YC et al (2000) observaram correlação entre o polimorfismo Lys109Arg e o aumento dos valores de IMC e quantidade de massa adiposa, canadenses caucasianos e negros, o que também foi verificado por Wauters M et al (2001) em jovens gregos. Rosmond et al (2001) estudando a influência das frequências do polimorfismo LEPR Lys109Arg na composição lipídica da população Suíça, observaram que obesos portadores do genótipo homozigoto Arg109Arg apresentavam concentrações de lipoproteína de alta densidade (HDL) maiores que os

portadores dos demais genótipos. Estes resultados sugerem que este polimorfismo pode contribuir para a correlação da obesidade com a doença cardiovascular.

O polimorfismo Gln223Arg foi associado ao aumento do peso e à mudança no funcionamento normal do LEPR, predispondo à resistência leptínica (YIANNAKOURIS et., 2001). Em estudos recentes, o polimorfismo Gln223Arg foi associado com o desenvolvimento da obesidade, em adolescentes mexicanos e em espanhóis de origem mediterrânea (GUIZAR-MENDOZA et., 2005; PORTOLÉS et., 2006).

Dois estudos realizados na população brasileira apresentaram resultados controversos. Duarte SF et al (2007) observaram associação deste polimorfismo com obesidade, enquanto Santos AFR et al (2005) não encontraram. Por outro lado, o genótipo Gln223Gln do LEPR foi relacionado com maiores concentrações de triglicérides e menores de HDL em indivíduos obesos da população Suíça (ROSMOND et., 2001). Portanto a relação desse polimorfismo com a obesidade e o perfil lipídico ainda é controverso.

Na elegante investigação Québec Family Study, Chagnon YC et al (2000) avaliaram as três formas, descritas anteriormente, do polimorfismo do LEPR na gênese da obesidade e demonstraram associação entre o polimorfismo do gene Gln223Arg com IMC e tecido gorduroso aumentados, concluindo que a variância genética do LEPR para Gln223Arg possui um efeito significativo na adiposidade dos indivíduos desta população. No

entanto, não houve associação desses 3 polimorfismos com a composição corporal após ajuste para idade, gênero e altura, com exceção de uma fraca relação entre o acúmulo da massa de gordura corporal e o polimorfismo Lys656Asn no sexo feminino.

Em relação ao polimorfismo Lys656Asn do LEPR, WAUTERS M et al (2001) também demonstraram associação deste genótipo ao sobrepeso corporal. Gotoda T et al (1999), no entanto, demonstrou apenas um pequeno efeito do polimorfismo Lys656Asn em relação ao IMC, o que ocorreu somente na população magra. Em estudo realizado na Espanha, constatou-se que indivíduos com o genótipo Lys656Asn apresentavam mudanças em sua composição corpórea como perda de peso, diminuição do índice cintura-quadril e conseqüentemente no valor de IMC (ROMAN et., 2006). Por outro lado, Rosmond R et al (2000) não encontraram relação do genótipo Lys656Asn com parâmetros metabólicos.

No entanto, Chagnon YC et al (1999) e Wauters M et al (1999), também não encontraram associação dos polimorfismos no LEPR com IMC ou níveis de leptina em mulheres obesas. Corroborando com esse estudo, Heo M et al (2002), em uma meta-análise composta por nove estudos, com total de 3263 indivíduos de ambos os sexos, não demonstrou associação desses 3 genótipos do receptor de leptina com o IMC, após ajuste para idade e gênero.

Podemos observar que polimorfismos comuns dos genes LEPR estão associados com obesidade, aumento de IMC e outras manifestações

decorrentes da obesidade. Entretanto, esses dados são encontrados em algumas populações e parecem estar relacionados com a etnia o gênero e fatores ambientais. Evidencia-se a necessidade de um melhor entendimento do papel desses polimorfismos na variabilidade da leptina no plasma e sua relação com a obesidade.

1.6. Polimorfismo do receptor de leptina e atividade nervosa simpática

Já foi demonstrado que o polimorfismo Gln223Arg localiza-se na região que codifica o domínio extracelular do LEPR. Este polimorfismo parece alterar as características funcionais do receptor, permitindo supor que essa variante polimórfica Gln223Arg interfere na capacidade de ligação do LEPR (QUINTON et., 2001).

Guizar-Mendoza JM et al (2005), estudando o efeito do polimorfismo Gln223Arg do receptor da leptina na atividade nervosa simpática em adolescentes obesos mexicanos, demonstrou correlação desse polimorfismo com maior atividade nervosa simpática aferida por eletrocardiograma de repouso. Os autores concluíram que a forma polimórfica Gln223Arg do receptor LEPR poderia ser um fator que influencia na ativação do sistema nervoso simpático no controle do balanço energético.

Masuo K et al (2008), demonstraram em homens adultos caucasianos, que a presença do polimorfismo Gln223Arg ou Lys656Asn, resultava em menor concentração de norepinefrina e maior leptinemia e IMC, quando comparados com os grupos que carregavam as formas selvagens,

Gln223Gln e Lys656Lys, desse receptor. Corroborando com esse estudo, Yiannakouris N et al (2001) observaram que na presença do polimorfismo Gln223Arg, os indivíduos eram mais propensos à obesidade, face a redução no gasto energético, precedida por baixa atividade nervosa simpática.

Curiosamente, Chung WK et al (1998) demonstrou uma influência significativa no metabolismo adiposo por menor ativação simpática, em ratos que apresentavam mutações no LEPR. Estes resultados sugerem que variações nos genes do LEPR interferem na funcionalidade entre leptina e o seu receptor na ativação do sistema nervoso simpático.

Rosmond R et al (2000), observaram que homens obesos com o gene homozigoto Lys109Lys e hiperleptinemia, apresentavam níveis maiores de pressão arterial, quando comparados com a forma homozigota Arg109Arg. Estes autores consideraram que tais evidências resultavam de uma maior atividade nervosa simpática mediada pelos receptores de leptina.

Tais resultados sugerem que a variação genética no LEPR, parece ser um fator determinante no desenvolvimento da obesidade associado à atividade nervosa simpática e hipertensão, podendo explicar, em parte, a presença de níveis tensionais normais em indivíduos obesos.

1.7. Leptina, polimorfismo do receptor de leptina e exercício físico

Um importante efeito do treinamento físico está relacionado ao balanço energético negativo (WEINSTOCK et., 1998). O exercício físico leva a adaptações metabólicas que contribuem para o controle do peso corporal,

aumentando o metabolismo de repouso (SARIS et., 1993) e a oxidação de lípidos e glicose (CRAMPS et., 1986).

Sabe-se que o exercício físico aeróbio beneficia o sistema cardiovascular e a homeostase da glicose, melhorando a sensibilidade à insulina. Essa melhora da tolerância glicídica é devida à maior oxidação de ácidos graxos no músculo esquelético e consequentemente diminuição no conteúdo de triglicérides muscular. Segundo Minokoshi Y et al (2002) a leptina aumenta diretamente a oxidação de ácidos graxos no músculo esquelético através da ativação da AMPK (proteína quinase ativada pelo AMP), mas também indiretamente, através do SNS (MINOKOSHI et., 2002).

Estudos foram realizados na intenção de verificar os efeitos do exercício físico aeróbio moderado, tanto agudo quanto crônico na concentração de leptina, além de sua influência sobre outras variáveis metabólicas. Os resultados encontrados são em grande maioria conflitantes.

Em relação ao efeito agudo do exercício moderado prolongado, não foi encontrada diferença significativa entre a concentração de leptina antes e após a realização do exercício físico (RACETTE et., 1997; PERUSSE et., 1997). No entanto, apenas após uma sessão aguda de exercício físico extremo, como uma ultramaratona, na qual há um balanço energético negativo, é que observa-se diminuição das concentrações de leptina.

Houdmard JA et al (2000) e Kraemer RR et (1999) investigaram os efeitos crônicos da atividade física aeróbia e não relataram alterações na concentração de leptina plasmática. Entretanto outros autores encontraram alterações na leptinemia apenas em função das alterações da adiposidade

(FRIEDMAN et., 1997, PERUSSE et., 1997, LEVIN et., 2004). Todavia, uma série de estudos observou diminuição da concentração plasmática e/ou expressão de leptina, independentemente de alterações da massa gorda, sugerindo que é possível que existam outros fatores, além do conteúdo de gordura corporal, que possam modular a concentração plasmática de leptina após o treinamento aeróbio. (RACETTE et., 1997, ROSENBAUM et., 1997, MIYATAKE et., 2004, HAYASE et., 2002).

Alguns estudos demonstraram que a diminuição do tecido adiposo em resposta ao exercício está relacionada a alterações no receptor longo, Ob-Rb. Kimura M et al (2004) investigaram o papel do exercício espontâneo em ratos sobre a expressão da leptina após um período de 12 semanas. Os ratos apresentaram redução na gordura corporal e diminuição na concentração de leptina, além de *downregulation* no mRNA do receptor após o período do estudo. Corroborando com esse achado, Marti A et al (1998) também relatou diminuição da expressão do receptor de leptina no hipotálamo, devido ao treinamento físico. Tais alterações podem associar-se a um acentuado aumento da fosforilação/atividade no sistema JAK/STAT3 (GHILARDI et., 1996, BAUMANN et., 1996).

LAKKA TA et al (2004) estudando as variações genéticas Gln223Arg, Lys656Asn e Lys109Arg presentes nos receptores de leptina na HERITAGE Family Study, demonstrou existir uma associação da forma polimórfica Lys109Arg com maior magnitude nos efeitos da atividade física regular sobre homeostase da glicose em indivíduos não-diabéticos, quando comparados com as outras variações genéticas. Os autores desse elegante estudo

sugerem que o polimorfismo dos genes Gln223Arg, Lys656Asn do LEPR podem induzir uma disfunção leve na via de sinalização e assim atenuar os efeitos favoráveis do exercício físico regular na homeostase de glicose.

Luis Roman D et al (2006) investigaram a influência do polimorfismo sobre a perda de peso após treinamento físico e demonstraram que pacientes obesos que apresentavam a forma polimórfica Lys656Lys tinham redução significativa no peso, IMC, massa gorda, na relação cintura-quadril, pressão arterial sistólica e nos níveis de leptina.

Tais investigações refletem as possíveis consequências decorrentes dos polimorfismos do LEPR sobre obesidade e sua relação com SNS. Além disso há fortes evidências de que esses polimorfismo interfiram sobre os efeitos biológicos do exercício físico. Portanto esse estudo se propõe a estudar essas relações e suas consequências.

2. Justificativa

A partir destes conhecimentos obtidos em estudos recentes, temos como proposta compreender como os polimorfismos do gene do receptor de leptina, afetam os processos fisiológicos, expandindo o conhecimento atual sobre os fatores genéticos que influenciam a massa de gordura e a predisposição à obesidade. O modelo de estudo proposto utiliza uma ferramenta eficaz para a investigação hemodinâmica, visto que as manobras experimentais apresentam grandes estimulações do controle neurovascular podendo levar a novas estratégias terapêuticas para as variantes específicas do LEPR para o tratamento da obesidade.

3. Hipótese

Neste estudo foram testadas as seguintes hipóteses:

1. A presença de variantes alélicas do gene do receptor de leptina confere a mulheres obesas mudanças na composição corporal, nas variáveis metabólicas, hemodinâmicas e neurovasculares.
2. Existe influência do treinamento físico e dieta hipocalórica, em mulheres obesas portadoras das variantes alélicas do gene do receptor leptina, sobre as variáveis metabólicas, hemodinâmicas e neurovasculares.

4. Materiais e métodos

A pesquisa genética foi desenvolvida no laboratório LIM 25 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), na Disciplina de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas (HC-FMUSP). As avaliações hemodinâmicas e neurovasculares foram realizadas durante o projeto de tese anterior utilizando esta população, na Unidade de Reabilitação Cardiovascular e Fisiologia do Exercício do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da FMUSP. O estudo foi analisado pelo Comitê de Ética da Instituição. Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, conforme normas da Comissão de Ética.

4.1. População do estudo

Foram avaliadas retrospectivamente 216 mulheres obesas voluntárias, utilizando o banco de dados previamente já avaliado e coletado da tese: “Aspectos Genéticos e Ambientais da Obesidade” (anexos), aprovado pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, protocolo de pesquisa: **755/98**. Desta, somente 179 passaram por todas as avaliações iniciais e 80 concluíram as intervenções. Todas as mulheres obesas foram genotipadas para os polimorfismos presentes no receptor da leptina (LEPR) Gln223Arg

(A3468G), Lys109Arg (A1960G) e Lys656Asn (G9546C) situados nos éxon 6 , éxon 4 e éxon 14 respectivamente.

Inicialmente, as voluntárias passaram por uma avaliação clínica e laboratorial para determinação do estado de saúde. As pacientes, não aparentadas, foram acompanhadas pelo Ambulatório de Obesidade do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, e sem utilização de medicação de uso crônico. Foram avaliadas clinicamente e laboratorialmente no Ambulatório de Obesidade do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, e a avaliação da capacidade cardiorrespiratória e das variáveis neurovasculares (controle autonômico) e hemodinâmicas durante manobras fisiológicas (hand grip e estresse metal), foram realizadas na Unidade de Reabilitação Cardiovascular e Fisiologia do Exercício do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Critérios de inclusão: mulheres obesas, idade entre 18-42 anos e índice de massa corpórea de 30-35kg/m² (a aferição do peso e altura realizada durante o recrutamento).

Critérios de exclusão: Indivíduos com doenças endocrinológicas ou genéticas que levem a obesidade. Mulheres obesas engajadas em programa de atividade física, consangüinidade, perda de 5% de peso nos últimos seis meses, fumantes, e portadoras de doenças crônicas ou em uso de medicações.

4.2. Avaliação da composição corporal

4.2.1. Parâmetros Antropométricos

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

Altura: A altura (m) foi determinada por meio de um estadiômetro, graduado em centímetro 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.

Índice de Massa Corpórea: A obesidade foi 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 ($IMC = \text{peso (kg)} / \text{altura}^2(\text{m})$).

Circunferência abdominal: A circunferência do abdômen foi medida com fita plástica não-elástica com 0,7cm de largura, no ponto médio entre a crista ilíaca e o rebordo inferior da última costela. Foram realizadas três medidas consecutivas, sempre pelo mesmo avaliador, estando o paciente despido e de pé, com braços ligeiramente separados do corpo e em expiração.

4.2.2. Análise da composição corporal pelo método de densitometria dual energy x ray absorptometry

A composição corporal foi avaliada por meio das medidas de tecidos moles periféricos e centro-regionais através das medidas por densitometria *Dual Energy X ray Absortometry* (DEXA) (HOLOGIC QDR-2000 DENSITOMETER).

A técnica de absorbância utiliza um sistema que emite os “Haces” do raio X (dual energy X ray absorptiometry, DEXA). Esta técnica baseia-se na diferente atenuação que apresentam os “Haces” do raio X de diferentes energias ao atravessar os diferentes tecidos do organismo. Utilizado na valorização da massa óssea, este método é capaz de estimar com precisão a massa gorda e massa livre de massa gorda, dividindo-se, portanto, o organismo em três compartimentos. O indivíduo foi colocado na posição supina e nesta posição permanecerá imóvel durante toda a exploração. A radiação de exposição será muito pequena (variará de 0,05 a 1,5 gasto energético de repouso). O tempo utilizado variou, em média, de 5 a 30 minutos. Não houve necessidade de preparo prévio do indivíduo para a exploração.

4.3. Análise do gasto energético pela calorimetria indireta

A avaliação do metabolismo de repouso nas mulheres foi realizada pela manhã, após 12 horas de jejum no ambulatório de Obesidade do

Hospital das Clínicas da Disciplina de Endocrinologia. Foi utilizado um monitor metabólico (calorímetro) DELTATRAC o qual faz medidas constantes de gases inspirados e expirados para a concentração de oxigênio (O_2) e gás carbônico (CO_2). Com este procedimento, o monitor calcula a queima calórica a partir do equivalente energético. Também foi calculado o coeficiente respiratório, obtido da relação entre as concentrações de CO_2 expirado e O_2 inspirado. Com estes dados, foram obtidos o metabolismo de repouso e as proporções do consumo de energia a partir de lipídios, carboidratos e proteínas.

Foram seguidas as orientações do *Quick Guide, Deltatrac Metabolic Monitor, Detex-Engstrom Finland* quanto ao prévio aquecimento do aparelho, sua calibração e cuidados com a paciente. A paciente ficou em repouso durante 30 minutos, deitada na posição supina antes de ser colocada a campânula transparente ao redor da cabeça e pescoço. Após ser colocada a campânula, foi mantida uma ventilação constante de 40,4 L/min, a qual é ligada ao monitor através de um tubo. A variação da respiração foi feita constantemente e registrado o valor médio a cada minuto, durante 35 minutos, sendo que os primeiros 5 minutos foram desprezados por ser considerado o período de adaptação.

4.4. Métodos laboratoriais

A coleta de sangue venoso periférico foi realizada após 12 horas de jejum com determinação de todas as medidas laboratoriais descritas a seguir.

Dosagem de glicemia: A determinação da glicose plasmática foi realizada no laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. A concentração plasmática de glicose foi determinada em analisador automático, modelo Cobas Integra da Roche, pelo método enzimático colorimétrico utilizando a hexoquinase. O intervalo de referência considerado para os valores normais de glicemia é de 70 a 100 mg/dL.

Dosagem de insulina: A concentração sérica da insulina foi determinada no Laboratório de Hormônio e Genética Molecular da Disciplina de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo método de imunofluorométrico AutoDELFIA (Wallac Oy, Turku, Finlândia). Os valores são expressos em microunidade por mililitro (uU/mL) de soro. Valor de referência: < 25 uU/mL.

Dosagem de leptina: A concentração sérica da leptina foi determinada no Laboratório de Estudo Molecular da Obesidade, LIM 25 da FMUSP pelo, método de imunofluorimétrico utilizando o kit HL-81K de reagente DSL-231000, Inc, Texas, EUA. Os valores foram expressos em nanograma por mililitro (ng/mL).o por este método é 0,5 ng/mL. As análises foram realizadas

em duplicata. O limite mínimo de detecção do ensaio da leptina foi de 2,5 ng/mL. O coeficiente de variação intra-ensaio foi de 2,6%.

Avaliação dos lípides plasmáticos foram realizadas no laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo: As dosagens de colesterol total (CT), HDL-C e triglicérides (TG) plasmáticas foram realizadas em sistema automatizado COBAS MIRA (F. Hoffmann-La Roche, Basiléia, Suíça), utilizando kits enzimáticos comerciais da Roche (Mannheim, Alemanha). A concentração de colesterol nas frações LDL e VLDL foram determinadas pela equação de Friedwald, onde $VLDL-C = TG/5$ e $LDL-C = CT - (HDL-C + VLDL-C)$ (FRIEDWALD et., 1972).

4.5. Avaliação dos parâmetros metabólicos

Resistência insulínica: O Homeostasis Model Assesment (HOMA) é um modelo matemático que se baseia na interação da glicose com a insulina (MATTHEWS et., 1985). O HOMA tem sido proposto como um método para avaliar a sensibilidade ou resistência à insulina e função das células β , a partir das concentrações de insulina e glicose em jejum. Neste método, *scores* altos denotam baixa sensibilidade à insulina.

A análise da resistência à insulina se faz utilizando a seguinte fórmula:
 $\text{Resistência à insulina (IR)} = \frac{\text{insulina } (\mu\text{U/mL}) \times \text{glicose (mmol/L)}}{22,5}$.

Teste oral de tolerância a glicose: No teste oral de tolerância a glicose o sangue venoso periférico foi coletado para a determinação das

concentrações de glicose e insulina nos tempos 0, 30, 60, 90, 120 min com a finalidade de excluir pacientes com diabetes, além de se estimar pacientes com resistência à insulina. Os valores de glicose e insulina plasmáticas foram utilizados para a determinação da área sob a curva.

4.6. Avaliação molecular

4.6.1. Extração de DNA

A extração de DNA genômico de leucócitos foi realizada com sangue periférico segundo o método de Salting Out de MILLER et AL (1988) no Laboratório de Estudo Molecular da Obesidade, LIM 25 da FMUSP . Foi coletado 10 mL de sangue venoso em tubos contendo 25 mM EDTA (ácido etilenodiaminotetracético). O *pellet* leucocitário foi obtido a partir da lise dos glóbulos vermelhos utilizando solução de lise (1mM NH_4HCO_3 , 114 mM NH_4Cl), com incubação a 4°C por 30 minutos, seguida de centrifugação a 4°C por 15 minutos a 3000 rpm (Hettich-Rotina 35R, Alemanha) desprezando-se o sobrenadante. Esse procedimento foi repetido mais uma vez. O botão de glóbulos brancos foi suspenso em 6 mL de solução de lise de glóbulos brancos (TEN buffer), 120 μL de SDS 10% (Sigma, St.Louis, MO, EUA), 80 μL de proteinase K (10mg/mL) (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, EUA) e incubado por 18 horas à 37°C. Foi adicionado 2,4 mL de NaCl saturado. O material foi centrifugado por 15 min a 3000 rpm. Ao sobrenadante contendo o DNA desproteinizado adicionou-se 2 volumes de etanol absoluto gelado e homogeneizado cuidadosamente por inversão. O DNA precipitado foi lavado duas vezes com etanol gelado a 70% e,

posteriormente com etanol absoluto. Em seguida centrifugado a vácuo (SpeedVac System, Savant ISS100, NY, EUA) durante 5 min e, ressuspenso em solução de TE pH 8 (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1mM).

A concentração do DNA foi estimada a partir da leitura da densidade óptica por espectrofotometria com luz ultravioleta (GeneQuant Pro, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia). O grau de pureza avaliado pela relação de absorbância de 260 e 280 nm, e a integridade do material verificada em eletroforese de gel de agarose a 1%. As amostras foram armazenadas a 4°C até sua utilização.

4.6.2. Genotipagem

Os SNPs (rs1137100, rs1137101, rs8179183) do gene receptor leptina foram genotipados no Laboratório de Estudo Molecular da Obesidade, LIM 25 da FMUSP, por ensaios pré-desenvolvidos de discriminação alélica com TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, USA). A reação de PCR num total de 10µL, seguiu o protocolo de amplificação: 60°C por 30 s, 95°C 10 min, 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min e 60°C por 30s. A discriminação alélica foi realizada automaticamente usando ABI Step One Plus Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems), analisada pelo software do aparelho.

4.7. Avaliação dos parâmetros hemodinâmica e neurovasculares

Avaliação da Frequência Cardíaca. A frequência cardíaca foi obtida através do registro eletrocardiográfico. O sinal do eletrocardiograma será aquisitado em um computador e, em seguida, analisado por um programa específico (AT/CODAS), numa frequência de 500 hz.

Avaliação da Pressão Arterial. Durante o protocolo em repouso e o protocolo de stress mental, a pressão arterial foi medida continuamente, a cada batimento cardíaco, através de um método não-invasivo. Foi colocado um manguito de tamanho adequado em torno do dedo médio da mão direita, mantendo-se o braço direito apoiado sobre uma mesa de altura ajustável de modo que o dedo fique na altura do ventrículo esquerdo. Esse manguito foi conectado a um monitor de pressão arterial (Ohmeda, 2300 Finapress), o qual aferiu a pressão arterial sistólica, diastólica e média a cada batimento cardíaco. Esse sinal foi aquisitado em um computador e, em seguida, analisado em um programa específico (AT/CODAS), numa frequência de 500 Hz.

Durante o protocolo de exercício isométrico, a pressão arterial foi medida no membro inferior esquerdo pelo método oscilométrico, com medidas intermitentes a cada 60 segundos, utilizando-se um monitor automático (Dixtal).

Avaliação do Fluxo Sanguíneo Muscular. O fluxo sanguíneo muscular foi avaliado pela técnica de pletismografia de oclusão venosa. O braço contralateral (aquele que não foi realizando o exercício isométrico) foi

elevado acima do nível do coração para garantir uma adequada drenagem venosa. Um tubo silástico preenchido com mercúrio, conectado a um transdutor de baixa pressão e a um pletismógrafo, foi colocado ao redor do antebraço, a 5cm de distância da articulação úmero-radial e conectado a um pletismógrafo. Um manguito foi colocado ao redor do pulso e outro na parte superior do braço. O manguito do pulso foi inflado a um nível supra-diastólico 1 minuto antes de se iniciar as medidas. Em intervalos de 15 segundos, o manguito do braço foi inflado acima da pressão venosa por um período de 7 a 8 segundos. O aumento em tensão no tubo silástico refletirá o aumento de volume do antebraço e, conseqüentemente, sua vasodilatação. A resistência no antebraço foi calculada pela divisão da pressão arterial média (mmHg) pelo fluxo sanguíneo no antebraço (ml/min/100ml).

Avaliação do Fluxo Respiratório. O fluxo respiratório foi avaliado através de uma cinta posicionada ao redor do tórax. O fluxo respiratório foi registrado continuamente durante o experimento e, em seguida, analisado através de um computador pelo programa AT/CODAS.

Avaliação da atividade nervosa simpática. A atividade nervosa simpática muscular foi avaliada através da técnica direta de registro de multiunidade da via pós-gangliônica eferente, do fascículo nervoso muscular, do nervo fibular imediatamente inferior à cabeça da fíbula, na perna direita (WALLIN et., 1993). Os registros foram obtidos através da implantação de um microeletrodo neste nervo e de um microeletrodoutilizado como referência à aproximadamente um centímetro de distância do primeiro. Os eletrodos foram conectados a um pré-amplificador e o sinal do nervo foi

alimentado através de um filtro passa-banda. Em seguida, esse sinal foi dirigido a um discriminador de amplitude para armazenagem em osciloscópio e em caixa de som. Para fins de registro e análise, o neurograma filtrado foi alimentado através de um integrador de capacitância-resistência, para a obtenção da voltagem média da atividade neural. Essa técnica tem sido validada e empregada em estudos de laboratório em humanos.

A atividade nervosa simpática muscular foi inicialmente analisada manualmente, através do sinal do nervo e do número de descargas ocorridas por minuto ou do número de descargas a cada 100 batimentos. E, em seguida, foi analisada através do programa AT/CODAS sem integrar do sinal do nervo.

4.8. Avaliação da capacidade cardiorrespiratória durante o exercício progressivo máximo

A avaliação da capacidade física de pico foi realizada através da medida direta do consumo de oxigênio no pico do exercício ($\text{VO}_{2\text{pico}}$).

Simultaneamente ao teste de esforço, o indivíduo foi conectado a um ergoespirômetro computadorizado (SensorMedics - Vmax Series modelo Vmax 229 Pulmonary Function/Cardiopulmonary Exercise Testing Instrument), através de um sistema de sensor onde a ventilação pulmonar (VE) foi medida a cada expiração. Através de sensores de oxigênio (O_2) e de dióxido de carbono (CO_2) foram analisadas as concentrações de O_2 e CO_2 ,

respectivamente a cada ciclo respiratório. A partir das análises da VE e das concentrações dos gases expirados, foram computados o VO_2 e a produção de CO_2 .

Foi considerado como VO_2 pico o consumo de oxigênio obtido no pico do exercício, quando o indivíduo não conseguia mais manter a velocidade do pedal da bicicleta em 60 rotações por minuto, portanto, quando o indivíduo estava em exaustão.

4.9. Determinação do limiar anaeróbio e do ponto de compensação respiratória

Além da determinação da capacidade funcional máxima do participante, foram determinados o limiar anaeróbio (LA) e o ponto de descompensação respiratória (PDR) (SKINNER et., 1980) que foram utilizados para a prescrição da intensidade de treinamento físico.

O LA foi determinado no minuto em que o indivíduo apresentou valores mínimos de equivalente ventilatório de O_2 (VE/VO_2) e pressão parcial de oxigênio no final da expiração (PetO_2), antes que estes parâmetros iniciassem um aumento progressivo, e incremento não linear do valor de razão de troca respiratória (RER).

O PDR foi determinado no minuto em que o indivíduo apresentou valor mínimo de equivalente ventilatório de CO_2 (VE/VCO_2), antes que este parâmetro iniciasse um aumento progressivo, e o valor máximo de pressão

parcial de CO₂ no final da expiração (PetCO₂), antes que iniciasse uma queda progressiva nesta resposta.

4.10. Protocolo experimental

Experimento 1: Pressão arterial, fluxo sanguíneo muscular, frequência cardíaca, fluxo respiratório e atividade nervosa simpática em repouso.

O protocolo de repouso foi realizado no início e após quatro meses de intervenção.

Os indivíduos do estudo chegaram às 07h30min horas da manhã ao laboratório, onde foram inicialmente pesados e medidos. Em seguida foram colocados os eletrodos para registro da frequência cardíaca, o anel para registro da pressão arterial a cada batimento cardíaco, pelo método não-invasivo (Finapress), a cinta para registro do fluxo respiratório, e a implantação de um microeletrodo no nervo fíbular da perna direita para o registro da atividade nervosa simpática. No braço e antebraço (punho) esquerdo foram colocados os manguitos, juntamente com o "strain gauge" de mercúrio para a medida do fluxo sanguíneo muscular.

Foram feitos registros da frequência cardíaca, do fluxo respiratório e da pressão arterial por um período de 4 minutos (Basal).

Experimento 2: Efeito agudo do exercício isométrico na frequência cardíaca, pressão arterial, fluxo sanguíneo muscular e na atividade nervosa simpática.

O protocolo de exercício isométrico (RAY et., 1993) foi realizado no início e após quatro meses de intervenção.

Após o período de registro em repouso, foi retirado o anel do Finapress e colocado o manguito na perna esquerda para a medida da pressão arterial. Permanecem os manguitos no punho e braço esquerdo, juntamente, com o "strain gauge" de mercúrio para a medida da força de contração voluntária máxima. Em seguida, foi iniciado o estudo que consistirá de: 3 minutos de registro basal, 3 minutos de exercício de contração voluntária máxima à 30%, seguidos de 3 minutos de recuperação.

Figura 5 – Protocolo de avaliação das manobras fisiológicas em 10% e 30% da contração voluntária máxima (CVM)

Experimento 3. Pressão arterial, fluxo sanguíneo muscular e a atividade nervosa simpática durante stress mental.

O protocolo de stress mental (MIDDLEKAUFF et., 1997) foi realizado no início e após quatro meses de intervenção por treinamento físico.

Foi medida, simultaneamente a frequência cardíaca, o fluxo sanguíneo muscular, a pressão arterial (com o finapress novamente), frequência respiratória e a atividade nervosa simpática. O protocolo experimental consiste de 3 minutos de repouso, 4 minutos com o teste de cores e mais 3 minutos de recuperação.

4.11. Protocolo de dieta hipocalórica

Após o indivíduo ter realizado os exames iniciais, foram feitas a avaliação e orientação nutricional, com o objetivo de submeter os participantes a dieta hipocalórica por quatro meses. A avaliação e orientação dietética foram realizadas por um nutricionista e a aderência controlada em consultas quinzenais, através da avaliação do peso corporal e inquérito alimentar.

Foi realizada a anamnese alimentar, onde foi questionado o hábito alimentar do indivíduo para se detectar os possíveis erros dietéticos e possibilitar uma correta intervenção. O hábito alimentar foi analisado em relação às quantidades de proteínas totais, carboidratos totais, carboidratos simples, carboidratos complexos, gordura total, gordura poliinsaturada, monoinsaturada e insaturada, fibras dietéticas, colesterol dietético e sal.

A dieta foi calculada de acordo com o valor estimado pela equação da Organização Mundial da Saúde, que se baseia no gasto energético de repouso a partir da equação do Índice Metabólico Basal (QUADRO 1), de acordo com o sexo e a faixa etária (WHO 1995). O cálculo fornece o resultado em Mjoule/dia e foi, portanto, multiplicado por 240, para convertê-lo em quilocalorias (kcal). Este valor foi, então, multiplicado pelo fator atividade (1,3 para atividade leve e moderada, de acordo com a WHO, 1995) e, por fim, decrescido em 600 quilocalorias, para se obter o valor calórico total estimado a ser consumido pelo indivíduo, visando a perda de no mínimo, dois quilogramas por mês.

QUADRO 1. ÍNDICE METABÓLICO BASAL (WHO, 1995)

SEXO	IDADE	CÁLCULO
MULHERES	18 - 30 anos	$0.0621 \times \text{peso real em kg} + 2.0357$
	31 - 60 anos	$0.0342 \times \text{peso real em kg} + 3.5377$
	> 60 anos	$0.0377 \times \text{peso real em kg} + 2.7545$
HOMENS	1 - 30 anos	$0.063 \times \text{peso real em kg} + 2.8957$
	31 - 60 anos	$0.0484 \times \text{peso real em kg} + 3.6534$
	> 60 anos	$0.0491 \times \text{peso real em kg} + 2.4587$

A dieta foi dividida em cinco refeições, cuja composição dos alimentos será dividida em 55 a 75% de carboidratos totais, 10 a 15% de proteínas totais e 15 a 30% de lipídeos totais (WHO, 1995). O controle foi realizado nos retornos quinzenais, quando foram feitas a reavaliação do peso corporal e avaliação da aderência à orientação dietética com o auxílio também do

recordatório de 24 horas (relato feito pelo próprio indivíduo relacionando todos os alimentos que ele consumiu nas últimas 24 horas).

4.12. Protocolo de treinamento físico

Após as avaliações iniciais, um grupo de obesas foi submetido a um período de quatro meses de treinamento físico (AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE, 2000), com uma frequência de três sessões semanais e duração de 60 minutos, assim distribuídos:

- 5 minutos de alongamento;

- 40 minutos exercício aeróbio (bicicleta ergométrica), com intensidade no limiar anaeróbio no início do treinamento, progredindo para intensidades maiores, variando entre o limiar anaeróbio e 10% abaixo do ponto de descompensação respiratória, que foi aferida pela frequência cardíaca correspondente à apresentada na avaliação cardiorrespiratória;

- 10 minutos de exercícios de resistência muscular localizada; e

- 5 minutos de relaxamento.

Os indivíduos do grupo submetido somente à dieta hipocalórica permanecerão sedentários.

4.13. Sequência experimental

As sessões descritas a seguir foram realizadas com intervalo mínimo de três dias.

Visita nº 1:

- Anamnese;
- Exame Físico;
- ECG de Repouso;
- Solicitação de Exames Complementares
- Orientação ao Paciente;
- Termo de Consentimento Informado.

Visita nº 2:

Avaliação da capacidade funcional pela ergoespirometria.

Visita nº 3:

- Protocolo Experimental: Avaliação da Resposta da Atividade Nervosa Simpática e Fluxo Sangüíneo Regional durante Exercício Isométrico e o "Stress" Mental.

Figura 6 – Desenho do estudo

4.14. Análise estatística

Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro-padrão. Utilizamos o programa Helix TreeTM para calcular o Equilíbrio de Hardy-Weinberg e o desequilíbrio de ligação entre os SNPs.

As variáveis analisadas neste estudo foram submetidas ao teste de *Kolmorovsminoff* para considerar se apresentavam distribuição normal. As variáveis que não apresentaram esta distribuição foram analisadas após transformação logarítmica.

4.14.1. Análise da influência dos polimorfismos do receptor LEPR sobre as características antropométricas, metabólicas e neurovasculares.

Dados das características antropométricas, metabólicas e os dados neurovasculares e hemodinâmicos basais de ambos os grupos foram submetidos à análise estatística teste *t* de *student* com nível de significância aceito de $P < 0.05$.

A análise de variância de dois fatores para medidas repetidas (two-way ANOVA) foi utilizada para: análise do comportamento das variáveis neurovasculares e hemodinâmicas durante exercício isométrico de preensão de mão (10 ou 30% da contração voluntária máxima) e o “stress” mental. Em casos de *F* significativo, foram realizadas comparações post-hoc de Scheffè, com nível de significância aceito de $P < 0.05$.

4.14.2. Influência da mudança do hábito de vida nos polimorfismos do receptor LEPR sobre as características antropométricas, metabólicas e neurovasculares.

Dados antropométricos, metabólicos e neurovasculares basais foram submetidos a análise de variância de um caminho (one-way ANOVA) para amostras repetidas. Dados basais do exercício isométrico de preensão de mão (10 ou 30% da contração voluntária máxima) e “stress” mental foram submetidos à análise de variância de três caminhos (two-way ANOVA) para amostras repetidas. Em casos de F significativa, foram realizadas comparações post-hoc de Scheffè, com nível de significância aceito de $P < 0.05$.

5. Resultados

Foram avaliadas e genotipadas para os polimorfismos presentes no gene do receptor de leptina (*LEPR*), 179 mulheres obesas voluntárias e elegíveis para o protocolo de estudo. A frequência genotípica dos *single nucleotide polymorphisms* (SNPs), rs1137100, rs1137101 e rs8179183 encontra-se na Tabela 1.

Oitenta pacientes completaram o protocolo de mudança no hábito de vida composto por dieta hipocalórica e treinamento físico. Analisamos a influência da presença do polimorfismo do receptor LEPR (SNPs), rs1137100, rs1137101 e rs8179183 sobre as variáveis antropométricas, metabólicas, neurovasculares e no comportamento das variáveis neurovasculares durante as manobras fisiológicas nos grupos estudados.

5.1. Avaliação basal

As frequências genotípicas esperadas e encontradas pelo cálculo de Equilíbrio de Hardy-Weinberg estão na **Tabela 1**. A frequência genotípica esperada pelo cálculo matemático, $p > 0,05$, demonstra que o polimorfismo já está estabelecido na amostra estudada.

Nas **Tabelas 2, 3 e 4** observamos os dados basais referentes às características antropométricas, metabólicas e neurovasculares dos subgrupos estudados em cada frequência genotípica encontrada.

5.1.1. SNP- rs1137100

Para avaliar a influência desse SNP nos parâmetros antropométricos, metabólicos e neurovasculares, dividimos os indivíduos em dois grupos de pacientes que apresentavam os alelos polimórficos: 118 pacientes Homozigotos AA (Lys109Lys), e 58 pacientes AG+GG (Arg109Arg e Lys109Arg). Em relação aos parâmetros antropométricos e metabólicos, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos estudados (**Tabela 2,3**).

Os dados basais da atividade nervosa simpática e das variáveis hemodinâmicas foram semelhantes entre os grupos Lys109Lys e na associação Lys109Lys/Lys109Arg (**Tabela 4**).

5.1.2. SNP- rs1137101

As 179 pacientes selecionadas, também foram divididas em dois grupos que apresentavam os alelos polimórficos: 49 pacientes Homozigotos AA (Gln223Gln), e 127 pacientes AG+GG (Arg223Arg/Gln223Arg).

Não observamos diferenças em relação à idade, estatura e o peso entre os grupos, Gln223Gln e Arg223Arg/Gln223Arg (**Tabela 2**). A avaliação dos parâmetros antropométricos, de acordo com os Grupos, não conferiu às pacientes, diferenças significantes quanto ao IMC, a composição corporal

(cintura-quadril, cintura abdominal, massa magra), área mineral, composição e densidade mineral óssea, coeficiente respiratório, consumo de oxigênio no pico do exercício (VO_2) e metabolismo de repouso (**Tabela 2**).

No entanto, encontramos menor concentração de massa gorda no grupo Gln223Gln quando comparado com o grupo Arg223Arg/Gln223Arg ($p=0,02$ para Gln223Gln vs Arg223Arg/Gln223Arg (**Figura 7**).

As variáveis hemodinâmicas e a atividade nervosa simpática foram semelhantes entre os dois grupos polimórficos (**Tabela 4**).

5.1.3 SNP- rs8179183

Seguindo o mesmo padrão de organização dos outros SNPs, as pacientes foram divididas em dois grupos de alelos polimórficos: 112 pacientes homozigotos GG (Asn656Asn) e 66 pacientes CC+GC (Lys656Lys/Lys656Asn). Foi avaliada a influência do SNP nos parâmetros clínicos, metabólicos e neurovasculares.

Como está demonstrado na **Tabela 2**, não há diferença em relação à idade e estatura entre os grupos. Ainda na **Tabela 2**, notamos que a presença dos alelos polimórficos Asn656Asn ou na associação Lys656Lys/Lys656Asn, não conferiu às pacientes, diferenças significantes quanto à antropometria (peso, IMC), composição corporal (cintura-quadril, circunferência abdominal, massa magra e massa gorda), área mineral óssea, composição e densidade mineral óssea, além do coeficiente respiratório, do VO_2 e do metabolismo de repouso. O mesmo foi observado nas variáveis metabólicas (**Tabela 3**).

Os dados basais hemodinâmicos e os da atividade nervosa simpática foram semelhantes entre os grupos Asn656Asn e na associação Lys656Lys/Lys656Asn (**Tabela 4**).

TABELA 1. Frequência genotípica dos SNPs- rs1137100, rs1137101 e rs8179183, observada em 180 indivíduos, nos grupos estudados - HCFMUSP.

Variantes					
SNP-rs1137100		Lys109Lys(%)	Arg109Arg (%)	Lys109Arg(%)	P
179 (98,9%)	Observada (%)	118 (65,9%)	8 (4,5%)	50 (27,9%)	0,55
	Esperada (%)	117 (65%)	11 (6%)	51 (28%)	
SNP-rs1137101		Gln223Gln(%)	Arg223Arg(%)	Gln223Arg(%)	
176 (97,2)	Observada (%)	49 (27,4%)	32 (17,9%)	95 (53%)	0,65
	Esperada (%)	47 (27%)	33 (19%)	96 (55%)	
SNP-rs8179183		Asn656Asn(%)	Lys656Lys(%)	Lys656Asn(%)	
177 (97,8)	Observada (%)	112 (62,4%)	3 (1,7%)	61 (35,2%)	0,62
	Esperada (%)	111 (63%)	5 (3%)	61 (34%)	

TABELA 2. Características Clínicas dos 179 indivíduos estudados de acordo com os genótipos dos SNPs- rs1137100, rs1137101 e rs8179183 - HCFMUSP.

Parâmetros	rs1137100			rs1137101			rs8179183		
	Lys109Lys	Arg109Arg/Lys109Arg	P	Gln223Gln	Arg223Arg/Gln223Arg	P	Asn656Asn	Lys656Lys/Lys656Asn	P
	(n=118)	(n=58)		(n=49)	(n=127)		(n=112)	(n=66)	
Idade (anos)	31±0,2	32±0,3	ns	30±0,7	30±0,1	ns	32±0,7	32±1,0	ns
Altura (m)	1,60±0,2	1,63±0,3	ns	1,62±0,3	1,60±0,3	ns	1,60±0,8	1,62±0,8	ns
Peso (kg)	87,2±0,5	85,9±0,7	ns	88,6±0,9	87,5±0,3	ns	86,0±0,9	87,2±1,1	ns
IMC (kg/m²)	32,0±0,3	32,9±0,4	ns	33,8±0,3	34,1±0,3	ns	33,5±0,2	34,0±2,2	ns
CQ (m)	0,83±1,5	0,83±0,3	ns	0,81±0,1	0,82±0,2	ns	0,85±1,2	0,84±1,1	ns
CA (cm)	105,1±0,5	105,9±0,7	ns	106,2±0,7	104,2±0,6	ns	106,1±0,6	108,0±0,1	ns
Massa magra (kg)	51,9±0,4	53,8±0,3	ns	53,2±0,8	52,4±0,5	ns	52,2±0,7	52,4±0,4	ns
Massa gorda (kg)	35,1±0,5	34,1±0,3	ns	32,1±0,5	35,1±0,3	0,02	34,9±3,8	34,5±2,7	ns
AMO (g/cm³)	0,0157±0,5	0,0140±0,7	ns	0,0145±0,1	0,0143±0,4	ns	0,0147±0,6	0,0145±0,6	ns
CMO (g)	0,0031±0,3	0,0027±0,2	ns	0,0029±0,4	0,0030±0,4	ns	0,0031±0,4	0,0030±0,8	ns
DMO (g/cm³)	0,0482±0,5	0,0450±0,1	ns	0,0465±0,6	0,0466±0,7	ns	0,0480±0,6	0,0460±1,0	ns
VO₂ (mL/kg/min)	18,5±0,3	18,8±0,4	ns	16,3±0,9	17,1±0,7	ns	16,9±0,8	17,5±0,6	ns
CR	0,87±0,5	0,85±0,2	ns	0,85±0,6	0,84±0,9	ns	0,84±0,6	0,85±0,7	ns
MR (kcal/24 horas)	1501,7±0,6	1644,5±0,7	ns	1543,9±0,5	1570,9±0,5	ns	1538,1±0,6	1525,7±0,9	ns

Valores são expressos como média ± E.P, NS: Sem significância Estatística. IMC (Índice de Massa Corpórea), CQ (Cintura-Quadril), CA (Circunferência Abdominal), MM (Massa Magra), MG (Massa Gorda), AMO (Área Mineral Óssea), CMO (Composição Mineral Óssea), DMO (Densidade Mineral Óssea), CR (Coeficiente Respiratório), VO₂ (Consumo de Oxigênio no Pico do Exercício) MR (Metabolismo de Repouso).

TABELA 3. Características Laboratoriais dos 179 indivíduos estudados de acordo com os genótipos dos SNPs- rs1137100, rs1137101 e rs8179183 -HCFMUSP.

Parâmetros	Lys109Lys	Arg109Arg/Lys109Arg	P	Gln223Gln	Arg223Arg/Gln223Arg	P	Asn656Asn	Lys656Lys/Lys656Asn	P
	(n=118)	(n=58)		(n=49)	(n=127)		(n=112)	(n=66)	
Glicemia de jejum (mg/dL)	79,6±1,0	81,0±1,0	ns	81,7±1,0	80,3±1,1	ns	81,0±0,7	79,7±0,9	ns
Insulina de jejum (μUI/mL)	14,6±0,7	14,7±1,2	ns	15,4±1,1	14,5±0,8	ns	15,3±0,9	13,7±0,8	ns
HOMA IR	3,3±0,4	2,6±0,6	ns	3,0±0,3	2,7±0,7	ns	2,8±1,1	2,5±0,8	ns
Leptina (ng/mL)	49,1±0,8	47,9±0,7	ns	48,4±1,5	47,7±1,1	ns	49,7±1,1	46,1±1,8	ns
TG (mg/dL)	109,6±5,1	112,1±4,4	ns	107,7±6,0	109,0±3,2	ns	108,8±0,6	111,6±0,6	ns
LDL-C (mg/dL)	106,4±0,8	108,4±1,3	ns	110,2±0,5	109,1±2,1	ns	109,9±0,9	111,2±0,6	ns
HDL-C (mg/dL)	40,9±0,89	43,3±1,1	ns	42,2±3,1	44,6±1,0	ns	43,3±1,4	43,8±0,3	ns

Valores são expressos como média ± E.P, NS: Sem significância Estatística. TG (triglicérides), HDL-c (Colesterol de Lipoproteína de Alta Densidade), LDL-c (Colesterol de Lipoproteína de Baixa Densidade).

TABELA 4. Características Hemodinâmicas e Neurovasculares dos 179 indivíduos estudados de acordo com os genótipos dos SNPs- rs1137100, rs1137101 e rs8179183 -HCFMUSP.

Parâmetros	Lys109Lys	Arg109Arg/Lys109Arg	P	Gln223Gln	Arg223Arg/Gln223Arg	P	Asn656Asn	Lys656Lys/Lys656Asn	P
	(n=118)	(n=58)		(n=49)	(n=127)		(n=112)	(n=66)	
PAM (mmHg)	90±0,7	92±1,3	ns	91±1,8	91±1,0	ns	92±2,3	89±1,7	ns
FC (bpm)	72±1,5	72±1,1	ns	69±1,1	68±0,6	ns	71±0,2	69±0,6	ns
FSA (mL/min/100g)	1,89±0,6	1,86±0,8	ns	1,80±1,5	1,83±1,6	ns	1,81±0,6	1,90±0,7	ns
ANSM (impulso/min)	35±0,3	36±0,8	ns	36±0,6	34±0,7	0.07	34±0,8	36±0,7	ns

Valores são expressos como média ± E.P, NS: Sem significância Estatística. PAM (Pressão Arterial Média), FC (Frequência Cardíaca), FSA (Fluxo Sanguíneo Antebraço), ANSM (Atividade Nervosa Simpática Muscular).

Figura 7. Valores basais da massa gorda em mulheres obesas na forma polimórfica homozigota *Gln223Gln* e na associação *Arg223Arg/Gln223Arg*. Nota-se que os valores basais da massa gorda estão significativamente aumentados nas mulheres *Arg223Arg/Gln223Arg* comparados com as mulheres na forma homozigota *Gln223Gln*.

* *Arg223Arg/Gln223Arg* vs. *Gln223Gln*, $P < 0,02$.

5.2. Exercício físico leve (10% da contração voluntária máxima) e genótipos do LEPR

Durante o exercício isométrico leve de preensão de mão (10% da contração voluntária máxima), a atividade nervosa simpática, a pressão arterial média, a frequência cardíaca e o fluxo sanguíneo muscular, aumentaram de forma semelhante nos dois grupos estudados em cada um dos códons, 109, 223 e 656 (rs1137100, rs1137101 e rs8179183, respectivamente), independentemente do genótipo do LEPR (**Tabela 5a, 5b e 5c**).

5.3. Exercício físico moderado (30% da contração voluntária máxima) e genótipos da LEPR

Observamos que as respostas hemodinâmicas e neurovasculares (frequência cardíaca, pressão arterial média, fluxo sanguíneo muscular e atividade nervosa simpática) dos três códons 109, 223, 656 e suas variantes genéticas frente ao exercício físico moderado, apresentaram aumento em comparação ao basal, porém não houve diferença no comportamento dessas variáveis entre os grupos polimórficos de cada códon (**Tabela 6a, 6b, 6c**).

5.4. “Stress” Mental (Stroop color test)

Na aplicação do protocolo de “stress” mental, houve aumento da frequência cardíaca, da pressão arterial média, do fluxo sanguíneo muscular e da atividade nervosa simpática em relação aos valores obtidos em repouso nos três códons estudados e em suas variantes genéticas. Todavia, o comportamento das variáveis hemodinâmicas e neurovasculares permaneceram semelhantes entre as formas genéticas de cada códon após a manobra fisiológica do “stress” mental (**Tabela 7a, 7b, 7c**).

TABELA 5a. Respostas Hemodinâmicas Durante o Exercício Isométrico (10% CVM) dos 179 indivíduos estudados de acordo com o genótipo SNP-rs1137100 - HCFMUSP.

Parâmetros		1 min	2 min	3 min
FC (bpm)	Lys109Lys	5±1,1*	6±1,1*	7±1,2*
	Arg109Arg/Lys109Arg	5±0,4*	5±0,6*	5±0,6*
PAM (mmHg)	Lys109Lys	5±1,1*	6±1,6*	5±1,2*
	Arg109Arg/Lys109Arg	6±0,2*	5±0,1*	6±0,3*
FSA (mL/min/100g)	Lys109Lys	0,11±0,7*	0,12±0,8*	0,13±0,5*
	Arg109Arg/Lys109Arg	0,10±0,8*	0,14±0,8*	0,14±0,8*
ANSM (impulso/min)	Lys109Lys	5±0,6*	6±0,6*	6±0,5*
	Arg109Arg/Lys109Arg	4±0,6	6±0,4*	6±0,6*

Valores são média ± EP. PAM= Pressão arterial média; FC= Frequência cardíaca; FSM= Fluxo Sanguíneo Muscular; ANS= Atividade Nervosa Simpática.* $P < 0.05$ vs Basal.

TABELA 5b. Respostas Hemodinâmicas Durante o Exercício Isométrico (10% CVM) dos 179 indivíduos estudados de acordo com o genótipo SNP-rs1137101 -HCFMUSP.

Parâmetros		1 min	2 min	3 min
FC (bpm)	Gln223Gln	4±1,2*	5±1,2*	4±1,1*
	Arg223Arg/Gln223Arg	5±1,1*	6±1,1*	5±1,0*
PAM (mmHg)	Gln223Gln	5±1,0*	5±1,3*	6±1,7*
	Arg223Arg/Gln223Arg	8±0,6*	8±0,3*	8±0,4*
FSA (mL/min/100g)	Gln223Gln	0,11±0,6*	0,12±0,8*	0,12±0,8*
	Arg223Arg/Gln223Arg	0,11±0,8*	0,12±1,0*	0,11±0,8*
ANSM (impulso/min)	Gln223Gln	5±0,7*	5±0,4*	5±0,5*
	Arg223Arg/Gln223Arg	6±1,2*	6±1,2*	6±1,1*

Valores são média ± EP. PAM= Pressão arterial média; FC= Frequência cardíaca; FSM= Fluxo Sanguíneo Muscular; ANS= Atividade Nervosa Simpática.* $P < 0.05$ vs Basal.

TABELA 5c. Respostas Hemodinâmicas Durante o Exercício Isométrico (10% CVM) dos 179 indivíduos estudados de acordo com o genótipo SNP-rs8179183 -HCFMUSP.

Parâmetros		1 min	2 min	3 min
FC (bpm)	Asn656Asn	6±1,0*	6±1,2*	7±0,8*
	Lys656Asn/Lys656Lys	5±0,2*	6±0,5*	7±0,3*
PAM (mmHg)	Asn656Asn	5±1,0*	6±1,1*	7±1,0*
	Lys656Asn/Lys656Lys	6±0,3*	6±0,5*	7±0,5*
FSA (mL/min/100g)	Asn656Asn	0,11±0,7*	0,13±0,6*	0,13±0,7*
	Lys656Asn/Lys656Lys	0,13±0,8*	0,15±0,7*	0,15±0,8*
ANSM (impulso/min)	Asn656Asn	4±0,6	5±0,6*	6±0,2*
	Lys656Asn/Lys656Lys	5±0,3*	5±0,4*	5±0,6*

Valores são média ± EP. PAM= Pressão arterial média; FC= Frequência cardíaca; FSM= Fluxo Sanguíneo Muscular; ANS= Atividade Nervosa Simpática.* $P < 0.05$ vs Basal.

TABELA 6a. Respostas Hemodinâmicas Durante o Exercício Isométrico (30% CVM) dos 179 indivíduos estudados de acordo com os genótipo SNP- rs1137100 - HCFMUSP.

Parâmetros		1 min	2 min	3 min
FC (bpm)	Lys109Lys	12±1,1*	11±1,2*	9±0,4*
	Arg109Arg/Lys109Arg	11±0,4*	13±0,2	13±0,4*
PAM (mmHg)	Lys109Lys	9±0,8*	10±1,0*	10±1,0*
	Arg109Arg/Lys109Arg	8±0,4*	8±0,8*	9±0,8*
FSA (mL/min/100g)	Lys109Lys	0,18±0,7*	0,23±0,7*	0,18±0,6*
	Arg109Arg/Lys109Arg	0,18±0,7*	0,20±0,7*	0,20±0,8*
ANSM (impulso/min)	Lys109Lys	9±0,6	11±0,6*	10±0,5*
	Arg109Arg/Lys109Arg	10±0,0*	12±0,0*	13±0,4*

Valores são média ± EP. PAM= Pressão arterial média; FC= Frequência cardíaca; FSM= Fluxo Sanguíneo Muscular; ANS= Atividade Nervosa Simpática.* $P<0.05$ vs Basal.

TABELA 6b. Respostas Hemodinâmicas Durante o Exercício Isométrico (30% CVM) dos 179 indivíduos estudados de acordo com os genótipo SNP- rs1137101 -HCFMUSP.

Parâmetros		1 min	2 min	3 min
FC (bpm)	Gln223Gln	12±1,0*	13±1,1*	11±1,1*
	Arg223Arg/Gln223Arg	15±0,5*	15±0,6*	16±0,7*
PAM (mmHg)	Gln223Gln	17±1,1*	16±1,0*	15±1,1*
	Arg223Arg/Gln223Arg	17±0,5*	18±0,4*	16±0,6*
FSA (mL/min/100g)	Gln223Gln	0,20±0,6*	0,24±0,6*	0,23±0,6*
	Arg223Arg/Gln223Arg	0,21±0,8*	0,22±0,8*	0,21±0,8*
ANSM (impulso/min)	Gln223Gln	14±0,7	15±0,6*	15±0,5*
	Arg223Arg/Gln223Arg	15±0,6*	15±0,5*	16±0,6*

Valores são média ± EP. PAM= Pressão arterial média; FC= Frequência cardíaca; FSM= Fluxo Sanguíneo Muscular; ANS= Atividade Nervosa Simpática.* $P<0.05$ vs Basal.

TABELA 6c. Respostas Hemodinâmicas Durante o Exercício Isométrico (30% CVM) dos 179 indivíduos estudados de acordo com os genótipo SNP- rs8179183 -HCFMUSP.

Parâmetros		1 min	2 min	3 min
FC (bpm)	Asn656Asn	12±1,1*	12±1,0*	12±1,0*
	Lys656Asn/Lys656Lys	11±0,4*	12±0,8*	13±0,4*
PAM (mmHg)	Asn656Asn	12±1,1*	11±1,2*	9±0,4*
	Lys656Asn/Lys656Lys	11±0,6*	10±0,4*	13±0,5*
FSA (mL/min/100g)	Asn656Asn	0,21±0,8*	0,23±0,9*	0,23±0,6*
	Lys656Asn/Lys656Lys	0,22±0,8*	0,22±0,8*	0,21±0,8*
ANSM (impulso/min)	Asn656Asn	9±0,8	11±0,6*	10±0,5*
	Lys656Asn/Lys656Lys	11±0,2*	11±0,1*	11±0,2*

Valores são média ± EP. PAM= Pressão arterial média; FC= Frequência cardíaca; FSM= Fluxo Sanguíneo Muscular; ANS= Atividade Nervosa Simpática.* $P<0.05$ vs Basal.

TABELA 7a. Respostas Hemodinâmicas Durante o “Stress” Mental dos 179 indivíduos estudados de acordo com os genótipo SNP- rs1137100 - HCFMUSP.

Parâmetros		1 min	2 min	3 min	4 min
FC (bpm)	Lys109Lys	12±1,0*	11±1,1*	13±1,2*	11±1,1*
	Arg109Arg/Lys109Arg	11±0,7*	13±0,2	11±0,5*	12±0,8*
PAM (mmHg)	Lys109Lys	12±0,7*	11±1,0*	12±0,8*	12±1,1*
	Arg109Arg/Lys109Arg	11±0,5*	11±0,8*	10±0,7*	12±0,2
FSA (mL/min/100g)	Lys109Lys	0,20±0,5*	0,22±0,7*	0,21±0,7*	0,21±0,7*
	Arg109Arg/Lys109Arg	0,19±0,7*	0,21±0,8*	0,22±0,6*	0,22±0,6*
ANSM (impulso/min)	Lys109Lys	11±0,6*	11±0,6*	13±0,4*	12±1,0*
	Arg109Arg/Lys109Arg	12±0,7*	11±0,4*	11±0,6*	12±0,7*

Valores são média ± EP. PAM= Pressão arterial média; FC= Frequência cardíaca; FSM= Fluxo Sanguíneo Muscular; ANS= Atividade Nervosa Simpática.**P*<0.05 vs Basal.

TABELA 7b. Respostas Hemodinâmicas Durante o “Stress” Mental dos 179 indivíduos estudados de acordo com os genótipo SNP- rs1137101 - HCFMUSP.

Parâmetros		1 min	2 min	3 min	4 min
FC (bpm)	Gln223Gln	17±1,1*	15±1,1*	15±1,0*	17±1,1*
	Arg223Arg/Gln223Arg	17±0,4*	16±0,4*	18±0,4*	18±0,6*
PAM (mmHg)	Gln223Gln	14±1,0*	14±1,0*	14±1,0*	15±1,0*
	Arg223Arg/Gln223Arg	16±0,5*	18±0,6*	18±0,3*	19±0,4*
FSA (mL/min/100g)	Gln223Gln	0,20±0,5*	0,21±0,8*	0,21±0,9*	0,22±0,6*
	Arg223Arg/Gln223Arg	0,23±0,8*	0,21±0,5*	0,23±0,5*	0,24±0,4*
ANSM (impulso/min)	Gln223Gln	14±0,4*	15±0,6*	15±0,6*	15±1,0*
	Arg223Arg/Gln223Arg	15±0,6*	15±0,5*	15±0,6*	18±0,3*

Valores são média ± EP. PAM= Pressão arterial média; FC= Frequência cardíaca; FSM= Fluxo Sanguíneo Muscular; ANS= Atividade Nervosa Simpática. * $P < 0.05$ vs Basal

TABELA 7c. Respostas Hemodinâmicas Durante o “Stress” Mental dos 179 indivíduos estudados de acordo com os genótipo SNP- rs8179183 - HCFMUSP.

Parâmetros		1 min	2 min	3 min	4 min
FC (bpm)	Asn656Asn	12±0,4*	13±0,5*	13±0,4*	12±1,0*
	Lys656Asn/Lys656Lys	11±0,1*	10±0,1*	12±0,4*	12±0,4*
PAM (mmHg)	Asn656Asn	11±0,6*	13±0,4*	12±1,0*	12±1,0*
	Lys656Asn/Lys656Lys	12±0,1*	12±0,1*	13±1,2*	11±0,4*
FSA (mL/min/100g)	Asn656Asn	0,21±0,6*	0,20±0,5*	0,21±0,8*	0,21±0,9*
	Lys656Asn/Lys656Lys	0,23±0,8*	0,21±1,3*	0,22±0,8*	0,21±0,8*
ANSM (impulso/min)	Asn656Asn	12±0,4*	12±0,4*	13±0,5*	13±0,4*
	Lys656Asn/Lys656Lys	12±0,4*	11±0,1*	10±0,1*	12±0,4*

Valores são média ± EP. PAM= Pressão arterial média; FC= Frequência cardíaca; FSM= Fluxo Sanguíneo Muscular; ANS= Atividade Nervosa Simpática. * $P < 0.05$ vs Basal.

5.4. Protocolo de intervenção (Dieta e Treinamento Físico)

5.4.1 Medidas basais nos códons 109, 223 e 656

Oitenta pacientes seguiram o protocolo de mudança de hábitos de vida (dieta e treinamento físico - DTF). As pacientes foram divididas de acordo com os alelos avaliados, no códon 109 - 50 pacientes apresentavam a forma homozigota do alelo (Lys109Lys) e 25 à associação (Lys109Arg/Arg109Arg). No códon 223, 18 indivíduos apresentavam a forma homozigota do alelo (Gln223Gln) e 57 à associação (Gln223Arg/Arg223Arg). Em relação aos polimorfismos presentes no códon 656, observamos que 42 mulheres obesas apresentavam a forma homozigota do alelo (Asn656Asn) e 34 à associação polimórfica (Lys656Asn/Lys656Lys). Nos três códons estudados, a mudança no estilo de vida conferiu uma redução no peso corporal, no IMC, na circunferência abdominal e na massa gorda. Também notamos o incremento significativo do VO₂. (**Tabelas 8a, 9a e 10a**). Ainda nas **Tabelas 8a, 9a e 10a**, observa-se que a massa magra, a relação cintura-quadril, o metabolismo basal e as variáveis ósseas, foram semelhantes entre os grupos de alelos analisados em cada códon, em resposta à mudança no estilo de vida.

A concentração de glicemia, insulina basal, LDL-C e HDL-C não foi alterada após o período de intervenção nos grupos estudados de cada um dos códons (**Tabelas 8b, 9b e 10b**). Em contraste, o efeito da mudança do estilo de vida, levou ao decréscimo significativo da concentração plasmática de HOMA-IR, leptina e triglicérides. Estes resultados foram independentes

da presença dos alelos polimórficos do receptor LEPR (**Tabelas 8b, 9b e 10b**).

A frequência cardíaca, a pressão arterial média, e a atividade nervosa simpática muscular, foram significativamente reduzidas após DTF nos grupos, (**Tabelas 8c, 9c e 10c**) e essas diferenças foram independentes da presença do alelo polimórfico do receptor LEPR. Este resultado foi semelhante nos 3 códons avaliados neste estudo. As **tabelas 8c, 9c e 10c** demonstram ainda, que o fluxo sanguíneo muscular aumentou com DTF nos grupos estudados, também sem diferença entre os grupos (**Tabela 8c**).

TABELA 8a. Características Clínicas dos 75 indivíduos Pré e Pós intervenção do genótipo SNP- rs1137100 -HCFMUSP.

Parâmetros	Lys109Lys	Lys109Lys	Lys109Arg/Arg109Arg	Lys109Arg/Arg109Arg	P
	(n=50)	(n=50)	(n=25)	(n=25)	
	Pré	Pós	Pré	Pós	
Idade (anos)	30±1,1	-	33±1,2	-	ns
Altura (m)	1,61±1,0	-	1,61±1,2	-	ns
Peso (kg)	87,0±1,0	79,2±0,9*	86,2±1,0	80,6±1,0*	ns
IMC (kg/m ²)	33,5±0,6	30,5±0,7*	33,4±0,6	31,1±0,6*	ns
CQ (m)	0,84±1,3	0,82±1,1	0,83±0,1	0,80±0,1	ns
CA (cm)	106,3±1,2	99,1±1,0*	105,8±0,2	100,3±0,2*	ns
Massa magra (kg)	51,7±0,1	50,8±0,1	52,1±0,3	50,6±0,4	ns
Massa gorda (kg)	35,1±0,1	28,3±0,2*	34,1±0,5	29,9±0,8*	ns
AMO (g/cm ²)	0,0147±0,8	0,0104±0,5	0,0140±0,6	0,0102±0,8	ns
CMO (g)	0,0030±0,9	0,0020±0,8	0,0027±0,5	0,0019±0,7	ns
DMO (g/cm ²)	0,0480±0,4	0,0329±0,7	0,0452±0,8	0,0323±1,3	ns
VO ₂ (mL/kg/min)	18,2±0,6	23,8±1,3*	17,9±1,0	22,0±1,4*	ns
CR	0,85±1,0	0,87±0,8	0,85±1,0	0,87±1,2	ns
MR (kcal/24 horas)	1500,7±1,0	1357,2±1,2	1548,8±1,5	1364,8±1,6	ns

Valores são expressos como média ± E.P; * diferença do pré, $P < 0.05$; NS: Sem significância estatística entre grupos.

TABELA 8b. Características Laboratoriais dos 75 indivíduos Pré e Pós intervenção do genótipo SNP- rs1137100 -HCFMUSP.

Parâmetros	Lys109Lys	Lys109Lys	Lys109Arg/Arg109Arg	Lys109Arg/Arg109Arg	P
	(n=50)	(n=50)	(n=25)	(n=25)	
	Pré	Pós	Pré	Pós	
Glicemia de jejum (mg/dL)	79,8±1,2	79,0±0,9	80,0±1,1	80,7±1,8	ns
Insulina de jejum (μUI/mL)	15,5±1,1	11,4±0,8	13,7±1,1	10,7±1,8	ns
HOMA IR	3,1±0,7	1,0±0,9*	2,6±1,7	1,0±0,7*	ns
Leptina (ng/mL)	49,8±1,1	35,9±1,8*	47,8±1,1	36,7±2,1*	ns
TG (mg/dL)	106,9±2,1	83,9±3,1*	121,0±3,1	112,0±5,1*	ns
LDL-C (mg/dL)	105,5±2,1	98,3±1,1	114,4±2,1	98,0±1,1	ns
HDL-C (mg/dL)	38,7±2,1	41,8±1,0	37,2±2,2	42,9±1,6	ns

Valores são expressos como média ± E.P.; * diferença do pré, $P < 0.05$; NS: Sem significância estatística entre grupos.

TG (triglicérides), HDL-c (Colesterol de Lipoproteína de Alta Densidade), LDL-c (Colesterol de Lipoproteína de Baixa Densidade).

TABELA 8c. Características Hemodinâmicas e Neurovasculares dos 75 indivíduos Pré e Pós intervenção do genótipo SNP- rs1137100 -HCFMUSP.

Parâmetros	Lys109Lys	Lys109Lys	Lys109Arg/Arg109Arg	Lys109Arg/Arg109Arg	P
	(n=50)	(n=50)	(n=25)	(n=25)	
	Pré	Pós	Pré	Pós	
PAM (mmHg)	90±1,0	86±0,9*	92±1,0	87±1,6*	ns
FC (bpm)	70±1,5	66±1,3*	66±1,0	63±1,2*	ns
FSA (mL/min/100g)	1,81±0,6	2,12±1,3*	1,86±0,8	2,13±1,0*	ns
ANSM (impulso/min)	36±0,4	29±1,0*	36±0,7	29±1,8*	ns

Valores são expressos como média ± E.P; * diferença do pré, $P < 0.05$; NS: Sem significância estatística entre grupos.

PAM (Pressão Arterial Média), FC (Frequência Cardíaca), FSA (Fluxo Sanguíneo Antebraço), ANSM (Atividade Nervosa Simpática Muscular).

TABELA 9a. Características Clínicas dos 75 indivíduos Pré e Pós intervenção do genótipo SNP- rs1137101 -HCFMUSP.

Parâmetros	Gln223Gln	Gln223Gln	Arg223Arg/Gln223Arg	Arg223Arg/Gln223Arg	P
	(n=18)	(n=18)	(n=57)	(n=57)	
	Pré	Pós	Pré	Pós	
Idade (anos)	30±0,3		31±0,5		ns
Altura (m)	1,62±0,4		1,60±0,3		ns
Peso (kg)	88,6±1,7	81,0±1,7*	86,5±1,0	79±1,0*	ns
IMC (kg/m ²)	33,6±0,5	31,4±0,7*	33,6±0,6	30,5±0,7*	ns
CQ (m)	0,83±0,1	0,82±0,3	0,83±0,0	0,80±0,2	ns
CA (cm)	107,9±1,1	98,0±1,2*	107,0±1,4	96,2±1,6*	ns
Massa magra (kg)	51,6±0,7	51,0±1,0	51,6±0,4	51,1±0,6	ns
Massa gorda (kg)	32,1±1,1	29,8±1,3*	35,6±1,0	28,1±1,1*	ns
AMO (g/cm ²)	0,0142±1,0	0,0101±1,2	0,0145±1,2	0,0099±1,3	ns
CMO (g)	0,0029±1,0	0,0019±1,1	0,0029±1,0	0,0019±1,3	ns
DMO (g/cm ²)	0,0468±1,1	0,0331±1,0	0,0469±1,3	0,0313±1,4	ns
VO ₂ (mL/kg/min)	16,9±0,5	21,0±0,8*	18,2±1,0	21,4±1,1*	ns
CR	0,84±1,0	0,85±1,3	0,85±1,1	0,86±1,2	ns
MR (kcal/24 horas)	1533,9±1,2	1420,4±1,4	1472 ± 36±1,4	1346,6±1,3	ns

Valores são expressos como média ± E.P; * diferença do pré, $P < 0.05$; NS: Sem significância estatística entre grupos. IMC (Índice de Massa Corpórea), CQ (Cintura-Quadril), CA (Circunferência Abdominal), MM (Massa Magra), MG (Massa Gorda), AMO (Área Mineral Óssea), CMO (Composição Mineral Óssea), DMO (Densidade Mineral Óssea), CR (Coeficiente Respiratório), VO₂ (Consumo de Oxigênio no Pico do Exercício) MR (Metabolismo de Repouso).

TABELA 9b. Características Laboratoriais dos 75 indivíduos Pré e Pós intervenção do genótipo SNP- rs1137101 -HCFMUSP.

Parâmetros	Gln223Gln	Gln223Gln	Arg223Arg/Gln223Arg	Arg223Arg/Gln223Arg	P
	(n=18)	(n=18)	(n=57)	(n=57)	
	Pré	Pós	Pré	Pós	
Glicemia de jejum (mg/dL)	80,7±1,1	78,2±1,4	80,6±0,8	78,8±1,1	ns
Insulina de jejum (μUI/mL)	15,4±1,7	10,2±2,1	14,5±1,0	10,5±1,2	ns
HOMA IR	3,1±0,3	0,6±0,4*	2,9±0,1	0,9±0,2*	ns
Leptina (ng/mL)	50,4±2,0	39,4±2,3*	48,7±2,0	34,7±2,4*	ns
TG (mg/dL)	108,5±8,0	95,5±8,8*	112,7±3,1	93,3±4,6*	ns
LDL-C (mg/dL)	111,2±6,3	98,3±7,7	105,1±4,3	95,3±4,9	ns
HDL-C (mg/dL)	40,2±5,1	41,2±5,8	44,0±4,0	45,6±4,5	ns

Valores são expressos como média ± E.P; * diferença do pré, $P < 0.05$; NS: Sem significância estatística entre grupos. TG (triglicérides), HDL-c (Colesterol de Lipoproteína de Alta Densidade), LDL-c (Colesterol de Lipoproteína de Baixa Densidade).

TABELA 9c. Características Hemodinâmicas e Neurovasculares dos 75 indivíduos Pré e Pós intervenção do genótipo SNP- rs1137101 -HCFMUSP.

Parâmetros	Gln223Gln	Gln223Gln	Arg223Arg/Gln223Arg	Arg223Arg/Gln223Arg	P
	(n=18)	(n=18)	(n=57)	(n=57)	
	Pré	Pós	Pré	Pós	
PAM (mmHg)	91±1,8	88±1,3*	91±1,0	80±0,8*	ns
FC (bpm)	69±1,2	67±1,4*	79±0,8	66±0,6*	ns
FSA (mL/min/100g)	1,75±1,7	2,11±1,8*	1,84±1,5	2,17±0,7*	ns
ANSM (impulso/min)	36±0,6	28±1,0*	34±0,8	29±0,9*	ns

Valores são expressos como média ± E.P; * diferença do pré, $P < 0.05$; NS: Sem significância estatística entre grupos. PAM (Pressão Arterial Média), FC (Frequência Cardíaca), FSA (Fluxo Sanguíneo Antebraço), ANSM (Atividade Nervosa Simpática Muscular).

TABELA 10a. Características Clínicas dos 76 indivíduos Pré e Pós intervenção do genótipo SNP- rs8179183 -HCFMUSP.

Parâmetros	Asn656Asn	Asn656Asn	Lys656Asn/Lys656Lys	Lys656Asn/Lys656Lys	P
	(n=42)	(n=42)	(n=34)	(n=34)	
	Pré	Pós	Pré	Pós	
Idade (anos)	31±0,2		32±0,3		ns
Altua (m)	1,60±1,2		1,62±1,2		ns
Peso (kg)	86,0±0,3	80,2±0,5*	87,2±1,0	79,2±1,2*	ns
IMC (kg/m ²)	33,7±0,2	31,0±0,5*	33,3±1,1	30,2±1,3*	ns
CA (cm)	105,2±0,9	99,6±0,9*	107,2±1,0	98,4±1,2*	ns
Massa magra (kg)	51,2±1,0	50,8±1,1	52,8±1,3	51,6±1,5	ns
Massa gorda (kg)	34,9±1,1	29,5±1,2	34,5±1,4	28,0±1,2	ns
AMO (g/cm ²)	0,0149±1,0	0,0104±1,4	0,0135±1,4	0,0104±1,6	ns
CMO (g)	0,0030±1,3	0,0020±1,6	0,0026±1,3	0,0021±1,9	ns
DMO (g/cm ²)	0,0482±1,0	0,0334±1,1	0,0448±1,2	0,0326±1,7	ns
VO ₂ (mL/kg/min)	19,2±0,5	22,8±0,6*	18,9±0,5	23,7±0,7*	ns
CR	0,85±1,1	0,86±1,2	0,84±1,4	0,87±1,5	ns
MR (kcal/24 horas)	1535,1±1,0	1375,8±1,1	1525,3±1,6	1364,4±1,8	ns

Valores são expressos como média ± E.P; * diferença do pré, $P < 0.05$; NS: Sem significância estatística entre grupos. IMC (Índice de Massa Corpórea), CQ (Cintura-Quadril), CA (Circunferência Abdominal), MM (Massa Magra), MG (Massa Gorda), AMO (Área Mineral Óssea), CMO (Composição Mineral Óssea), DMO (Densidade Mineral Óssea), CR (Coeficiente Respiratório), VO₂ (Consumo de Oxigênio no Pico do Exercício) MR (Metabolismo de Repouso).

TABELA 10b. Características Laboratoriais dos 76 indivíduos Pré e Pós intervenção do genótipo SNP- rs8179183 -HCFMUSP.

Parâmetros	Asn656Asn	Asn656Asn	Lys656Asn/Lys656Lys	Lys656Asn/Lys656Lys	P
	(n=42)	(n=42)	(n=34)	(n=34)	
	Pré	Pós	Pré	Pós	
Glicemia de jejum (mg/dL)	80,0±1,1	79,1±1,4	79,7±1,8	80,3±1,9	ns
Insulina de jejum (μUI/mL)	15,3±0,8	11,3±1,3	13,7±1,4	11,1±1,7	ns
HOMA IR	3,1±0,4	0,9±0,6*	2,6±0,5	1,1±0,6*	ns
Leptina (ng/mL)	49,9±1,6	37,5±1,8*	47,1±2,1	35,1±3,0*	ns
TG (mg/dL)	108,2±4,2	99,7±5,1*	111,6±6,1	93,7±5,1*	ns
LDL-C (mg/dL)	107,5±3,3	94,0±4,3*	110,2±4,2	102,0±4,2*	ns
HDL-C (mg/dL)	43,0±3,2	48,6±4,1	42,8±5,6	48,3±6,4	ns

Valores são expressos como média ± E.P; * diferença do pré, $P < 0.05$; NS: Sem significância estatística entre grupos. TG (triglicérides), HDL-c (Colesterol de Lipoproteína de Alta Densidade), LDL-c (Colesterol de Lipoproteína de Baixa Densidade).

TABELA 10c. Características Hemodinâmicas e Neurovasculares dos 76 indivíduos Pré e Pós intervenção do genótipo SNP- rs1137101 -HCFMUSP.

Parâmetros	Asn656Asn	Asn656Asn	Lys656Asn/Lys656Lys	Lys656Asn/Lys656Lys	P
	(n=42)	(n=42)	(n=34)	(n=34)	
	Pré	Pós	Pré	Pós	
PAM (mmHg)	92±2,3	89±0,8*	89±1,7	87±1,5*	ns
FC (bpm)	69±0,7	64±0,8*	69±0,6	67±1,2*	ns
FSA (mL/min/100g)	1,79±0,8	2,00±1,0*	1,93±0,7	2,09±2,0*	ns
ANSM (impulso/min)	36±1,0	29±1,0*	36±0,9	28±1,3*	ns

Valores são expressos como média ± E.P; * diferença do pré, $P < 0.05$; NS: Sem significância estatística entre grupos. PAM (Pressão Arterial Média), FC (Frequência Cardíaca), FSA (Fluxo Sanguíneo Antebraço), ANSM (Atividade Nervosa Simpática Muscular).

5.4.2. Exercício físico leve (10% da contração voluntária máxima) e genótipos da LEPR

Como esperado, as variáveis neurovasculares e hemodinâmicas aumentaram progressivamente durante o exercício isométrico leve de preensão de mão nas variantes genéticas em cada um dos três códons estudados (rs1137100, rs1137101 e rs8179183). Porém, a atividade nervosa simpática, a pressão arterial média, a frequência cardíaca e o fluxo sanguíneo muscular não mudaram a resposta à manobra fisiológica em relação ao período pré intervenção. Além disso, as formas polimórficas de cada códon não diferiram entre si (**Tabelas 11, 12 e 13**).

TABELA 11. Respostas Hemodinâmicas Durante o Exercício Isométrico (10% CVM) dos 75 indivíduos Pré e Pós intervenção do genótipo estudado SNP- rs1137100 - HCFMUSP.

Parâmetros		basal	1 min	2 min	3 min
FC (bpm)					
<i>Lys109Lys</i>	Pré	70±1,5	6±1,1*	7±1,0*	7±1,1*
<i>Lys109Lys</i>	Pós	66±1,3†	5±2,1*	7±2,0*	6±2,0*
<i>Lys109Arg/Arg109Arg</i>	Pré	66±1,0	6±1,4*	6±1,5*	6±1,6*
<i>Lys109Arg/Arg109Arg</i>	Pós	63±1,2†	6±1,2*	6±0,9*	6±0,8*
PAM (mmHg)					
<i>Lys109Lys</i>	Pré	90±1,0	5±1,1*	7±1,6*	5±1,2*
<i>Lys109Lys</i>	Pós	86±0,9†	6±1,1*	7±1,6*	6±1,2*
<i>Lys109Arg/Arg109Arg</i>	Pré	92±1,0	6±0,9*	6±0,9*	5±0,8*
<i>Lys109Arg/Arg109Arg</i>	Pós	87±1,6†	6±1,1*	6±1,0*	5±1,0*
FSA (mL/min/100g)					
<i>Lys109Lys</i>	Pré	1,81±0,6	0,10±0,7*	0,13±0,6*	0,13±0,8*
<i>Lys109Lys</i>	Pós	2,12±1,3†	0,11±0,8*	0,12±0,5*	0,11±0,7*
<i>Lys109Arg/Arg109Arg</i>	Pré	1,86±0,8	0,13±0,8*	0,15±0,8*	0,15±0,8*
<i>Lys109Arg/Arg109Arg</i>	Pós	2,83±1,0†	0,12±0,7*	0,13±0,7*	0,15±0,8*
ANSM (impulso/min)					
<i>Lys109Lys</i>	Pré	36±0,4	4±0,6	5±0,6*	5±0,5*
<i>Lys109Lys</i>	Pós	29±1,0†	4±0,6	5±0,6*	4±0,5*
<i>Lys109Arg/Arg109Arg</i>	Pré	36±0,7	5±0,3*	5±0,0*	5±0,1*
<i>Lys109Arg/Arg109Arg</i>	Pós	29±1,8†	4±0,4*	5±0,0*	5±0,1*

Valores são média ± EP. PAM= Pressão arterial média; FC= Frequência cardíaca; FSM= Fluxo sanguíneo Muscular; ANS= Atividade Nervosa Simpática. * $P<0.05$ vs Basal. † diferença do pré, $P<0.05$

TABELA 12. Respostas Hemodinâmicas Durante o Exercício Isométrico (10% CVM) dos 75 indivíduos Pré e Pós intervenção do genótipo estudado SNP - rs1137101 - HCFMUSP.

Parâmetros		basal	1 min	2 min	3 min
FC (bpm)					
<i>Gln223/Gln</i>	Pré	79±1,2	3±1,2*	4±1,2*	4±1,0*
<i>Gln223/Gln</i>	Pós	67±1,4†	4±1,2*	5±1,0*	5±1,1*
<i>Arg223Arg/Gln223Arg</i>	Pré	79±0,8	8±0,4*	9±0,5*	9±0,4*
<i>Arg223Arg/Gln223Arg</i>	Pós	66±0,6†	7±0,4*	7±0,5*	9±0,4*
PAM (mmHg)					
<i>Gln223/Gln</i>	Pré	91±1,8	5±1,1*	6±1,3*	6±1,0*
<i>Gln223/Gln</i>	Pós	88±1,3†	6±1,0*	6±1,3*	7±1,2*
<i>Arg223Arg/Gln223Arg</i>	Pré	91±1,0	8±0,6*	9±0,5*	8±0,4*
<i>Arg223Arg/Gln223Arg</i>	Pós	80±0,8†	9±0,6*	9±0,6*	9±0,5*
FSA (mL/min/100g)					
<i>Gln223/Gln</i>	Pré	1,75±1,1	0,11±0,6*	0,12±0,8*	0,12±0,8*
<i>Gln223/Gln</i>	Pós	2,11±1,8†	0,11±0,7*	0,11±0,6*	0,12±0,7*
<i>Arg223Arg/Gln223Arg</i>	Pré	1,84±1,5	0,11±0,8*	0,12±1,0*	0,11±0,8*
<i>Arg223Arg/Gln223Arg</i>	Pós	2,17±0,7†	0,10±0,7*	0,10±1,0*	0,11±0,7*
ANSM (impulso/min)					
<i>Gln223/Gln</i>	Pré	36±0,6	4±0,6	5±0,6*	5±0,5*
<i>Gln223/Gln</i>	Pós	28±1,0†	4±0,7	4±0,5*	4±0,8*
<i>Arg223Arg/Gln223Arg</i>	Pré	33±0,7	9±0,6*	8±0,4*	9±0,6*
<i>Arg223Arg/Gln223Arg</i>	Pós	29±0,9†	9±0,7*	7±0,5*	5±0,7*

Valores são média ± EP. PAM= Pressão arterial média; FC= Frequência cardíaca; FSM= Fluxo sanguíneo Muscular; ANS= Atividade Nervosa Simpática. *P<0.05 vs Basal; † diferença do pré , P<0.05.

TABELA 13. Respostas Hemodinâmicas Durante o Exercício Isométrico (10% CVM) dos 76 indivíduos Pré e Pós intervenção do genótipo estudado SNP - rs8179183 - HCFMUSP.

Parâmetros		basal	1 min	2 min	3 min
FC (bpm)					
<i>Asn656Asn</i>	Pré	69±0,7	5±1,1*	7±1,0*	7±1,0*
<i>Asn656Asn</i>	Pós	64±0,8†	5±1,1*	5±1,3*	7±1,3*
<i>Lys656Asn/Lys656Lys</i>	Pré	69±0,6	6±0,5*	6±0,5*	6±0,4*
<i>Lys656Asn/Lys656Lys</i>	Pós	67±1,2†	6±0,3*	5±0,4*	7±0,4*
PAM (mmHg)					
<i>Asn656Asn</i>	Pré	92±2,3	5±1,1*	7±1,1*	5±1,0*
<i>Asn656Asn</i>	Pós	89±0,8†	5±1,1*	5±1,0*	6±1,0*
<i>Lys656Asn/Lys656Lys</i>	Pré	89±1,7	6±0,3*	6±0,5*	5±0,5*
<i>Lys656Asn/Lys656Lys</i>	Pós	87±1,5†	5±0,3*	5±0,6*	5±0,5*
FSA (mL/min/100g)					
<i>Asn656Asn</i>	Pré	1,79±0,8	0,10±0,7*	0,13±0,6*	0,13±0,7*
<i>Asn656Asn</i>	Pós	2,00±1,0†	0,11±0,7*	0,12±0,6*	0,12±0,7*
<i>Lys656Asn/Lys656Lys</i>	Pré	1,93±0,7	0,13±0,8*	0,15±0,8*	0,15±0,8*
<i>Lys656Asn/Lys656Lys</i>	Pós	2,09±2,0†	0,12±0,6*	0,14±0,5*	0,12±0,8*
ANSM (impulso/min)					
<i>Asn656Asn</i>	Pré	36±1,0	4±0,6*	5±0,6*	5±0,5*
<i>Asn656Asn</i>	Pós	29±1,0†	5±0,5*	6±0,7*	5±0,6*
<i>Lys656Asn/Lys656Lys</i>	Pré	36±0,9	5±0,3*	5±0,0*	5±0,1*
<i>Lys656Asn/Lys656Lys</i>	Pós	28±1,3†	4±0,2*	5±0,1*	4±0,3*

Valores são média ± EP. PAM= Pressão arterial média; FC= Frequência cardíaca; FSM= Fluxo sanguíneo Muscular; ANS= Atividade Nervosa Simpática. * $P<0.05$ vs Basal. † diferença do pré , $P<0.05$

5.4.3. Exercício físico Moderado (30% da contração voluntária máxima) no genótipo do LEPR

Durante o exercício físico moderado, presumivelmente, notamos aumento nas variáveis neurovasculares e hemodinâmicas nos genótipos de cada códon. Todavia, a magnitude desse aumento não foi diferente na atividade nervosa simpática, na pressão arterial média, na frequência cardíaca, e no fluxo sanguíneo muscular no período pós intervenção (**Tabelas 14, 15 e 16**).

TABELA 14. Respostas Hemodinâmicas Durante o Exercício Isométrico (30% CVM) dos 75 indivíduos Pré e Pós intervenção do genótipo estudado SNP - rs1137100 - HCFMUSP.

Parâmetros		basal	1 min	2 min	3 min
FC (bpm)					
<i>Lys109Lys</i>	Pré	70±1,5	10±1,1*	11±1,1*	11±1,2*
<i>Lys109Lys</i>	Pós	66±1,3†	9±1,0*	11±1,4*	9±1,1*
<i>Lys109Arg/Arg109Arg</i>	Pré	66±1,0	11±0,4*	11±0,5*	13±0,4*
<i>Lys109Arg/Arg109Arg</i>	Pós	63±1,2†	10±0,5*	10±0,5*	12±0,6*
PAM (mmHg)					
<i>Lys109Lys</i>	Pré	90±1,0	9±0,8*	10±1,0*	10±1,0*
<i>Lys109Lys</i>	Pós	86±0,9†	10±0,7*	9±1,2*	11±0,7*
<i>Lys109Arg/Arg109Arg</i>	Pré	92±1,0	9±0,4*	10±0,4*	11±0,4*
<i>Lys109Arg/Arg109Arg</i>	Pós	87±1,6†	9±0,4*	9±0,6*	9±0,4*
FSA (mL/min/100g)					
<i>Lys109Lys</i>	Pré	1,81±0,6	0,18±0,7*	0,23±0,7*	0,18±0,6*
<i>Lys109Lys</i>	Pós	2,12±1,3†	0,20±0,6*	0,21±0,6*	0,21±0,8*
<i>Lys109Arg/Arg109Arg</i>	Pré	1,86±0,8	0,19±0,8*	0,19±0,7*	0,21±0,7*
<i>Lys109Arg/Arg109Arg</i>	Pós	2,83±1,0†	0,21±0,7*	0,19±0,9*	0,20±0,8*
ANSM (impulso/min)					
<i>Lys109Lys</i>	Pré	36±0,4	9±0,6*	11±0,6*	10±0,5*
<i>Lys109Lys</i>	Pós	29±1,0†	10±0,7*	11±0,8*	11±0,4*
<i>Lys109Arg/Arg109Arg</i>	Pré	36±0,7	10±0,3*	10±0,0*	10±0,1*
<i>Lys109Arg/Arg109Arg</i>	Pós	29±1,8†	11±0,1*	10±0,1*	10±0,3*

Valores são média ± EP. PAM= Pressão arterial média; FC= Frequência cardíaca; FSM= Fluxo sanguíneo Muscular; ANS= Atividade Nervosa Simpática. * $P < 0.05$ vs Basal. † diferença do pré, $P < 0.05$

TABELA 15. Respostas Hemodinâmicas Durante o Exercício Isométrico (30% CVM) dos 75 indivíduos Pré e Pós intervenção do genótipo estudado SNP- rs1137101 - HCFMUSP.

Parâmetros		basal	1 min	2 min	3 min
FC (bpm)					
<i>Gln223/Gln</i>	Pré	69±1,2	13±1,0*	12±1,1*	13±1,1*
<i>Gln223/Gln</i>	Pós	67±1,4†	12±1,1*	13±1,0*	12±1,2*
<i>Arg223Arg/Gln223Arg</i>	Pré	79±0,8‡	15±0,5*	15±0,6*	15±0,6*
<i>Arg223Arg/Gln223Arg</i>	Pós	66±0,6†	14±0,7*	14±0,6*	14±0,6*
PAM (mmHg)					
<i>Gln223/Gln</i>	Pré	91±1,8	15±1,0*	16±1,0*	16±1,0*
<i>Gln223/Gln</i>	Pós	88±1,3†	13±1,1*	16±1,1*	15±1,2*
<i>Arg223Arg/Gln223Arg</i>	Pré	91±1,0	17±0,5*	19±0,4*	18±0,3*
<i>Arg223Arg/Gln223Arg</i>	Pós	80±0,8†	17±0,6*	17±0,3*	17±0,4*
FSA (mL/min/100g)					
<i>Gln223/Gln</i>	Pré	1,75±1,1	0,19±0,5*	0,20±0,5*	0,20±0,6*
<i>Gln223/Gln</i>	Pós	2,11±1,8†	0,21±0,6*	0,23±0,7*	0,22±0,5*
<i>Arg223Arg/Gln223Arg</i>	Pré	1,84±1,5	0,22±0,8*	0,22±0,8*	0,21±0,8*
<i>Arg223Arg/Gln223Arg</i>	Pós	2,17±0,7†	0,21±0,8*	0,22±0,7*	0,22±0,7*
ANSM (impulso/min)					
<i>Gln223/Gln</i>	Pré	36±0,6	14±0,7*	13±0,6*	13±0,5*
<i>Gln223/Gln</i>	Pós	28±1,0†	12±0,8*	12±0,6*	14±0,8*
<i>Arg223Arg/Gln223Arg</i>	Pré	43±0,7‡	15±0,5*	15±0,4*	17±0,7*
<i>Arg223Arg/Gln223Arg</i>	Pós	29±0,9†	13±0,5*	15±0,6*	15±0,6*

Valores são média ± EP. PAM= Pressão arterial média; FC= Frequência cardíaca; FSM= Fluxo sanguíneo Muscular; ANS= Atividade Nervosa Simpática. * $P<0.05$ vs Basal; † diferença do pré, $P<0.05$; ‡ $P<0.05$ vs Gln223Gln.

TABELA 16. Respostas Hemodinâmicas Durante o Exercício Isométrico (30% CVM) dos 76 indivíduos Pré e Pós intervenção do genótipo estudado SNP - rs8179183 - HCFMUSP.

Parâmetros		basal	1 min	2 min	3 min
FC (bpm)					
<i>Asn656Asn</i>	Pré	69±0,7	12±1,1*	12±1,0*	13±1,0*
<i>Asn656Asn</i>	Pós	64±0,8†	11±1,0*	12±1,2*	12±1,1*
<i>Lys656Asn/Lys656Lys</i>	Pré	69±0,6	10±0,6*	11±0,4*	11±0,4*
<i>Lys656Asn/Lys656Lys</i>	Pós	67±1,2†	11±0,5*	10±0,5*	10±0,6*
PAM (mmHg)					
<i>Asn656Asn</i>	Pré	92±2,3	10±1,0*	9±1,0*	10±1,0*
<i>Asn656Asn</i>	Pós	89±0,8†	8±1,0*	9±1,1*	8±1,2*
<i>Lys656Asn/Lys656Lys</i>	Pré	89±1,7	11±0,4*	10±0,4*	11±0,4*
<i>Lys656Asn/Lys656Lys</i>	Pós	87±1,5†	10±0,4*	11±0,3*	09±0,4*
FSA (mL/min/100g)					
<i>Asn656Asn</i>	Pré	1,79±0,8	0,20±0,6*	0,24±0,6*	0,23±0,6*
<i>Asn656Asn</i>	Pós	2,00±1,0†	0,20±0,5*	0,20±0,5*	0,22±0,6*
<i>Lys656Asn/Lys656Lys</i>	Pré	1,93±0,7	0,20±0,7*	0,21±0,7*	0,21±0,8*
<i>Lys656Asn/Lys656Lys</i>	Pós	2,09±2,0†	0,22±0,5*	0,21±0,6*	0,20±0,5*
ANSM (impulso/min)					
<i>Asn656Asn</i>	Pré	36±1,0	9±0,6*	10±0,6*	9±0,5*
<i>Asn656Asn</i>	Pós	29±1,0†	8±0,6*	11±0,4*	10±0,4*
<i>Lys656Asn/Lys656Lys</i>	Pré	36±0,9	9±0,3*	12±0,0*	12±0,1*
<i>Lys656Asn/Lys656Lys</i>	Pós	28±1,3†	10±0,4*	11±0,5*	10±0,3*

Valores são média ± EP. PAM= Pressão arterial média; FC= Frequência cardíaca; FSM= Fluxo sanguíneo Muscular; ANS= Atividade Nervosa Simpática. *P<0.05 vs Basal. † diferença do pré , P<0.05

5.4.4. “Stress” Mental (Stroop color test)

As variáveis neurovasculares e hemodinâmicas nos genótipos de cada códon, nesse protocolo, comportaram-se de forma semelhante ao observado durante o exercício físico moderado. Nota-se nas **tabelas 17, 18 e 19** aumento progressivo destas variáveis, que entretanto permaneceram semelhantes entre os genótipos de cada códon avaliado.

TABELA 17. Respostas Hemodinâmicas Durante o “Stress” Mental dos 75 indivíduos Pré e Pós intervenção do genótipo estudado SNP - rs1137100 - HCFMUSP.

Parâmetros		basal	1 min	2 min	3 min	4 min
FC (bpm)						
<i>Lys109Lys</i>	Pré	70±1,5	11±1,0*	11±1,0*	13±1,2*	10±1,0*
<i>Lys109Lys</i>	Pós	66±1,3†	10±1,1*	12±1,3*	11±1,0*	11±1,0*
<i>Lys109Arg/Arg109Arg</i>	Pré	66±1,0	11±0,5*	12±0,5*	12±0,2*	11±0,4*
<i>Lys109Arg/Arg109Arg</i>	Pós	63±1,2†	10±0,3*	13±0,6*	11±0,2*	12±0,3*
PAM (mmHg)						
<i>Lys109Lys</i>	Pré	90±1,0	10±0,7*	10±1,0*	11±0,9*	12±1,0*
<i>Lys109Lys</i>	Pós	86±0,9†	11±0,4*	9±1,3*	10±0,8*	10±1,0*
<i>Lys109Arg/Arg109Arg</i>	Pré	92±1,0	10±0,6*	10±0,4*	11±0,4*	12±0,5*
<i>Lys109Arg/Arg109Arg</i>	Pós	87±1,6†	9±0,7*	9±0,4*	10±0,5*	11±0,4*
FSA (mL/min/100g)						
<i>Lys109Lys</i>	Pré	1,81±0,6	0,20±0,7*	0,23±0,7*	0,20±0,7*	0,21±0,7*
<i>Lys109Lys</i>	Pós	2,12±1,3†	0,22±0,4*	0,21±0,5*	0,20±0,3*	0,22±0,7*
<i>Lys109Arg/Arg109Arg</i>	Pré	1,86±0,8	0,20±0,8*	0,19±0,7*	0,22±0,8*	0,19±0,7*
<i>Lys109Arg/Arg109Arg</i>	Pós	2,83±1,0†	0,20±0,7*	0,21±0,9*	0,22±0,5*	0,21±0,5*
ANSM (impulso/min)						
<i>Lys109Lys</i>	Pré	36±0,4	10±0,6	12±0,6*	12±0,5*	12±1,0*
<i>Lys109Lys</i>	Pós	29±1,0†	11±0,7	11±0,5*	11±0,4*	11±1,1*
<i>Lys109Arg/Arg109Arg</i>	Pré	36±0,7	11±0,3*	10±0,0*	12±0,0*	13±0,4*
<i>Lys109Arg/Arg109Arg</i>	Pós	29±1,8†	10±0,4*	11±0,2*	10±0,2*	11±0,3*

Valores são média ± EP. PAM= Pressão arterial média; FC= Frequência cardíaca; FSM= Fluxo sanguíneo Muscular; ANS= Atividade Nervosa Simpática. * $P<0.05$ vs Basal. † diferença do pré , $P<0.05$

TABELA 18. Respostas Hemodinâmicas Durante o “Stress” Mental dos 75 indivíduos Pré e Pós intervenção do genótipo estudado SNP - rs1137101 -HCFMUSP.

Parâmetros		basal	1 min	2 min	3 min	4 min
FC (bpm)						
<i>Gln223/Gln</i>	Pré	69±1,2	16±1,0*	15±1,1*	15±1,0*	16±1,0*
<i>Gln223/Gln</i>	Pós	67±1,4†	14±1,1*	13±1,4*	15±1,1*	14±1,1*
<i>Arg223Arg/Gln223Arg</i>	Pré	79±0,8‡	18±0,4*	17±0,4*	19±0,4*	18±0,6*
<i>Arg223Arg/Gln223Arg</i>	Pós	66±0,6†	16±1,0*	15±1,1*	15±1,0*	16±1,0*
PAM (mmHg)						
<i>Gln223/Gln</i>	Pré	91±1,8	14±1,0*	14±1,0*	14±1,0*	15±1,0*
<i>Gln223/Gln</i>	Pós	88±1,3†	14±1,1*	13±1,4*	12±1,1*	12±1,1*
<i>Arg223Arg/Gln223Arg</i>	Pré	91±1,0	16±0,5*	18±0,6*	18±0,3*	19±0,4*
<i>Arg223Arg/Gln223Arg</i>	Pós	80±0,8†	15±1,0*	15±1,1	13±1,3*	14±1,0*
FSA (mL/min/100g)						
<i>Gln223/Gln</i>	Pré	1,75±1,1	0,19±0,5*	0,20±0,5*	0,21±0,6*	0,22±0,5*
<i>Gln223/Gln</i>	Pós	2,11±1,8†	0,21±0,3*	0,20±0,6*	0,21±0,7*	0,21±0,4*
<i>Arg223Arg/Gln223Arg</i>	Pré	1,84±1,5	0,23±0,8*	0,20±0,8*	0,20±0,8*	0,23±0,8*
<i>Arg223Arg/Gln223Arg</i>	Pós	2,17±0,7†	0,24±0,3*	0,25±0,6*	0,24±0,7*	0,23±0,4*
ANSM (impulso/min)						
<i>Gln223/Gln</i>	Pré	36±0,6	15±0,7*	16±0,6*	16±0,5*	16±1,0*
<i>Gln223/Gln</i>	Pós	28±1,0†	17±0,4*	17±0,5*	16±0,5*	16±1,1*
<i>Arg223Arg/Gln223Arg</i>	Pré	43±0,7‡	15±0,6*	15±0,5*	15±0,6*	18±0,3*
<i>Arg223Arg/Gln223Arg</i>	Pós	29±0,9†	12±0,8*	12±0,7*	13±0,7*	14±1,0*

Valores são média ± EP. PAM= Pressão arterial média; FC= Frequência cardíaca; FSM= Fluxo sanguíneo Muscular; ANS= Atividade Nervosa Simpática; * $P<0.05$ vs Basal. † diferença do pré, $P<0.05$; ‡ $P<0.05$ vs Gln223Gln.

TABELA 19. Respostas Hemodinâmicas Durante o “Stress” Mental dos 76 indivíduos Pré e Pós intervenção do genótipo estudado SNP - rs8179183 -HCFMUSP.

Parâmetros		basal	1 min	2 min	3 min	4 min
FC (bpm)						
<i>Asn656Asn</i>	Pré	69±0,7	12±1,4*	11±1,0*	12±1,0*	12±1,0*
<i>Asn656Asn</i>	Pós	64±0,8†	10±1,4*	10±0,9*	13±0,8*	11±0,8*
<i>Lys656Asn/Lys656Lys</i>	Pré	69±0,6	11±0,6*	11±0,5*	11±0,4*	12±0,4*
<i>Lys656Asn/Lys656Lys</i>	Pós	67±1,2†	8±1,4*	9±0,9*	10±0,8*	11±0,9*
PAM (mmHg)						
<i>Asn656Asn</i>	Pré	92±2,3	11±1,0*	9±1,0*	11±1,0*	12±1,0*
<i>Asn656Asn</i>	Pós	89±0,8†	10±1,0*	10±0,8*	10±0,8*	9±0,7*
<i>Lys656Asn/Lys656Lys</i>	Pré	89±1,7	10±0,4*	10±0,4*	13±0,5*	11±0,4*
<i>Lys656Asn/Lys656Lys</i>	Pós	87±1,5†	8±1,4*	9±0,9*	9±0,8*	9±0,8*
FSA (mL/min/100g)						
<i>Asn656Asn</i>	Pré	1,79±0,8	0,21±0,6*	0,21±0,5*	0,23±0,6*	0,22±0,6*
<i>Asn656Asn</i>	Pós	2,00±1,0†	0,23±0,7*	0,23±0,6*	0,24±0,8*	0,25±0,8*
<i>Lys656Asn/Lys656Lys</i>	Pré	1,93±0,7	0,23±0,8*	0,22±0,7*	0,22±0,8*	0,23±0,8*
<i>Lys656Asn/Lys656Lys</i>	Pós	2,09±2,0†	0,25±0,7*	0,26±0,6*	0,24±0,9*	0,26±0,8*
ANSM (impulso/min)						
<i>Asn656Asn</i>	Pré	36±1,0	12±0,4*	12±0,4*	13±0,5*	13±0,4*
<i>Asn656Asn</i>	Pós	29±1,0†	11±0,5*	10±0,2*	10±0,4*	10±0,4*
<i>Lys656Asn/Lys656Lys</i>	Pré	36±0,9	12±0,4*	11±0,1*	10±0,1*	12±0,4*
<i>Lys656Asn/Lys656Lys</i>	Pós	28±1,3†	11±0,4*	10±0,1*	10±0,1*	10±0,4*

Valores são média ± EP. PAM= Pressão arterial média; FC= Frequência cardíaca; FSM= Fluxo sanguíneo Muscular; ANS= Atividade Nervosa Simpática. * $P<0.05$ vs Basal. † diferença do pré , $P<0.05$

6. Discussão

Nosso estudo expandiu o conhecimento atual sobre os fatores genéticos que influenciam a massa de gordura e a predisposição à obesidade diante de polimorfismos do LEPR, localizados nos SNPs rs1137100, rs1137101 e rs8179183, avaliando as alterações do balanço energético e as alterações do controle neurovascular em mulheres obesas antes e após um programa na mudança do hábito de vida.

A hipótese aventada foi a de que os polimorfismos do LEPR pudessem modular o grau da resistência à leptina e, portanto promover efeitos metabólicos e neurovasculares.

Com estas metas estabelecidas, observamos que o principal achado do nosso estudo foi a influência da variante genética Gln223Gln/Gln223Arg do códon 223 presente no LEPR sobre a massa gorda nas pacientes obesas, enquanto, nas outras variantes gênicas dos códons 109 e 656, não verificamos diferenças nas variáveis antropométricas. Entretanto, esses resultados são controversos na literatura, e parecem sofrer influências da etnia, da população estudada, do gênero, dos haplótipos e do grau de obesidade (WAUTERS et., 2001, GOTODA et., 1997).

Heo M et al (2002), e Chagnon YC et al (2000), avaliaram as três formas do polimorfismo do LEPR nos códons 109, 223 e 656 na gênese da obesidade e não demonstraram associação desses 3 genótipos do LEPR com o IMC e gordura corporal após ajuste para idade e gênero.

Como citado anteriormente, em nossos resultados as pacientes polimórficas para Gln223Gln/Gln223Arg, apresentavam um maior acúmulo de massa gorda quando comparadas com a forma homozigota Gln223Gln.

Adicionalmente, demonstramos que, de fato, a presença do polimorfismo Gly223Arg/Arg223Arg do receptor da leptina o responsável pelo aumento da massa gorda em comparação à forma selvagem deste códon e foi independente das mutações que codificam os aminoácidos para os códons 109 e 656. Este achado ressalta a importância de se levar em consideração o códon ao invés do polimorfismo isoladamente quando se estuda a composição corporal em humanos.

Há pelo menos duas hipóteses convincentes para acreditar que a maior massa gorda em mulheres Gln223Arg/Arg223Arg, é mediada pelos receptores de leptina. A primeira é que os indivíduos dos dois grupos eram homogêneos em relação ao sexo, idade e à concentração plasmática de

leptina, sendo improvável que o maior acúmulo de massa gorda nesses indivíduos sofra influência dessas variáveis no ganho de peso.

Por outro lado, sabe-se que o sistema nervoso simpático desempenha um papel importante no controle do balanço energético (BAAK et., 2001) e nesta investigação notamos também uma tendência à menor ativação simpática no grupo de mulheres com a associação polimórfica Gln223Arg/Arg223arg ($P=0.07$), o que poderia resultar em menor gasto energético basal. É interessante observar que o nosso estudo utilizou a técnica direta de microneurografia, na perna direita (WALLIN et., 1993), técnica validada e empregada em estudos de laboratório em humanos com o objetivo de avaliar a atividade nervosa simpática diretamente (NEGRÃO et., 2001), ressaltando a relevância desta tendência.

Entretanto em adolescentes obesos mexicanos, a forma polimórfica Gln223Arg/Arg223Arg do LEPR, resultou em maior ativação simpática, (avaliada indiretamente por eletrocardiograma de repouso), desencadeando maior perda de peso nesses adolescentes. (GUIZAR-MENDOZA et., 2005).

Vale ressaltar em nossa investigação, que assim como no códon 223, as outras variáveis antropométricas analisadas eram homogêneas em relação ao sexo, idade, e índice de massa corporal nos códons 109 e 656 do LEPR. Corroborando com o nosso trabalho, Santos AFR et al (2005)

constataram não existir correlação entre as variantes gênicas do LEPR com a obesidade na população brasileira em ambos os sexos. Porém, Duarte SF et al (2007), estudando indivíduos obesos e magros, de ambos os sexos no Brasil, relataram associação do polimorfismo Gln223Arg com a obesidade.

Os mecanismos que levam à associação do polimorfismo à obesidade são controversos. Alguns autores sugerem que polimorfismos no LEPR poderiam modificar estruturalmente a proteína desse receptor e com isso comprometer a sua atividade funcional, provavelmente modulando a sensibilidade do LEPR em indivíduos obesos (FRIEDMAN-EINAT et., 2003).

No presente estudo, não foi observada associação das variantes gênicas dos códons 109 e 656, com as variáveis antropométricas. Estudos mostram que variações alélicas no LEPR são caracterizadas significativamente pelo componente étnico, assim, as frequências alélicas em cada população, veem se mostrando diferentes (CHAGNON et., 1999). Provavelmente, este fenômeno tenha ocorrido em nosso estudo. Como é sabido, a população brasileira tem sua origem a partir de três raízes étnicas bem definidas; européia, ameríndia e africana. Esta mescla étnica, associada à variabilidade das frequências dos polimorfismos genéticos, dentro das populações que formam o conjunto de cada uma destas raízes, fortalece a possibilidade de que parte da população estudada não seria

geneticamente homogênea e este fato poderia interferir nos nossos resultados.

Evidencia-se a necessidade de um melhor entendimento do papel desses polimorfismos na variabilidade da leptina no plasma e sua relação com a obesidade.

Um dos aspectos que ainda fascina os pesquisadores são os efeitos da leptina sobre o metabolismo lipídico. Bai Y et al (1996) sugerem a possibilidade da interação da leptina ao seu receptor, promovendo a oxidação de ácidos graxos e triglicérides, por meio da inibição da atividade da acetil-CoA carboxilase, uma das enzimas reguladoras da síntese de ácidos graxos. Nesse caso, essa interação provocaria mudança para oxidação preferencial de lipídeos.

Alguns autores propõem que haja influência das frequências polimórficas do LEPR no códon 109 em relação à composição lipídica na população suíça. Foi observado que indivíduos obesos portadores do genótipo homozigoto Arg109Arg apresentavam concentrações de HDL maiores que os portadores dos demais genótipos. Por outro lado, nessa mesma população o genótipo Gln223Gln do LEPR relacionava-se com maior concentração de triglicérides e menor de HDL, sugerindo que este

polimorfismo poderia contribuir para a correlação da obesidade com a doença cardiovascular (ROSMOND et., 2000).

Corroborando esse achado, Chiu KC et al (2004) constataram que indivíduos obesos com a presença do alelo homozigoto Arg223Arg apresentavam elevação de colesterol total e LDL-C, quando comparados a indivíduos para a forma selvagem Gln223Gln.

Todavia, estudo conduzido por Rosmond R et al (2000) não revelou relação do genótipo Lys656Asn com parâmetros metabólicos em indivíduos obesos na população suíça.

Estudos aventam que a leptina interfere de modo direto no metabolismo da glicose, e não por efeito secundário á redução de peso. Kamohara S et al (1997) demonstraram que a leptina administrada a uma cepa selvagem de camundongos, acarretou um aumento da utilização da glicose pelo tecido muscular. Tal efeito foi obtido tanto por administração da leptina por via intravenosa como por via intracérebro-ventricular, propondo que os efeitos da leptina sobre o metabolismo de glicose se dariam por uma ação no sistema nervoso simpático.

de Luis DR et al (2008) verificaram que não existia associação entre as variantes gênicas do códon 656 com o metabolismo de glicose e a

resistência à insulina em indivíduos diabéticos tipo 2. Observou-se em contraste, neste mesmo estudo, uma relação entre o polimorfismo LEPR Gln223Arg e a resistência à insulina, definindo a presença do polimorfismo genético Gln223Arg como determinante para resistência à insulina.

No presente estudo, buscamos verificar a associação das variáveis metabólicas com os polimorfismos 109, 223 e 656 do LEPR, sem demonstração de relação entre as variáveis metabólicas e os genótipos estudados.

O conjunto de resultados observados na literatura (de Luis et., 2008, Rosmond et., 2000), e os da presente investigação, sugere que embora as variações genéticas no LEPR possam interferir na ação da leptina sobre as variáveis metabólicas, a interação gene-ambiente, bem como a própria questão relacionada com a origem étnica, influencia de forma preponderante a relação do polimorfismo com as variáveis estudadas.

Em nossa investigação observamos que as variantes genéticas encontradas em cada códon estudado no LEPR, não influíram nas variáveis metabólicas avaliadas em cada grupo, bem como no gasto energético da nossa população.

Foi avaliada neste estudo, ainda, a influência dos polimorfismos do LEPR nas variáveis neurovasculares em repouso e durante estímulos ou manobras fisiológicas devido à relação existente entre o receptor de leptina, e a estimulação nervosa simpática, modulando o gasto energético (HALL et., 2000, CHAGNON Y et., 2002, ROSMOND et., 2000, SHEK et., 1998),

Muitos autores já descreveram possíveis efeitos neurovasculares decorrentes da realização de exercício físico com importante reflexo sobre o gasto de energia. Estes efeitos atuam positivamente no aumento do metabolismo de repouso o que se deve às ações integradas entre a oxidação de lípides e degradação de glicose. Desta forma, houve o interesse em investigar o papel dos polimorfismos da LEPR em manobras simpatoexcitatórias fisiológicas. Avaliamos as variáveis neurovasculares e hemodinâmicas durante o exercício físico leve e moderado e no “stress” mental. Notamos que durante o exercício físico leve (10% CVM), o exercício físico moderado (30% CVM) e o “stress” mental, não houve diferenças nas respostas neurovasculares e hemodinâmicas em ambos os subgrupos estudados de cada códon.

Provavelmente outros mediadores, além do receptor de leptina estudado, podem ser responsáveis pela regulação dos disparos simpáticos durante o exercício leve, moderado e “stress” mental, como os

mecanorreceptores, sensíveis a deformações mecânicas, e os metaborreceptores, sensíveis a alterações químicas resultantes do metabolismo (RAY et., 1993). Estes sinais aferentes, que acionam o comando central são considerados como o principal mecanismo da ativação simpática (WALLIN et., 1989).

Após os quatro meses de intervenção avaliamos a influência das mudanças no estilo de vida sobre as variáveis antropométricas, metabólicas, neurovasculares e hemodinâmicas nos pacientes portadores dos alelos polimórficos do LEPR 109, 223 e 656.

As pacientes apresentavam baixa capacidade cardiorrespiratória decorrente do sedentarismo. No entanto, a mudança do hábito de vida a que foram submetidas, foi considerada efetiva, tendo em vista o aumento do VO_2 observado no pico do exercício.

Não houve influência da presença de alelo polimórfico do LEPR na resposta das medidas antropométricas, metabólicas, neurovasculares e durante manobras fisiológicas após o período de intervenção com mudança no hábito de vida.

A mudança no hábito de vida melhorou as variáveis de peso, IMC e cintura abdominal, porém as variantes genéticas de cada códon 109, 223 e 656 não alteraram essas variáveis. Entretanto, de Luis DR et al (2006)

verificaram que após modificação no estilo de vida (dieta e exercício físico), pacientes obesos de ambos os sexos que apresentavam genótipo Lys656Asn, obtiveram menor perda de peso, diminuição do IMC e do índice cintura-quadril em comparação aos indivíduos selvagens para este códon.

Houve melhora da resistência à insulina, nas concentrações plasmáticas de leptina e triglicérides sem influência dos polimorfismos do LEPR. Este achado do nosso trabalho está de acordo com o estudo realizado por Kimura M et al (2004), que observaram diminuição na concentração de leptina associada à redução na gordura corporal.

Desde que a perda de peso corporal diminui a atividade nervosa simpática muscular, é legítimo supor que o emagrecimento reduziu a atividade nervosa simpática, que controla a frequência cardíaca ou mesmo influencia no balanço entre a intensificação simpática e a retirada vagal durante o exercício. Isto pode explicar a menor frequência cardíaca no repouso, exercício e “stress” mental após emagrecimento. Em consequência da redução da atividade nervosa simpática e da provável melhora do fluxo sanguíneo, houve diminuição na pressão arterial média sem interferência dos polimorfismos do LEPR. Esses ajustes hemodinâmicos e neurovasculares minimizam os fatores de risco cardiovascular nas atividades diárias de indivíduos obesos.

A partir dos dados apresentados, podemos dizer que o polimorfismo Gln223Arg/Arg223Arg influencia no aumento de massa gorda em mulheres obesas. Entretanto, após quatro meses de intervenção nos hábitos de vida dessas pacientes, a associação entre o polimorfismo citado e o aumento da massa gorda não se manteve, o que pode ser atribuído à melhora da resistência a ação da leptina, que sabidamente é favorecida por perda de peso, como ocorreu na nossa população.

7. Conclusão

A presença apenas da variante alélica Gln223Arg/Arg223Arg do códon 223 do gene do receptor de leptina conferiu aumento da massa gorda a mulheres obesas. Entretanto não houve alterações nos outros componentes da composição corporal, nas variáveis metabólicas, hemodinâmicas e neurovasculares deste códon e das variantes gênicas dos códons 109 e 656.

Os polimorfismos estudados não influenciaram nas respostas antropométricas, metabólicas, neurovasculares e hemodinâmicas observadas decorrentes da mudança no hábito de vida em mulheres obesas

8. Referências:

1. Ahima PS, Prabakaran D, Mantzoros CS, Qu D, Lowell B, Maratos-flier, Flier IS. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*.1996; 382: 250-255.
2. Ahima RS, Osei SY. Leptin signaling. *Physiol Behav*. 2004 Apr; 81(2):223-41.
3. AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE. Guidelines for exercise testing and prescription. 6th ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2000; 368pp.
4. Baumann H, Morella KK, White DW, Dembski M, Bailon PS, Kim H, Lai CF, Tartaglia LA. The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors. *Proc Natl Acad Sci*. 1996; Aug 6; 93 (16):8374-8.
5. Bray GA, Popkin B. M. Dietary fat intake does affect obesity! *Am J Clin Nutr* . 1998; 68:1157-73.

6. Brodde, O.E. Beta1- and beta 2-adrenoceptors in the human heart: properties, function, and alterations in chronic heart failure. *Pharmacol. Rev.*1991,v.43, p.203-42.
7. Cabrera MAS, Jacob Filho W. Obesidade em idosos: prevalência, distribuição e associação com hábitos e co-morbidades. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2001; 45 (5): 494-501.
8. Carlyle M, Jones OB, Kuo JJ, Hall JE. Chronic cardiovascular and renal actions of leptin: role of adrenergic activity. *Hypertension.* v.39, suppl 2, 2002; p.496-501.
9. Caro JF, Kolaczynski JW, Nyce MR, Ohannesian JP, Opentanova I, Goldman WH, Lynn RB, Zhang PL, Sinha MK, Considine RV. Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet.* 1996; Jul 20; 348(9021):159-61.
10. Chagnon YC, Chung WK, Pérrusse L, Chagnon M, Leibel RL, Bouchard C. Linkages and associations between the leptin receptor gene and human body composition in the Québec Family Study. *Int L Obes Relat metab Disord.* 1999; 23:278-286.
11. Chagnon YC, Chung WK, Pérusse L, Chagnon M, Leibel RL, Bouchard C. Linkages and associations between the leptin receptor

- (LEPR) gene and human body composition in the Québec Family Study. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1999; Mar;23(3):278-86.
12. Chagnon YC, Rankinen T, Snyder EE. The human obesity gene map: the 2002 update. *Obes Res*. 2003; 11:313–67.
 13. Chagnon YC, Wilmore JH, Borecki IB, Gagnon J, Périus L, Chagnon M, Collier GR, Leon AS, Skinner JS, Rao DC, Bouchard C. Associations between the leptin receptor gene and adiposity in middle-aged Caucasian males from the HERITAGE family study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000; Jan;85(1):29-34.
 14. Chan JL and Heist K. The role of falling leptin levels in the neuroendocrine and metabolic adaptation to short-term starvation in healthy men, *J. Clin. Invest*. 2003; 111 (9), pp. 1409–1421.
 15. Chiu KC, Chu A, Chuang LM, Saad MF. Association of leptin receptor polymorphism with insulin resistance. *Eur J Endocrinol*. 2004; May;150(5):725-9.
 16. Chung WK, Belfi K, Chua M, Wiley J, Mackintosh R, Nicolson M, Boozer CN, Leibel RL. Heterozygosity for Lep(ob) or Lep(rdb) affects body composition and leptin homeostasis in adult mice. *Am J Physiol*. 1998; Apr; 274(4 Pt 2):R985-90.

17. Clément K, Vaisse C, Lahlou N, Cabrol S, Pelloux V, Cassuto D, Gormelen M, Dina C, Chambaz J, Lacorte JM, Basdevant A, Bougnères P, Lehouc Y, Froguel P, Guy-Grand B. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature*. 1998; Mar 26; 392(6674):398-401.
18. Considine RV, Considine EL, Williams CJ, Hyde TM, Caro JF. The hypothalamic leptin receptor in humans: identification of incidental sequence polymorphisms and absence of the db/db mouse and fa/fa rat mutations. *Diabetes*. 1996; Jul;45(7):992-4.
19. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N. Eng. J. Med.* 1996; v.334, p. 292-5.
20. Crabbe P, Goemaere S, Zmierzak H, Van Pottelbergh I, De Bacquer D, Kaufman JM. Are serum leptin and the Gln223Arg polymorphism of the leptin receptor determinants of bone homeostasis in elderly men? *Eur J Endocrinol*. 2006; May; 154(5):707-14.
21. Crampes F, Beauville M, Riviere D, Garrigues M. Effect of physical training in human on the response of isolated cells to epinephrine. *J Appl Physiol*. 1986; 61:25-9.

22. Cunningham MJ, Clifton DK, Steiner RA. Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. *Biol Reprod.* 1999; Feb; 60(2):216-22.
23. de Luis Roman D, de la Fuente RA, Sagrado MG, Izaola O, Vicente RC. Leptin receptor Lys656Asn polymorphism is associated with decreased leptin response and weight loss secondary to a lifestyle modification in obese patients. *Arch Med Res.* 2006; Oct; 37(7):854-9.
24. dos Santos LC, Martini LA, Cintra Ide P, Fisberg M. Relationship between calcium intake and body mass index in adolescents. *Arch Latino am Nutr.* 2005; Dec; 55(4):345-9.
25. Duarte SF, Francischetti EA, Genelhu VA, Cabello PH, Pimentel MM. LEPR p.Q223R, beta3-AR p.W64R and LEP c.-2548G>A gene variants in obese Brazilian subjects. *Genet Mol Res.* 2007; Oct 5; 6(4):1035-43.
26. Eleftheriou F, Ahn JD, Takeda S, Starbuck M, Yang X, Liu X, Kondo H, Richards WG, Bannon TW, Noda M, Clement K, Vaisse C, Karsenty G. Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature.* 2005; Mar 24; 434(7032):514-20.
27. Fairbrother UL, Tankó LB, Walley AJ, Christiansen C, Froguel P, Blakemore AI. Leptin receptor genotype at Gln223Arg is associated

- with body composition, BMD, and vertebral fracture in postmenopausal Danish women. *J Bone Miner Res.* 2007; Apr; 22(4):544-50.
- 28.Fei H and Okano HJ. Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997; USA 94 (13), pp. 7001–7005.
- 29.Flier JS. Clinical review 94: What's in a name? In search of leptin's physiologic role. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; May; 83(5):1407-13.
- 30.French SA, Story M, Jeffery RW. Environmental influences on eating and physical activity. *Annu Rev Public Health* 2001; 22:309-35.
- 31.Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972; Jun; 18(6):499-502.
- 32.Friedman JE, Ferrara CM, Aulak KS, Hatzoglou M, McCune SA, Park S, Sherman WM. Exercise training down-regulates ob gene expression in the genetically obese SHHF/Mcc-fa(cp) rat. *Horm Metab Res.* 1997; May; 29(5):214-9.

33. Friedman-einat M, Camoin L, Faltin Z, Rosenblum CI, Kaliouta V, Eshdat Y, Strosberg AD. Serum leptin activity in obese and lean patients. *Regul Pept.* 2003; Mar 28;111(1-3):77-82.
34. Frühbeck G. Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem J.* 2006; Jan 1; 393 (Pt 1):7-20.
35. Ghilardi N, Ziegler S, Wiestner A, Stoffel R, Heim MH, Skoda RC. Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci.* 1996; Jun 25;93(13):6231-5.
36. Gotoda T, Manning BS, Goldstone AP, Imrie H, Evans AL, Strosberg AD, McKeigue PM, Scott J, Aitman TJ. Leptin receptor gene variation and obesity: lack of association in a white British male population. *Hum Mol Genet.* 1997; Jun; 6(6):869-76.
37. Guízar-Mendoza JM, Amador-Licona N, Flores-Martínez SE, López-Cardona MG, Ahuatzin-Trémary R, Sánchez-Corona J. Association analysis of the Gln223Arg polymorphism in the human leptin receptor gene, and traits related to obesity in Mexican adolescents. *J Hum Hypertens.* 2005; May; 19(5):341-6.
38. Hall JE, Brands MW, Hildebrandt DA, Kuo J, Fitzgerald S. Role of sympathetic nervous system and neuropeptides in obesity hypertension. *Rev. Bras. Hipertens.* 2000; v.3, p.212-24.

- 39.Hall JE, Hildebrandt DA, Kuo J. Obesity hypertension: role of leptin and sympathetic nervous system. *Am. J. Hypertens.* 2001; v.14, p. 103S-15S.
- 40.Hamrick MW. Leptin, bone mass, and the thrifty phenotype. *J Bone Miner Res.* 2004; Oct; 19(10):1607-11.
- 41.Hayase H, Nomura S, Abe T, Izawa T. Relation between fat distributions and several plasma adipocytokines after exercise training in premenopausal and postmenopausal women. *J Physiol Anthropol Appl Human Sci.* 2002; Mar; 21(2):105-13.
- 42.Heo M, Leibel RL, Fontaine KR, Boyer BB, Chung WK, Koulou M, Karvonen MK, Pesonen U, Rissanen A, Laakso M, Uusitupa MI, Chagnon Y, Bouchard C, Donohoue PA, Burns TL, Shuldiner AR, Silver K, Andersen RE, Pedersen O, Echwald S, Sørensen TI, Behn P, Permutt MA, Jacobs KB, Elston RC, Hoffman DJ, Gropp E, Allison DB. A meta-analytic investigation of linkage and association of common leptin receptor (LEPR) polymorphisms with body mass index and waist circumference. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2002; May; 26(5):640-6.
- 43.Hileman SM and Pierroz DD. Characterization of short isoforms of the leptin receptor in rat cerebral microvessels and of brain uptake of

leptin in mouse models of obesity, *Endocrinology* 2002; 143 (3), pp. 775–783.

44. Houmard JA, Cox JH, MacLean PS, Barakat HA. Effect of short-term exercise training on leptin and insulin action. *Metabolism*. 2000 Jul;49(7):858-61. Kimura M, Tateishi N, Shiota T, Yoshie F, Yamauchi H, Suzuki M, Shibasaki T. Long-term exercise down-regulates leptin receptor mRNA in the arcuate nucleus. *Neuroreport*. 2004; Mar 22; 15(4):713-6.
45. Islam MS, Sjöholm A, Emilsson V. Fetal pancreatic islets express functional leptin receptors and leptin stimulates proliferation of fetal islet cells. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2000; Oct; 24(10):1246-53.
46. Jebb SA, Moore MS. Contribution of a sedentary lifestyle and inactivity to the etiology of overweight and obesity: current evidence and research issues. *Med Sci Sports Exerc*. 1999; (11 Suppl):S534-S541.
47. Jequier E. Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Ann N Y Acad Sci*. 2002; 967:379–88.
48. Jiao J, Meng XW, Xing XP, Zhou XY, Li M, Xia WB, Xu L, Tian JP, Yu W. Bone mineral density and leptin receptor polymorphism Gln223Arg in Han women in Beijing. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*. 2004; 4:276–279.

49. Kamohara S, Burcelin R, Halaas JL, Friedman JM, Charron MJ. Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature*. 1997 Sep 25;389(6649):374-7.
50. Karlsson C, Lindell K, Svensson E, Bergh C, Lind P, Billig H, Carlsson LM, Carlsson B. Expression of functional leptin receptors in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997; Dec; 82 (12):4144-8.
51. Kastin AJ, Huang W, Jaspan JB, Maness LM. Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides*. 1996; 17(2):305-11.
52. Kennedy GC. The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc R Soc*. 1953; 140:578 –592.
53. Kim SM, Kim SH, Lee JR, Jee BC, Ku SY, Suh CS, Choi YM, Kim JG, Moon SY. Association of leptin receptor polymorphisms Lys109Arg and Gln223Arg with serum leptin profile and bone mineral density in Korean women. *Am J Obstet Gynecol*. 2008; Apr; 198 (4):421.e1-8.
54. Knoke JD, Barrett-Connor E. Weight loss: a determinant of hip bone loss in older men and women. The Rancho Bernardo Study. *Am J Epidemiol*. 2003; Dec. 15;158(12):1132-8.
55. Koh JM, Kim DJ, Hong JS, Park JY, Lee KU, Kim SY, Kim GS. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms Pvu II and Xba I

- influence association between leptin receptor gene polymorphism (Gln223Arg) and bone mineral density in young men. *Eur J Endocrinol.* 2002; Dec; 147(6):777-83.
- 56.Kontogianni MD, Dafni UG, Routsias JG, Skopouli FN. Blood leptin and adiponectin as possible mediators of the relation between fat mass and BMD in perimenopausal women. *J Bone Miner Res.* 2004 Apr; 19(4):546-51.
- 57.Kraemer RR, Kraemer GR, Acevedo EO, Hebert EP, Temple E, Bates M, Etie A, Haltom R, Quinn S, Castracane VD. Effects of aerobic exercise on serum leptin levels in obese women. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1999; Jul; 80(2):154-8.
- 58.Lakka TA, Rankinen T, Weisnagel SJ, Chagnon YC, Lakka HM, Ukkola O, Boulé N, Rice T, Leon AS, Skinner JS, Wilmore JH, Rao DC, Bergman R, Bouchard C. Leptin and leptin receptor gene polymorphisms and changes in glucose homeostasis in response to regular exercise in non diabetic individuals: the HERITAGE family study. *Diabetes.* 2004; Jun; 53 (6):1603-8.
- 59.Lawrence VJ, Coppack SW. The endocrine function of the fat cell-regulation by the sympathetic nervous system. *Horm.Metab. Res.*, v.32, p.453-67, 2000.

60. Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, Friedman JM. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature*. 1996; Feb 15; 379 (6566):632-5.
61. Levin BE, Dunn-Meynell AA, Banks WA. Obesity-prone rats have normal blood-brain barrier transport but defective central leptin signaling before obesity onset. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004; Jan; 286(1):R143-50.
62. Li Q. Expression and function of leptin and its receptor in mouse mammary gland. *Sci China C Life Sci*. 2007; Oct; 50(5):669-75.
63. Liu C, Grossmann A, Bain S, et al. Leptin stimulates cortical bone formation in obese mice. *J Bone Miner Res*. 1997; 12 (Suppl 1):S115.
64. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob-RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat. Med*. 1995; v.1; 1155-61.
65. Mammès O, Aubert R, Betoulle D, Péan F, Herbeth B, Visvikis S, Siest G, Fumeron F. LEPR gene polymorphisms: associations with overweight, fat mass and response to diet in women. *Eur J Clin Invest*. 2001; May; 31(5):398-404.

- 66.Margetic S and Gazzola C. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions, *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 2002; 26 (11), pp. 1407–1433.
- 67.Marti A, Novo FJ, Martinez-Anso E, Zaratiegui M, Aguado M, Martinez JA. Leptin gene transfer into muscle increases lipolysis and oxygen consumption in white fat tissue in ob/ob mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; May 29; 246(3):859-62.
- 68.Masuo K, Straznicky NE, Lambert GW, Katsuya T, Sugimoto K, Rakugi H, Socratous F, Hastings J, Lambert EA, Ogiwara T, Esler MD. Leptin-receptor polymorphisms relate to obesity through blunted leptin-mediated sympathetic nerve activation in a Caucasian male population. *Hypertens Res.* 2008; Jun; 31(6):1093-100.
- 69.Matarese G and Moschos S. Leptin in immunology, *J. Immunol* 2005; 174 (6), pp. 3137–3142.
- 70.Matsuoka N, Ogawa Y, Hosoda K, Matsuda J, Masuzaki H, Miyawaki T, Azuma N, Natsui K, Nishimura H, Yoshimasa Y, Nishi S, Thompson DB, Nakao K. Human leptin receptor gene in obese Japanese subjects: evidence against either obesity-causing mutations or association of sequence variants with obesity. *Diabetologia.* 1997; Oct; 40(10):1204-10.

71. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985; v.28, p.412-9.
72. McAuley MA, Chen X, Westfall TC. Central cardiovascular actions of neuropeptide Y. In: Colmers WF, Wahlestedt C. The biology of Neuropeptide Y and Related Peptides. New Jersey, *Human Press*. 1993; 389-418.
73. Middlekauff HR, Nguyen AH, Negao CE.; Nitzsche EU, Hoh CK, Natterson BA, Hamilton MA, Fonarow GC, Hage A, Moriguchi JD. Impact of acute mental stress on sympathetic nerve activity and regional blood flow in advanced heart failure. *Circulation*, 1997; v.96, p.1835-42.
74. Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Müller C, Carling D, Kahn BB. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature*. 2002; Jan 17; 415(6869):339-43.
75. Miyatake N, Takahashi K, Wada J, Nishikawa H, Morishita A, Suzuki H, Kunitomi M, Makino H, Kira S, Fujii M. Changes in serum leptin concentrations in overweight Japanese men after exercise. *Diabetes Obes Metab*. 2004 Sep; 6(5):332-7.

76. Morris DL and Rui L. Recent advances in understanding leptin signaling and leptin resistance, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2009; **297** (6), pp. E1247–E1259
77. Negrão CE, Rondon MUPB, Tinucci T, Alves MJN, Roveda F, Braga AMW, Reis SF, Nastari L, Barretto ACP, Krieger EM, Middlekauff, HR. Abnormal neurovascular control during exercise is linked to heart failure severity. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2001a, v.280, p.H1286-92.
78. Negrão CE, Trombetta, IC, Batalha LT, Ribeiro MM, Rondon MUPB, Tinucci T Forjaz, CLM, Barretto ACP, Halpern A, Villares SMF. Muscle metaboreflex control is diminished in normotensive obese women. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2001b, v.281, p.H469-75.
79. Negrão CE.; Irigoyen MC.; Moreira ED.; Brum, PC.; Freire, PM.; Krieger EM.. Effects of exercise training on the renal sympathetic nerve activity, baroreflex control and blood pressure responsiveness. *Am. J. Physiol. Regul. Integrat. Comp. Physiol*, 1993, v.265, p.R365-70.
80. Paracchini V, Pedotti P, Taioli E. Genetics of leptin and obesity: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2005 Jul 15;162(2):101-14.

81. Pérusse L, Collier G, Gagnon J, Leon AS, Rao DC, Skinner JS, Wilmore JH, Nadeau A, Zimmet PZ, Bouchard C. Acute and chronic effects of exercise on leptin levels in humans. *J Appl Physiol.* 1997; Jul;83(1):5-10.
82. Portolés O, Sorlí JV, Francés F, Coltell O, González JI, Sáiz C, Corella D. Effect of genetic variation in the leptin gene promoter and the leptin receptor gene on obesity risk in a population-based case-control study in Spain. *Eur J Epidemiol.* 2006; 21(8):605-12.
83. Quinton ND, Lee AJ, Ross RJ, Eastell R, Blakemore AI. A single nucleotide polymorphism (SNP) in the leptin receptor is associated with BMI, fat mass and leptin levels in postmenopausal Caucasian women. *Hum Genet.* 2001; Mar;108(3):233-6.
84. Racette SB, Coppack SW, Landt M, Klein S. Leptin production during moderate-intensity aerobic exercise. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; Jul; 82(7):2275-7.
85. Rahmouni K and Haynes WG. Intracellular mechanisms involved in leptin regulation of sympathetic outflow, *Hypertension.* 2003; 41 (3 Pt 2), pp. 763–76.
86. Ravussin E, Gautier JF. Metabolic predictors of weight gain. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 23 (suppl):37-41, 1999.

- 87.Ray CE, Mark AL. Sympathetic adjustments to exercise: insights from microneurographic recordings. In: Hainsworth E, Mark, AL. Cardiovascular reflex control in health and disease. *Saunders*. 1993; p.137-64.
- 88.Rosen CJ, Ackert-Bicknell C, Beamer WG, Nelson T, Adamo M, Cohen P, Bouxsein ML, Horowitz MC. Allelic differences in a quantitative trait locus affecting insulin-like growth factor-I impact skeletal acquisition and body composition. *Pediatr Nephrol*. 2005; 20:255–260.
- 89.Rosen CJ, Beamer WG, Donahue LR. Defining the genetics of osteoporosis: using the mouse to understand man. *Osteoporos Int*. 2001; 12(10):803-10.
- 90.Rosenbaum M, Nicolson M, Hirsch J, Murphy E, Chu F, Leibel RL. Effects of weight change on plasma leptin concentrations and energy expenditure. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997; Nov;82(11):3647-54.
- 91.Rosmond R, Chagnon YC, Holm G, Chagnon M, Périusse L, Lindell K, Carlsson B, Bouchard C, Björntorp P. Hypertension in obesity and the leptin receptor gene locus. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000; Sep; 85(9):3126-31.

92. Rosmond R, Chagnon YC, Holm G. Hypertension in obesity and the leptin receptor gene locus. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85:3126-3131.
93. Salopuro T, Pulkkinen L, Lindström J, Eriksson JG, Valle TT, Hämäläinen H, Ilanne-Parikka P, Keinänen-Kiukaanniemi S, Tuomilehto J, Laakso M, Uusitupa M. Genetic variation in leptin receptor gene is associated with type 2 diabetes and body weight: The Finnish Diabetes Prevention Study. *Int J Obes (Lond).* 2005; Oct;29(10):1245-51.
94. Saris WHM. The role of exercise in the dietary treatment of obesity. *Int J Obes.* 1993; 17(suppl.1):S17-21,
95. Satoh N, Ogawa Y, Katsuura G, Numata Y, Tsuji T, Hayase M, Ebihara K, Masuzaki H, Hosoda K, Yoshimasa Y, Nakao K. Sympathetic activation of leptin via the ventromedial hypothalamus: leptin-induced increase in catecholamine secretion. *Diabetes.* 1999; 48, 1787–1793.
96. Shek EW, Brands MW, Hall JE. Chronic leptin infusion increases arterial pressure. *Hypertension.* 1998; 31:409-414.
97. Skinner JS, Mclellan, TH. The transition from aerobic to anaerobic metabolism. *Res. Q. Exerc. Sport.* 1980; v.51 (1), p.234-48,

98. Snitker S, McDonald I, Ravussin E, Astrup A. The sympathetic nervous system and obesity: role in a etiology and treatment. *Obes. Rev.* 2000; v.1, p. 5-15.
99. Takeda S, Eleftheriou F, Levasseur R, Liu X, Zhao L, Parker KL Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell* 2002; 111:305-317.
100. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell.* 1995; Dec 29; 83(7):1263-7.
101. Thompson DB, et al. Structure and sequence variation at the human leptin receptor gene in lean and obese Pima Indians. *Hum Mol Genet.* 1997; 6(5):675-9.
102. Touw IP, De Koning JP, Ward AC, Hermans MH. Signaling mechanisms of cytokine receptors and their perturbances in disease. *Mol Cell Endocrinol.* 2000; Feb 25; 160 (1-2):1-9.
103. Van Rossum CT, Hoebee B, van Baak MA, Mars M, Saris WH, Seidell JC. Genetic variation in the leptin receptor gene, leptin, and

- weight gain in young Dutch adults. *Obes Res.* 2003; Mar; 11(3):377-86.
104. Victor RG, Pryor SL, Secher NH, Mitchell JH. Effects of partial neuromuscular blockade on sympathetic nerve response to static exercise in humans. *Circ. Res.* 1989;v.65, p.468-476.
 105. Wallin BG, Victor RG, Mark AL. Sympathetic outflow to resting muscles during static handgrip and postcontraction muscle ischemia. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 1989; v.256, p.H105-10.
 106. Wallin BG. Assessment of sympathetic mechanisms from recordings of postganglionic efferent nerve traffic. In: HAINSWORTH, E.; MARK, A.L. Cardiovascular reflex control in health and disease. *Saunders*, 1993.p.137-64,
 107. Wauters M, Mertens I, Rankinen T, Chagnon M, Bouchard C, Van Gaal L. Leptin receptor gene polymorphisms are associated with insulin in obese women with impaired glucose tolerance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; Jul;86(7):3227-32.
 108. Wauters M, Mertens I, Van Gaal L, Bouchard C. Association between leptin receptor gene polymorphisms and obesity related phenotypes in obese women. *International Journal of Obesity.*1999; 23:S33.

109. Weinstock RS, Daí H, Wadden T. Diet and exercise in treatment of obesity. *Arch Intern Med*. 1998; 158:2477-83.
110. White MF, Yenush L. The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin and cytokine action. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1998; 228:179-208.
111. WHO – World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. WHO technical report series 894. Geneva. 101-155, 2000.
112. WHO. Expert Committee on Physical Status. (Technical Report Series, n 854). The use and interpretation of anthropometry: report of a WHO *expert committee*. 1995. Geneva: WHO.
113. Woo HY, Park H, Ki CS, Park YL, Bae WG. Relationships among serum leptin, leptin receptor gene polymorphisms, and breast cancer in Korea. *Cancer Lett*. 2006; Jun 8;237(1):137-42. Epub 2005 Jul 11.
114. Yiannakouris N, Yannakoulia M, Melistas L, Chan JL, Klimis-Zacas D, Mantzoros CS. The Q223R polymorphism of the leptin receptor gene is significantly associated with obesity and predicts a small percentage of body weight and body composition variability. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; Sep; 86(9):4434-9.

115. Zhang F and Basinski MB. Crystal structure of the obese protein leptin-E100, *Nature* 387 (6629), 1997; pp. 206–209.

9. Anexos

9.1. Comissão de ética

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 **1209/09**, intitulado: **"INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMO DO RECEPTOR DE LEPTINA E O IMPACTO DA DIETA E TREINAMENTO FÍSICO SOBRE AS VARIÁVEIS ANTROPOMÉTRICAS METABÓLICAS, NEURO VASCULARES EM MULHERES OBESAS"**, apresentado pelo Departamento de **CLÍNICA MÉDICA**.

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: **DRA. SANDRA MARA FERREIRA VILLARES**

Pesquisador (a) Executante: **ALEXANDRE GALVÃO DA SILVA**

CAPPesq, 17 de Dezembro de 2009.

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa