SOPHIE MARIE MICHELE DERAM

**Influência dos polimorfismos do gene da Perilipina1 (*PLIN1*)
no risco de Síndrome Metabólica e na perda de peso
em crianças e adolescentes obesos**

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

Programa de Endocrinologia

Orientadora: 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

Deram, Sophie Marie Michele

Influência dos polimorfismos do gene da Perilipina1 (*PLIN1*) no risco de Síndrome Metabólica e na perda de peso em crianças e adolescentes obesos / Sophie Marie Michele Deram. -- São Paulo, 2010.

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

Orientadora: Sandra Mara Ferreira Villares.

Descritores: 1.Polimorfismo (Genética) 2.Perilipina 3.Obesidade 4.Criança
5.Perda de peso 6.Síndrome X metabólica

USP/FM/DBD-297/10

Este trabalho 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 Infantil da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Apoio: CAPES e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) nº 2009/08472-3.

A Pierre, meu querido marido, por todo o seu amor, sua dedicação e compreensão. Enfim, por sua participação em todos os instantes mais importantes da minha vida.

Aos meus queridos filhos, Paul, Audrey, Victor e Emilie, por tudo o que eles representam para mim: puro orgulho de tê-los e a força que eles me dão todos os dias.

Hoje, sou quem sou, em grande parte, graças a eles.

AGRADECIMENTOS

A conclusão desta tese em português representa uma grande conquista, um momento de realização profissional e pessoal. Agradeço a todas as pessoas que me ajudaram, tornando o meu caminho mais fácil e repleto de alegria:

À minha orientadora, Dra. Sandra Villares, por sua contribuição inestimável em todas as etapas de realização deste trabalho. Sem o seu incentivo, eu não teria revalidado o meu diploma francês ou ousado doutorar em português. Considero que este período de aprendizado, no qual tive a honra de ser sua aluna, foi uma oportunidade única e decisiva em minha vida, tanto profissional quanto pessoal. Sua capacidade de motivar e resolver objetivamente cada problema contribuiu para que eu fosse capaz de pesquisar além do óbvio. Agradeço primeiramente a oportunidade de realizar este estudo. Agradeço ainda a companhia, as dicas e os ensinamentos nesses anos de convivência. Obrigada por sua amizade.

Ao Prof. Jose Ordovas da Tufts University, em Boston, por ter esta qualidade rara no mundo dos pesquisadores que é a abertura total. Agradeço pelo convite para realizar minha pesquisa em seu laboratório sem nunca pedir nada em troca. Minha estadia com você e sua equipe ajudou-me muito a pesquisar a fundo os resultados da genotipagem. Apreendi muito com seus alunos, treinados com rigor e espírito de ajuda mútua, principalmente Pablo Perez-Martinez. Obrigada pela ajuda no artigo que representou uma grande vitória. Fiquei muito orgulhosa de trabalhar com um dos pioneiros da nutrigenômica!

A Bel e Eli, a dupla mágica de nosso laboratório! Vocês são as almas de nosso grupo de obesidade infantil. Muito obrigada pela ajuda, amizade e carinho nos momentos difíceis. Agradeço todos os bons momentos, as histórias e experiências trocadas. Obrigada pela ajuda e disponibilidade constantes.

À amiga Chris, colega de pós-graduação, divertida, muito profissional e boa pesquisadora, por sua pronta disponibilidade e sua disposição em ajudar sempre. Obrigada.

Às amigas nutris do grupo, Mariana e Thais, cujo excelente profissionalismo e dedicação ao doloroso problema da obesidade infantil somou-se a bons momentos de risadas. Vocês realmente entendem a grande importância da nutrição e das imprescindíveis mudanças no estilo de vida.

A toda a equipe de alunos, incluindo Mauricio, Alexandre, Danilo, Melissa e especialmente os alunos de iniciação científica, Bárbara, Rafael e Simone, futuros grandes pesquisadores! Obrigada pela companhia e pelos bons momentos que passamos juntos.

Agradeço a todos do LIM/25, principalmente a Malu Giannella pela constante disponibilidade em responder a qualquer desafio de pesquisador. Agradecimentos especiais a Angela e Ricardo por sua ajuda no aprendizado dos primeiros conceitos da análise de biologia molecular, Ileana pelas trocas de idéias e Noriza por sempre resolver as questões burocráticas.

À minha banca de qualificação, Doutoradas Malu Giannella, Edna Nakandakare e Sandra Vivolo pelo grande momento de discussão sobre minha pesquisa e por todas as dicas que permitiram aprimorar meu trabalho. Foi para mim um momento fantástico passado com profissionais de grande qualidade!

Ao grupo de Obesidade do Dr. Alfredo Halpern e do Dr. Marcio Mancini e sua equipe por ter me recebido de braços abertos, fingindo que eu não tinha sotaque!

Ao departamento de endocrinologia da FMUSP e à Professora Berenice Bilharinho de Mendonça por ter tido a coragem de aceitar uma aluna francesa sem considerá-la como estrangeira e deixando-a a vontade no departamento. A Cida e Rosana pelo apoio e pela ajuda constantes.

Agradeço aos estudantes de medicina, às estudantes de nutrição e aos residentes do ambulatório que contribuíram para esse estudo.

Agradeço às crianças do Ambulatório de Obesidade Infantil e da comunidade que participaram deste estudo e fizeram com que meu aprendizado fosse mais rico a cada dia.

A Carmem pela ajuda na estatística, a Mônica pela ótima ajuda na revisão de meu português e o Josué na ajuda na parte da formatação.

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

Obrigada !
Un grand merci à tous!

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2^a Ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação, 2005

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

SUMÁRIO

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Símbolos

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Obesidade	1
1.1.1	Obesidade infantil	1
1.1.2	Estratégias de tratamento nutricional para a obesidade infantil	3
1.2	O tecido adiposo	5
1.2.1	Os ácidos graxos	5
1.2.2	As gotículas lipídicas no adipócito	6
1.2.3	Lipólise	8
1.3	Perilipina1	10
1.3.1	Identificação	11
1.3.2	Características da perilipina1	12
1.3.3	Estudos da ação da perilipina1	13
1.3.4	Mecanismos de Ação da perilipina1	16
1.3.5	O gene da perilipina1 (<i>PLIN1</i>)	21
1.3.6	Polimorfismos da perilipina1	23
2	OBJETIVOS	28
3	MÉTODOS	30
3.1	Protocolo do estudo	31
3.2	População do estudo	31
3.3	Descrição da intervenção nos CAO	32
3.4	Avaliação do consumo alimentar	33
3.5	Avaliação do estado nutricional	34
3.5.1	Parâmetros Antropométricos:	34
3.5.2	Análise da Composição Corporal pelo Método de Bioimpedância ...	36
3.6	Métodos laboratoriais	36
3.6.1	Dosagem de glicemia (mg/dL)	36
3.6.2	Dosagem de insulina (mU/L)	37
3.6.3	Dosagem de ácido úrico (mg/dL)	37
3.6.4	Avaliação dos lipídios plasmáticos:	38
3.6.5	Adiponectina (µg/mL)	39
3.6.6	Leptina (ng/mL)	39

3.7	Avaliação das variáveis metabólicas	39
3.7.1	Avaliação da resistência à insulina	39
3.7.2	Teste oral de tolerância à glicose: TOTG	40
3.7.3	Avaliação da Síndrome Metabólica (SM)	40
3.8	Avaliação da pressão arterial	41
3.9	Análise genética	42
3.9.1	Extração do DNA – procedimento com sal (“Salting Out”)	42
3.9.2	Genotipagem por método TaqMan®	43
3.10	Análise estatística	46
4	RESULTADOS	47
4.1	Resultados da população geral do estudo	49
4.1.1	Resultados iniciais	49
4.1.2	Resultados do grupo obeso após intervenção	51
4.2	Genotipagem	52
4.2.1	Genotipagem do grupo eutrófico	52
4.2.2	Frequência dos alelos na população obesa	53
4.2.3	Desequilíbrio de ligação	53
4.3	Resultados por polimorfismos na fase inicial:	56
4.3.1	Associações entre os SNPs e dados iniciais das CAO	56
	Teste oral de tolerância à glicose	61
4.4	Resultados após intervenção: Associações entre os SNPs após 20 semanas ...	62
4.5	Análise de haplótipos	64
4.5.1	Resultados no Basal por haplótipos do <i>PLIN4</i> */ <i>PLIN6</i> *	67
4.5.2	Resultados após intervenção por haplótipos <i>PLIN4</i> */ <i>PLIN6</i> *	69
5	DISCUSSÃO	71
6	CONCLUSÃO	80
7	ANEXOS	82
8	REFERÊNCIAS	97

LISTAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AG	Ácidos graxos
AGL	Ácidos graxos livres
AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclico
AMPK	proteína quinase AMP-ativada
ATGL	Lipase adipose triglicerídeos
ATP	Adenosina trifosfato
ATPIII	Adult Treatment Panel III
AUC	área sob a curva
CA	Circunferência abdominal
CAE	Crianças e adolescentes eutróficos
CAO	Crianças e adolescentes obesos
CDC	Center for Disease Control and Prevention
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
CGI-58	Comparative Gene Identification-58
CT	Colesterol total
DG	Diglicerídeos
DM2	Diabetes mellitus do tipo 2
DNA	ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EUA	Estados Unidos da America
GEB	Gasto energético basal
GET	Gasto Energético Total
GJA	Glicemia de jejum alterada
HAS	Hipertensão
HDL	lipoproteína de alta densidade

HDLC	Lipoproteína de alta densidade
HOMA	Homeostasis Model Assesment
HOMA-IR	Homeostasis Model Assesment de resistência à insulina
HR	Risco relativo
HSL	Lipase hormônio sensível
IC	Intervalo de Confiança
IDF	Federação Internacional de Diabetes
IMC	Índice de Massa Corpórea
LD	Desequilíbrio de ligação
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LDLC	Lipoproteína de baixa densidade
MG	Monoglicerídeos
MG%	percentual de Massa Gorda
MGL	Lipase monoglicerídeos
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial Diastólica
PAS	Pressão arterial Sistólica
PAT	Domínio Perilipina Adipofilina Tip-47
PCR	Reação de Polimerização em cadeia
PKA	Proteína quinase A
PLIN1	Perilipina1, perilipina
<i>PLIN1</i>	Gene da perilipina1
<i>PLIN1*</i>	Polimorfismo: rs2289487 (6209 T>C)
PLIN1a	Perilipina Adipofilina Tip-47
PLIN1b	Perilipina B
PLIN1c	Perlipina C

PLIN2	Perilipina2: adipofilina
PLIN3	Perilipina3: TIP47
PLIN4	Perilipina4: S3-12
<i>PLIN4*</i>	Polimorfismo: rs894160 (11482 G>A)
PLIN5	Perilipina5: OXPAT
<i>PLIN5*</i>	Polimorfismo: rs2304795 (13041 A>G)
<i>PLIN6*</i>	Polimorfismo: rs1052700 (14995 A>T)
RCA	Registro do consumo alimentar
RNA_m	Ácido Ribonucléico mensageiro
SM	Síndrome Metabólica
SNP	polimorfismo em um único nucleotídeo
TG	Triglicerídeos
TGD	Tolerância à glicose diminuída
TNFα	Fator de Necrose Tumoral alfa
TOTG	Teste Oral Tolerância a Glicose
USA	Estados Unidos da America
VR	Valor de referência
VR	Valor de referência
ZIMC	Z-escore do IMC

U/mL	unidades por mililitro
ng/mL	nanogramas por mililitro
ng/dL	nanogramas por decilitro
μM	micromolar
μg/dL	microgramas por decilitro
μg/mL	microgramas por mililitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Estruturas das proteínas da família da perilipina1 PAT do camundongo	7
Figura 2-	Regulação da lipólise nas células humanas de gordura.....	10
Figura 3-	Cultura de adipócitos 3T3-L1 de camundongos com a técnica de imunofluorescência	11
Figura 4-	Hipótese da estrutura da perilipina1 A e de sua associação com a gotícula lipídica do adipócito	13
Figura 5-	Camundongos <i>Plin^{-/-}</i> geneticamente obesos (dB/dB) ou submetidos à dieta hipercalórica são resistentes à obesidade	15
Figura 6-	Via simplificada da lipólise estimulada	17
Figura 7-	Último modelo proposto para descrever o mecanismo molecular da lipólise	18
Figura 8-	Modificações das gotículas lipídicas nos adipócitos 3T3-L1.....	20
Figura 9-	O gene da perilipina1 (PLIN1).....	22
Figura 10-	O mapa de transcrição do gene da perilipina1 (PLIN1) no camundongo.	23
Figura 11-	Nomenclatura dos polimorfismos da perilipina1 (PLIN1).....	24
Figura 12-	Ensaio de genotipagem com Taqman®.....	44
Figura 13-	Exemplo de resultado obtido pelo método Taqman®, leitura por fluorescência.....	45
Figura 14-	Gráfico ilustrativo do resultado obtido após cálculo do desequilíbrio de ligação entre os SNPs <i>PLIN1*</i> , <i>PLIN4*</i> , <i>PLIN5*</i> e <i>PLIN6*</i>	55
Figura 15-	Arquitetura do gene da perilipina1	56
Figura 16-	Valores de Glicemia e de insulinemia durante o Teste Oral de Tolerância à Glicose dos pacientes portadores do genótipo <i>PLIN4*(G>A)</i>	61

Figura 17- Valores de Insulinemia durante o Teste Oral de Tolerância à Glicose dos pacientes portadores do genótipo do <i>PLIN4*</i> (G>A)	62
Figura 18- Prevalência dos grupos de haplótipos <i>PLIN4*/PLIN6*</i>	65
Figura 19- Média de HDL-C e TG por haplótipo <i>PLIN4*/PLIN6*</i>	67
Figura 20- Média de HOMA-IR por haplótipo <i>PLIN4*/PLIN6*</i>	67
Figura 21- Prevalência de SM por haplótipo <i>PLIN4*/PLIN6*</i>	69
Figura 22- Perda de peso nos grupos de haplótipos <i>PLIN4*/PLIN6*</i>	69
Figura 23- Perda de ZIMC nos grupos de haplótipos <i>PLIN4*/PLIN6*</i>	70
Figura 24- HOMA-IR após intervenção nos grupos de haplótipos <i>PLIN4*/PLIN6*</i>	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Nova nomenclatura ³⁷ (ser humano) para as proteínas da família PAT das gotas de lipídeos dos adipócitos.....	8
Tabela 2-	Os 8 estudos mais importantes de associações com polimorfismos da perilipina1.....	27
Tabela 3-	Sequências para amplificações dos SNPs <i>PLIN1*</i> , <i>PLIN4*</i> e <i>PLIN6*</i>	46
Tabela 4-	Características clínicas e laboratoriais das amostras de crianças e adolescentes eutróficos (CAE) e obesos (CAO)	49
Tabela 5-	Frequências (%) dos componentes de Síndrome Metabólica (critérios do IDF) na amostra de crianças e adolescentes eutróficos e obesos.....	50
Tabela 6-	Características clínicas e laboratoriais da amostra de crianças e adolescentes obesos no basal e após 5 meses de intervenção, cálculo da diferença (Inicial – final).....	51
Tabela 7-	Distribuições dos alelos e genotipagens dos SNPs da perilipina1 <i>PLIN1</i> em crianças e adolescentes eutróficos	52
Tabela 8-	Distribuições dos alelos e genotipagens dos SNPs da perilipina1 <i>PLIN1</i> em crianças e adolescentes obesos	53
Tabela 9-	Relação entre os SNPs <i>PLIN4*</i> e <i>PLIN6*</i> e parâmetros antropométricos, perfil metabólico e consumo alimentar no basal em CAO (N=234).....	57
Tabela 10-	Relações entre o polimorfismo <i>PLIN1*</i> e parâmetros antropométricos, perfil metabólico e consumo alimentar no basal no grupo de CAO (N=234)	58
Tabela 11-	Frequência (%) dos componentes de SM em crianças e adolescentes obesos segundo a presença dos polimorfismos <i>PLIN4*</i> e <i>PLIN6*</i>	59
Tabela 12-	Frequência (%) dos componentes da SM em crianças e adolescentes obesos, segundo a presença dos polimorfismos <i>PLIN1*</i>	60

Tabela 13- Relação entre os haplótipos <i>PLIN4</i> */ <i>PLIN6</i> * e parâmetros antropométricos, perfil metabólico e consumo alimentar após 20 semanas de intervenção dos 234 CAO	63
Tabela 14- Grupos de haplótipos segundo os 2 SNPs <i>PLIN4</i> *(11482G/A)/ <i>PLIN6</i> *(14995A/T) dos 234 CAO	64
Tabela 15- Relação entre os haplótipos <i>PLIN4</i> *(11482G>A)/ <i>PLIN6</i> *(14995A>T) e os parâmetros antropométricos e perfil metabólico no basal e após intervenção de CAO	66
Tabela 16- Frequência (%) dos componentes da SM em crianças e adolescentes obesos segundo a presença dos haplótipos <i>PLIN4</i> * / <i>PLIN6</i> *	68

RESUMO

RESUMO

Deram SMM. *Influência dos polimorfismos do gene da Perilipina 1 (PLIN1) no risco de Síndrome Metabólica e na perda de peso em crianças e adolescentes obesos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 108p.

Introdução: Perilipina, a proteína mais abundante no adipócito, tem um papel importante na regulação da lipólise intracelular. Polimorfismos genéticos no locus da perilipina 1 (*PLIN1*) foram estudados e associados à obesidade e aos riscos de alterações dos fatores da síndrome metabólica (SM) em populações diferentes. **Objetivo:** Avaliamos crianças e adolescentes obesos (CAO) antes e após tratamento multidisciplinar com reeducação alimentar e estímulo à prática de atividade física, por um período de 20 semanas. Estudamos a associação entre SNPs (Polimorfismos de um Único Nucleotídeo) e dados antropométricos e metabólicos, como também a resposta à perda de peso após a intervenção. **Metodologia:** Foram avaliados 234 CAO (idade $10,6 \pm 1,3$ anos) (IMC $30,4 \pm 4,5$ kg/m²; ZIMC $2,31 \pm 0,28$). As genotipagens dos SNPs *PLIN1** 6209T>C, *PLIN4** 11482G>A e *PLIN6** 14995A>T foram realizadas através de PCR em Tempo Real. A ingestão alimentar foi calculada pelo método de registro da ingestão de três dias. O SM foi avaliado pelos critérios do IDF. **Resultados:** As frequências dos alelos *PLIN1**, 0,48; *PLIN4**, 0,30 e *PLIN6**, 0,26 foram semelhantes às outras populações; *PLIN1** e *PLIN4** mostraram um desequilíbrio de ligação (DL) ($D' = 0,999$, $r = 0,67$). Antes da intervenção, não houve diferenças nas medidas antropométricas, porém a presença do alelo A no *PLIN4* foi associada a triglicérides mais elevados (111 ± 49 x $93,9 \pm 42,5$ mg/dL $P = 0,003$), HDL-C mais baixo (40 ± 9 x $43,6 \pm 10$ mg/dL $P = 0,003$) e HOMA-IR maior ($4,0 \pm 2,3$ x $3,5 \pm 2,1$ $P = 0,015$). A presença do alelo A no *PLIN4** associou-se a um risco relativo maior de ter SM (ajustado por idade e sexo: 2,4 (95% Intervalo de confiança: 1,1-4,9) para heterozigoto e 3,5 (95% Intervalo de confiança: 1,2-9,9) para homozigoto. Os resultados do *PLIN1** foram semelhantes devido ao DL. Após intervenção, a presença do alelo T no *PLIN6** foi associada a uma resposta melhor na perda de peso ($3,3 \pm 3,7$ x $1,9 \pm 3,5$ kg; $P = 0,002$) e uma maior perda de ZIMC ($0,23 \pm 0,18$ x $0,18 \pm 0,15$; $P = 0,01$). **Discussão:** Este estudo mostrou a influência da presença do alelo A no *PLIN4** sobre o risco de ter SM em crianças e adolescentes obesos similares em termos antropométricos e de ingestão alimentar. Foi mostrado também que a presença do alelo T no *PLIN6** influencia uma melhor resposta de perda de peso durante intervenção multidisciplinar. **Conclusões:** Os resultados sugerem que os polimorfismos da Perilipina têm influência nas co-morbidades associadas à obesidade e podem ajudar nas estratégias aplicadas no tratamento multidisciplinar em crianças e adolescentes obesos.

Descritores: 1.Polimorfismos (Genética) 2.Perilipina 3.Obesidade 4.Crianças 5.Perda de peso 6.Síndrome X Metabólica

SUMMARY

SUMMARY

Deram SMM. *Effects of Perilipin1 (PLIN1) gene variation on Metabolic Syndrome risk and weight loss in obese children and adolescents* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2010. 108p.

Introduction: Genetic polymorphisms at the perilipin1 (*PLIN1*) locus have been investigated for their potential utility as markers for obesity and metabolic syndrome (MS). We examined in obese children and adolescents (OCA) aged 7–14 yr the association of single-nucleotide polymorphisms (SNP) at the *PLIN1* locus with anthropometric, metabolic traits, and weight loss after 20-wk multidisciplinary behavioral and nutritional treatment without medication. **Design:** A total of 234 OCA (body mass index (BMI) = 30.4 ± 4.5 kg/m²; BMI Z-score = 2.31 ± 0.28) were evaluated at baseline and after intervention. We genotyped four SNPs (*PLIN1** 6209T>C, *PLIN4** 11482G>A and *PLIN6** 14995A>T). **Results:** Allele frequencies were similar to other populations, *PLIN1** and *PLIN4** were in linkage disequilibrium ($D' = 0.999$; $P = 0.001$). At baseline, no anthropometric differences were observed, but minor allele A at *PLIN4** was associated with higher triglycerides (111 ± 49 vs. 94 ± 42 mg/dl; $P = 0.003$), lower high-density lipoprotein cholesterol (40 ± 9 vs. 44 ± 10 mg/dl; $P = 0.003$) and higher homeostasis model assessment for insulin resistance (4.0 ± 2.3 vs. 3.5 ± 2.1 ; $P = 0.015$). Minor allele A at *PLIN4** was associated with MS risk (age and sex adjusted) hazard ratio 2.4 (95% confidence interval = 1.1–4.9) for genotype GA and 3.5 (95% confidence interval = 1.2–9.9) for AA. After intervention, subjects carrying minor allele T at *PLIN6** had increased weight loss (3.3 ± 3.7 vs. 1.9 ± 3.4 kg; $P = 0.002$) and increased loss of the BMI Z-score (0.23 ± 0.18 vs. 0.18 ± 0.15 ; $P = 0.01$). Due to group size, risk of by-chance findings cannot be excluded. **Conclusion:** The minor A allele at *PLIN4** was associated with higher risk of MS at baseline, whereas the *PLIN6** SNP was associated with better weight loss, suggesting that these polymorphisms may predict outcome strategies based on multidisciplinary treatment for OCA.

Descriptors: 1.Polymorphisms (Genetics) 2.Perilipin 3.Obesity 4.Children 5.Weight loss 6.Metabolic x Syndrome

1 INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade

Em 2002, a Organização Mundial de Saúde (OMS) adotou uma nova definição para Obesidade: “Um excesso de gordura corporal acumulada no tecido adiposo com implicações para a saúde”. A obesidade é uma doença crônica que se caracteriza por excesso de armazenamento de triglicerídeos no tecido adiposo branco¹. Sua prevalência está aumentando em proporções epidêmicas, tanto em países desenvolvidos quanto naqueles em desenvolvimento². Ela representa o resultado de um balanço energético positivo cuja patogênese não está completamente elucidada. Fatores comportamentais, culturais e biológicos que contribuem para o balanço energético e a regulação dos estoques de energia do corpo são influenciados por uma susceptibilidade individual e por fatores hormonais, culturais e genéticos³.

1.1.1 Obesidade infantil

A prevalência da obesidade em crianças e adolescentes está aumentando no mundo inteiro, inclusive no Brasil. Dados brasileiros indicam que um processo de transição nutricional vem ocorrendo nas últimas três décadas^{4,5}. Ao comparar os dados do Estudo Nacional da Despesa Familiar (ENDEF), realizado entre 1974 e 1975, com os dados da Pesquisa sobre Padrões de Vida (PPV), realizada entre 1996 e 1997, verificou-se que a prevalência de sobrepeso e obesidade em crianças e

adolescentes de 6 a 18 anos triplicou, passando de 4,1% para 13,9%⁶. Neste mesmo estudo, concluiu-se que as taxas de sobrepeso no país aumentam por volta de 0,5% ao ano, enquanto as taxas de subnutrição diminuem aproximadamente 0,3% ao ano. A avaliação de crianças brasileiras conduzida pelo IBGE (Instituto Brasileiro de Pesquisa e Estatística) na POF (Pesquisa Brasileira do Orçamento Familiar) 2003-2002 (2006) indica que, na faixa etária de 10 a 19 anos, a frequência de excesso de peso é de 16,7%⁷. Tal frequência é ainda mais importante para os pré-adolescentes, entre 10 e 11 anos, chegando a 22%. O mesmo estudo aponta que a obesidade acomete 2,9% das meninas e 1,8% dos meninos no Brasil. Em ambos os sexos, a frequência da obesidade é maior nas regiões sul, sudeste e centro-oeste e, dentro de cada região, tende a ser maior nos centros urbanos do que no meio rural.

Uma avaliação recente de crianças e adolescentes de 10 a 15 anos residentes na cidade de São Paulo observou uma prevalência de sobrepeso de 23% nas escolas públicas e 33% nas escolas privadas. A prevalência de obesidade foi de 8,2% e 7,8% para meninas e de 9,9% e 17,8% para meninos nas escolas públicas e privadas, respectivamente⁸.

Atualmente, a obesidade infantil representa um problema de saúde pública devido ao impacto não somente na saúde, mas também na integração social do futuro adulto⁹.

A obesidade aumenta o risco de doenças crônicas como diabetes mellitus do tipo 2 (DM2), doenças cardiovasculares, hipertensão arterial, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, artrite, asma e algumas formas de câncer¹⁰. Na infância, o sobrepeso e a obesidade foram associados à dislipidemia, hipertensão arterial, resistência à insulina e síndrome metabólica, além de alterações psicológicas como depressão¹¹.

1.1.2 Estratégias de tratamento nutricional para a obesidade infantil

As estratégias de tratamento da obesidade e do sobrepeso infantil são alvos de várias pesquisas e diretrizes^{12,13}. Apesar de não haver um tratamento considerado padrão, pela inconclusividade derivada de problemas metodológicos frequentemente encontrados nos trabalhos disponíveis, as recomendações atuais para o tratamento clínico do excesso de peso em crianças e adolescentes baseiam-se no controle de ganho ponderal e no tratamento das co-morbidades eventualmente encontradas¹⁴.

De maneira geral, o tratamento visa a adequação do balanço energético, a melhora do hábito alimentar, a modificação comportamental e o envolvimento familiar no processo de mudança¹⁵.

Estudos indicam que, para se obter resultados mais seguros e duradouros, o tratamento da obesidade deve estar inserido em um contexto de modificação do estilo de vida¹⁶.

É essencial que o processo de reeducação alimentar no tratamento da criança obesa seja extensivo a toda a família. Profissional, paciente e cuidador devem, ainda, estar cientes de que este é um processo de aprendizagem que se dá em longo prazo, com o objetivo de incorporar novos hábitos alimentares¹⁷.

Com relação à recomendação de energia, sabe-se que é desejável um balanço negativo para que se tenha consumo das reservas. O Gasto Energético Total (GET) pode ser dividido em 3 componentes principais: gasto energético basal (ou taxa metabólica de repouso), efeito térmico dos alimentos e atividade física. Conhecendo-se o GET, torna-se possível quantificar as necessidades nutricionais do indivíduo para alcançar o

crescimento esperado e adequar o peso e a composição corporal, sendo, portanto, um parâmetro preciso para aperfeiçoar a terapia nutricional¹⁸.

Para determinar o gasto energético basal, é possível utilizar algumas estratégias: estimativa do gasto por meio de avaliação do consumo alimentar, calorimetria direta ou indireta, equações preditivas e – o método mais acurado de mensuração do gasto energético total em indivíduos fora de confinamento – a aferição por meio de água duplamente marcada¹⁹.

A adequação do consumo de nutrientes é também um objetivo do aconselhamento nutricional. Vale lembrar que, sendo a obesidade crescente, dietas da moda emergem a cada dia, e seus seguidores nem sempre alcançam resultados satisfatórios²⁰. Enquanto algumas delas baseiam-se em diretrizes de órgãos competentes, seguindo recomendações adequadas de diminuição de porções e consumo de energia, outras restringem grupos alimentares e alteram o balanço de macronutrientes, entre outras teorias. No meio acadêmico, há muita discussão acerca dos diversos tipos de dieta e uma extensa produção científica que pretende avaliar seus efeitos para a saúde²¹. Todavia, as evidências relativas a benefícios, eficácia e sustentabilidade são bastante limitadas e controversas²².

A recomendação da OMS e do Ministério da Saúde é de que, do total de calorias da dieta, 10 a 15% devem provir de proteínas, 55 a 75%, de carboidratos e 15 a 30% de gorduras^{23,24}. A diversidade dietética fundamenta o conceito de alimentação saudável, não devendo ser banido nenhum grupo de alimento.

Outras intervenções, como a utilização de medicamentos ou a cirurgia bariátrica em adolescentes, devem estar restritas a centros especializados.

1.2 O tecido adiposo

Até recentemente, os adipócitos eram considerados como células cuja função seria apenas a de servir de depósito passivo de gordura, levando ao desenvolvimento da obesidade. Atualmente, os adipócitos são considerados como um componente crítico no controle do metabolismo e dos órgãos endócrinos. É aceito que o tecido adiposo serve de local para estoque de triglicerídeos (TG) e liberação de ácidos graxos livres em resposta às necessidades energéticas corporais, além de secretar grande número de citocinas²⁵. Dessa forma, o tecido adiposo controla o metabolismo energético por meio da secreção de moléculas chamadas adipocitocinas que sinalizam e regulam as funções do próprio tecido adiposo^{26,27}.

Os mecanismos de controle do armazenamento e da liberação dos TG no compartimento de lipídeos, embora complexos e mal compreendidos, são cruciais para entender o metabolismo energético e o peso corporal^{28,29}. Além disso, anormalidades no armazenamento de TG ou na lipólise estão associadas à resistência à insulina e ao DM2³⁰.

O tecido adiposo tem um papel central, tornando-se assim alvo de estudo para identificação de genes candidatos ao desenvolvimento de obesidade.

1.2.1 Os ácidos graxos

Os ácidos graxos não esterificados (AG) são biomoléculas com múltiplas funções. São reguladores de expressão gênica e a base de todos os tipos de lipídeos, atuando de maneira direta ou indireta como ligantes para receptores nucleares,

podem afetar a função protéica por meio de acilação pós-transcricional e, sobretudo, servem de substrato energético para a produção de ATP.

Entretanto, uma concentração excessiva de AG na célula pode ter ação tóxica para células e tecidos, provocando um distúrbio do equilíbrio ácido-básico, atuando como detergentes e danificando as membranas das células^{31,32}. Para evitar essa toxicidade, os AG são esterificados com glicerol em TG e armazenados em gotículas na maioria das células do corpo e, essencialmente, nos adipócitos. Este armazenamento do excesso de AG na célula sob forma de TG funciona como um tampão para prevenir lipotoxicidade e concentração excessiva de ácidos graxos livres (AGL). O tecido adiposo é o órgão mais eficiente para controlar o excesso pós-prandial de AG. Dependendo da necessidade, ocorre lipólise e as TG hidrolase (lipases) atuam nas gotículas lipídicas, liberando os AG.

1.2.2 As gotículas lipídicas no adipócito

As gotículas lipídicas no tecido adiposo constituem-se de TG e éster de colesterol recobertos por uma camada única de fosfolipídeos e proteínas que têm funções reguladoras e enzimáticas³³.

Essas proteínas têm como característica a presença de uma sequência de aminoácidos similar e conservada denominada domínio PAT³⁴ (Figura 1). PAT é o acrônimo das proteínas **P**erilipina1, **A**dipofilina (ADPR “adipocyte differentiation-related protein”) e **TIP**-47 “Tail-interacting protein of 47kDa”, que são as proteínas mais abundantes encontradas na gotícula lipídica³⁵.

Figura 1- Estruturas das proteínas da família da perilipina1 PAT do camundongo (Brasaemle et al., 2008). As partes coloridas representam as sequências conservadas. Em verde, a parte aminoterminal (100 aminoácidos) que é a mais conservada. A perilipina1 é a única que tem os 6 sítios serina. (aa: aminoácidos)

Devido ao interesse recente em compreender a dinâmica da lipólise nas gotículas de gordura, foram descritas outras proteínas que contêm o domínio PAT, como S3-12, OXPAT “oxidative tissues-enriched PAT protein ou MLDP-myocardial lipid droplet protein” e LSDP5 “lipid storage protein 5”³⁶.

Mudança da nomenclatura das proteínas da família PAT

Em março de 2010, Kimmel et al.³⁷ publicaram uma nova nomenclatura simplificada para as proteínas ligadas às gotículas de lipídeos, sendo designado o nome PERILIPIN para as proteínas da família PAT. Cada tipo de proteína humana da família

PAT está numerado de maneira sequencial com os símbolos do gene *PLIN* (Tabela 1).

As proteínas são representadas com letras maiúsculas não itálicas (PLIN).

Tabela 1- Nova nomenclatura³⁷ (ser humano) para as proteínas da família PAT das gotas de lipídeos dos adipócitos

Nova nomenclatura dos genes da família PAT	Nova nomenclatura das proteínas da família PAT	Nomenclatura anterior das proteínas da família PAT	Identificação no banco de dados Entrez GeneID http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez	Localização nos cromossomos
<i>PLIN1</i>	Perilipin 1	Perilipin, PERI, PLIN	5346	15q26
<i>PLIN2</i>	Perilipin 2	ADRP, ADFP, adipophilin	123	9p22.1
<i>PLIN3</i>	Perilipin 3	TIP47, PP17, M6PRBP1	10226	19p13.3
<i>PLIN4</i>	Perilipin 4	S3-12	729359	19p13.3
<i>PLIN5</i>	Perilipin 5	PATI, LSDP5, OXPAT, MLDP	440503	19p13.3

1.2.3 Lipólise

A lipólise é importante na regulação da homeostase energética. Os compartimentos de gordura, que compreendem 95% do volume total do adipócito, são compostos principalmente por TG. Estes são hidrolisados em diglicerídeos (DG), monoglicerídeos (MG), glicerol e ácidos graxos principalmente pelas lipases hormônio-sensíveis (HSL) e “adipose triglyceride lipase” (ATGL)³⁸. A última fase na lipólise é a hidrólise pela MGL (“monoglyceride lipase”) dos monoglicerídeos (MG) em glicerol e AG. As HSL e ATGL são reguladas por hormônios, não tendo ainda sido descrito nenhum estímulo hormonal para a ativação da MGL. “In vitro”, foi demonstrado que a MGL é necessária para degradação total do TG³⁹.

Regulação da lipólise

Há uma variabilidade diária dos níveis de AG e glicerol circulante decorrente da ação hormonal e outros reguladores na lipólise na gota de gordura. A figura 2 representa as principais vias reguladoras da lipólise³⁸.

Hormônios, catecolaminas, peptídeos natriuréticos e insulina têm efeito marcante na lipólise; o hormônio de crescimento tem um efeito leve e em longo prazo. São fatores igualmente importantes a regulação autócrina devido a substâncias produzidas nos adipócitos e/ou células vasculares do estroma no tecido adiposo (prostaglandinas, adenosina e citocinas, particularmente o fator de necrose tumoral (TNF α) e também o sexo, a idade, a atividade física, a nutrição, a localização da gordura e as variantes genéticas.

Principal via reguladora da lipólise:

As catecolaminas (noradrenalina e adrenalina) influenciam a lipólise quando se ligam aos diferentes tipos de receptores adrenérgicos na superfície da célula adiposa⁴⁰. Estes receptores estão ligados às proteínas G que regulam a adenilciclase na membrana da célula. Após estímulo das catecolaminas, os receptores adrenérgicos acoplam-se à proteína G e ativam o adenilciclase, levando a um aumento da produção de AMP cíclico, o qual estimula o complexo da proteína quinase A (PKA) (Figura 2).

Figura 2- Regulação da lipólise nas células humanas de gordura (Arner, 2005)

β₁,β₂,β₃, receptores adrenérgicos beta1,2,3; receptores adrenérgicos α_{2A}, α_{2A}, proteínas G; AC, adenil ciclase; cAMP, AMP cíclica; cGMP, GMP cíclico; NPRA, receptor peptídeo natriurético A; GC, guanil ciclase; PKG, proteína quinase cGMP-dependente; PKA, proteína quinase A; TNFα, fator de necrose tumoral alfa; p44/42 e vias JNK, MAP quinase; TNFR1, receptor 1 do TNFα; ATGL, lipase triglicerídeos específica ao tecido adiposo; HSL, lipase hormônio-sensível; MGL, lipase de monoglicerídeos; TG, triglicerídeos; DG, diglicerídeos; MG, monoglicerídeos; AG, ácido graxo; IR, receptor de insulina; IRS-1,2; PI3K, fosfadilil inositol 3 quinase; PDE3, fosfodiesterase 3.

1.3 Perilipina1

A perilipina1 é uma fosfoproteína que reveste especificamente os compartimentos de lipídeos nos adipócitos⁴¹ (Figura 3). Foi observada no tecido adiposo visceral e subcutâneo, nas células esteroideogênicas (células da glândula adrenal, testículos e ovários), no tecido muscular, na placa de ateroma e em células hepáticas^{42,43,44,45,46}.

Células 3T3-L1

Figura 3- Cultura de adipócitos 3T3-L1 de camundongos com a técnica de imunofluorescência (Tansey et al., 2004) . À esquerda, em vermelho, observam-se os TG. À direita, em verde, observa-se a perilipina1 na superfície das gotículas.

1.3.1 Identificação

A perilipina1 foi identificada em 1991 pelo Dr. Greenberg, da equipe do Dr. Londos⁴⁷, como sendo a proteína mais abundante no adipócito. A proteína foi evidenciada em adipócitos 3T3-L1 de camundongos. Estas células 3T3-L1 são linhas de células derivadas de células 3T3 (embriões de camundongos) usadas para a pesquisa biológica do tecido adiposo. As células 3T3-L1 têm uma morfologia semelhante aos fibroblastos que, em condições adequadas, se diferenciam em adipócitos.

No tecido adiposo, a perilipina1 localiza-se predominantemente nas gotículas grandes em adipócitos maduros, enquanto as gotículas mais jovens e pequenas contêm menor expressão de perilipina1, predominando neste tipo celular as proteínas perilipina 3 e perilipina 4⁴⁸.

1.3.2 Características da perilipina1

Em humanos, a perilipina1 possui 522 aminoácidos e a massa molecular é de 55.947 Da. A perilipina1 humana apresenta 79% de analogia com a proteína do rato⁴⁹; A sequência da perilipina1 do camundongo tem 6 sítios serina (81, 222, 276, 433, 492 e 517) que podem ser fosforilados pela PKA, mas até o momento não foram definidas as regiões mais importantes para a máxima ação da proteína. A estrutura espacial e a ligação à gotícula lipídica não estão bem definidas⁵⁰.

Algumas hipóteses foram aventadas pelo grupo do Dr. Brasaemle (Figura 4) da Universidade do New Jersey, EUA⁵¹:

A família das PERILIPINAS apresenta uma região aminoterminal similar chamada de domínio PAT. Este domínio conservado não está ligado à superfície da gotícula e, até o momento, não mostrou atividade funcional. Um segundo sítio serina (PKA “site”), denominado região “ β -strand”, tem uma ação funcional basal atuando como uma barreira para as lipases e, quando fosforilada, desloca-se da superfície da gotícula. As três regiões centrais hidrofóbicas (H1, H2 e H3) servem de ancoragem da perilipina1 na gotícula lipídica. A parte carboxiterminal também funciona como barreira à ação das lipases.

Figura 4- Hipótese da estrutura da perilipina1 A e de sua associação com a gotícula lipídica do adipócito (Garcia et al., 2004). Perilipina1 (em verde)

1.3.3 Estudos da ação da perilipina1

Em modelos de cultura de células animais, foi demonstrado que as perilipinas são reguladoras essenciais do armazenamento e da hidrólise dos TG⁵².

Quando é expressa nos pré-adipócitos 3T3-L1, a perilipina1 tem como alvo a ancoragem das gotículas lipídicas intracelulares, onde protege os TG contra a hidrólise e aumenta seu armazenamento⁵³.

Durante a lipólise estimulada pela PKA, a perilipina1 desloca-se da gotícula após sua fosforilação nos domínios amino e carboxiterminais (nos sítios serina) e otimiza a ação da HSL fosforilada^{54,55,56}.

Os estudos com modelo animal de camundongos “knockout” da perilipina1 (*Plin1*^{-/-}) observaram um aumento da lipólise basal e atenuação da lipólise estimulada pelas catecolaminas⁵⁷. Estes camundongos apresentaram um fenótipo magro (diminuição de 30% de massa gorda) e, quando foram submetidos à dieta hipercalórica, demonstraram uma resistência à obesidade em comparação com o tipo selvagem (Figura 5).

Neste mesmo experimento, os autores descrevem um “knockout” *Plin1*^{-/-} em camundongos geneticamente obesos (com deficiência da expressão do receptor da leptina *Lepr*^{dB/dB}) e confirmam a resistência à obesidade genética do “knockout” (*Lepr*^{dB/dB}/*Plin*^{-/-}) em comparação ao camundongo selvagem (*Lepr*^{dB/dB}/*Plin*^{+/+})⁵⁸.

Nesses animais, com ausência da barreira de perilipina1, foi observado um “turn-over” mais rápido dos TG no estado basal e um metabolismo basal aumentado, mas também um aumento da resistência à insulina⁵⁸. Os camundongos *Plin1*^{-/-} demonstram níveis plasmáticos elevados de leptina, insulina, glicose e TG quando comparados com os camundongos selvagens.

Figura 5- Camundongos *Plin*^{-/-} geneticamente obesos (db/db) ou submetidos à dieta hipercalórica são resistentes à obesidade (Martinez-Botas et al., 2000)

a. Massa gorda epididimal (direita) e massa gorda total (esquerda) dos grupos selvagens e *Plin*^{-/-} com dieta normal (chow) ou dieta hipercalórica (35% de gordura) durante 3,5 meses. **b.** Fotos dos camundongos Lepr^{db/db}/*Plin*^{+/+}, Lepr^{db/db}/*Plin*^{-/-}, selvagem *Plin*^{+/+} e *Plin*^{-/-}.

Um estudo recente com camundongos transgênicos que superexpressam a perilipina1 demonstrou que, quando submetidos à dieta hiperlipídica, a superexpressão de perilipina1 age como uma proteção contra a obesidade, a hipertrofia do adipócito e a intolerância à glicose⁵⁹. O mecanismo pelo qual a perilipina teria essa ação não está estabelecido. Foi observado um aumento da expressão de genes oxidativos (oxidative carnitine palmitoyltransferase1 e

3-ketoacyl-CoA thiolase B) no tecido adiposo marrom desses animais e aventa-se a hipótese de que este teria um papel de proteção contra a obesidade. Outras pesquisas estão sendo conduzidas para esclarecer o mecanismo envolvido.

Há um interesse cada vez maior na expressão da perilipina1, uma proteína que regula tanto o armazenamento quanto a liberação de AG no tecido adiposo.

Essa proteína tem um papel de controle no armazenamento dos TG dentro das gotas lipídicas contidas nos adipócitos para evitar alterações metabólicas, como a resistência à insulina, uma consequência do excesso de AG liberados pela lipólise não controlada.

1.3.4 Mecanismos de Ação da perilipina1

A perilipina1 é o principal regulador do armazenamento de gordura nos adipócitos. Ela tem ação diferente dependendo do estímulo da célula adiposa.

Em situação basal sem estímulo catecolaminérgico, denominada lipólise basal, a insulina circulante promove o armazenamento dos TG nos adipócitos. Nessa condição, a perilipina1 constitui uma barreira para a ação das lipases no adipócito e atua como protetor dos TG armazenados, limitando a lipólise e regulando a velocidade de hidrólise e a liberação de TG³⁴.

Sob estímulo catecolaminérgico (jejum ou pós-exercício físico intenso), condição denominada lipólise estimulada, a fosforilação da perilipina1 desencadeia a lipólise em sua maior amplitude.

Portanto, a perilipina1 tem uma dupla ação na gotícula lipídica: 1) é um protetor do armazenamento dos TG no estado basal e 2) após estimulação catecolaminérgica, ajuda a hidrólise máxima das lipases.

Fosforilação da perilipina1 pela PKA

A perilipina1 na célula adiposa sofre influência da PKA após sua ativação pelo AMPc. Quando não está fosforilada, serve de barreira, impedindo a ação da HSL. Após sofrer fosforilação, porém, facilita a ação da HSL (Figura 6) e ajuda a lipólise máxima⁶⁰. Ela é fosforilada em vários sítios, o que altera a associação da proteína com a superfície do compartimento, facilitando assim a ação da HSL⁶¹. Dessa maneira, a fosforilação parece deslocar a proteína da superfície da gotícula de gordura e potencializar a ação da HSL ao hidrolisar o núcleo de TG⁶².

Figura 6- Via simplificada da lipólise estimulada (Carmen G. et al., 2006)

Modelo proposto para o mecanismo molecular da lipólise

Nos últimos anos, o papel da perilipina1 foi definido como um claro regulador das duas lipases mais importantes na hidrólise dos TG do adipócito: HSL e ATGL.

Zimmerman et al.⁶³ e Brasaemle et al.³⁴ contribuíram, no final do ano de 2008, para um novo modelo no qual a perilipina1 tem o papel central de controle da lipólise em resposta ao estado nutricional. Este novo modelo, mais complexo, substitui o antigo modelo de controle da lipólise pela HSL, tendo sido acrescentadas duas novas moléculas no processo de lipólise: a lipase ATGL e o componente ativador CGI-58.

Figura 7- Último modelo proposto para descrever o mecanismo molecular da lipólise (Zimmermann et al., 2008) A perilipina1 é reguladora das atividades das duas lipases HSL e ATGL. Ela acopla-se ao ativador CGI-58 da ATGL e controla o acesso da HSL à gotícula de gordura. No estado basal, o CGI-58 está acoplado à perilipina1 e a HSL encontra-se principalmente no citosol. No estado estimulado, a fosforilação da perilipina1 pela PKA permite a liberação da CGI-58 que vai ativar a ATGL e liberar os DG após hidrolisar os TG.

A fosforilação conjunta da HSL vai translocá-la com a ajuda da perilipina1 para a gotícula de gordura e iniciar a hidrólise máxima, principalmente dos DG. A última etapa na quebra dos TG ocorre no citosol com a ajuda da MGL e permite a formação de glicerol e ácidos graxos livres.

A HSL está localizada no citosol e, após ser fosforilada, transloca-se para a superfície da gota de gordura, onde se acopla à perilipina1 fosforilada, que hidrolisa principalmente os DG. A ATGL está presente no citosol e na gotícula lipídica. Esta lipase hidrolisa principalmente os TG.

O componente ativador CGI-58 está localizado na superfície da gotícula e é ligado à perilipina1. Ele tem um papel principal de ativação da ATGL na presença de PKA. Mutações do CGI-58 causam a síndrome chamada Chanarin-Dorfman, em que ocorre um armazenamento excessivo de TG em vários tecidos⁶⁴. CGI-58 não é uma lipase, mas é um ativador essencial à atividade da ATGL.

Na fase basal da lipólise, a perilipina1, acoplada ao CGI-58, atua como uma barreira às lipases. Nessa etapa, ocorre uma baixa atividade da ATGL na gota de gordura com reduzida hidrólise dos TG. Quando há estimulação adrenérgica, a perilipina1 fosforilada libera o CGI-58 que, por sua vez, se acopla à ATGL.

Modificações das gotículas lipídicas

As gotículas lipídicas nos adipócitos sofrem uma modificação importante em resposta à estimulação beta-adrenérgica: as gotículas grandes desfragmentam-se em pequenas gotículas, espalhando-se no citosol e voltando a fundir-se após essa estimulação⁴⁸. Essa desfragmentação permite um maior acesso das lipases na hidrólise dos TG.

Figura 8- Modificações das gotículas lipídicas nos adipócitos 3T3-L1 (Brasaemle et al., 2007)

Direita: condições basais com as gotículas grandes rodeadas por perilipina1 (verde). Esquerda: após ativação pela PKA, com as gotículas pequenas e dispersas no citosol

Expressão da perilipina1 no tecido adiposo

A regulação da expressão da perilipina1 ainda não está totalmente esclarecida. As perilipina1 são codificadas por um gene único e sua expressão aumenta durante a diferenciação de pré-adipócito para adipócito⁶⁵.

Souza et al.⁶⁶ mostraram que o $\text{TNF}\alpha$ reduz a expressão da perilipina1 e aumenta a lipólise. De modo inverso, outros autores mostraram que o $\text{PPAR}\gamma$ estimula sua expressão e o aumento do armazenamento de TG^{67,68}.

Foi demonstrado em ensaios que a região promotora do gene da perilipina1 contém um elemento funcional: o “ $\text{PPAR}\gamma$ -responsivo” (PPRE)⁶⁹. O tratamento dos adipócitos 3T3-L1 com o agonista para $\text{PPAR}\gamma$ mostra uma estimulação da expressão da perilipina1. O $\text{PPAR}\gamma$ desempenha um papel importante na formação e manutenção da gotícula lipídica no adipócito.

Outros fatores de transcrição envolvidos na diferenciação de adipócitos, como $\text{C/EBP}\alpha$, SREBP-1^a e $\text{LXR}\alpha$, não estimulam a atividade do promotor do gene da perilipina1⁶⁸.

A superexpressão da leptina em camundongos transgênicos mostrou uma queda da lipólise basal e do nível de perilipina1⁷⁰. Uma hipótese dos pesquisadores foi que o excesso de leptina ocasionaria uma queda na acumulação de TG e a diminuição da expressão da perilipina1.

Vários estudos demonstraram uma associação entre a expressão da perilipina1 e a adiposidade, o metabolismo dos lipídeos e a homeostase da glicose. Em 2004, Kern et al.⁷¹ demonstraram uma associação positiva entre a expressão do gene da perilipina1 no tecido adiposo e a obesidade (avaliada pelo percentual de gordura corporal). Em 2003, Mottagui et al.⁷² estudaram a expressão da proteína perilipina1 e demonstraram que mulheres obesas têm adipócitos com menor quantidade total de perilipina1 e maior lipólise. Wang et al.⁷³, ao estudar pacientes com obesidade grave, observaram um aumento da expressão da perilipina1 no tecido adiposo subcutâneo comparado ao tecido adiposo omental. Estes autores avaliaram também a expressão do gene da perilipina1 no tecido adiposo subcutâneo em pacientes obesos e comparou-os com aquela de não obesos. Eles relatam que houve uma maior expressão nos indivíduos não obesos.

Alterações da perilipina1 poderiam ter um papel na etiologia da obesidade humana.

1.3.5 O gene da perilipina1 (*PLIN1*)

O gene da perilipina1 está localizado no cromossomo 15q26.1, próximo a uma área de susceptibilidade para obesidade, diabetes e hipertrigliceridemia já descrita^{74,75}.

O gene da perilipina1 é composto de 9 exons e 8 introns e contém 15.050 pares de bases. O cDNA da perilipina1 humana tem 2.904 nucleotídeos com região traduzida de 1.566 nucleotídeos (Figura 9).

Figura 9- O gene da perilipina1 (PLIN1). Acima: Posição do gene da perilipina1 no cromossomo 15. Abaixo: composição do gene: 9 exons e 8 introns <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=5346>

Foram descritas três formas de perilipina1 em camundongos, sendo que a perilipina1 A (PLIN1a) apresenta 517 e as perilipina1 B (PLIN1b) e C (PLIN1c) apresentam, respectivamente, 422 e 347 aminoácidos⁷⁶. Estas perilipina1 apresentam a mesma porção aminoterminal chamada de domínio PAT.

As isoformas da perilipina1 *PLIN1* são codificadas pelo gene *PLIN1* e advêm de “splicing” alternativo do RNAm⁷⁶. A PLIN1c é expressa somente em células esteroidogênicas e os estudos da PLIN1b demonstram uma expressão menor desta proteína nos adipócitos⁷³. A PLIN1a é a proteína mais abundante no tecido adiposo⁷⁴ (Figura 10).

Figura 10- O mapa de transcrição do gene da perilipina1 (PLIN1) no camundongo. (Adaptado de Lu et al., 2001) O gene da perilipina1 é definido como uma linha horizontal e as caixas vermelhas definem os 9 exons da perilipina1.

1.3.6 Polimorfismos da perilipina1

Foram descritos até o momento 158 polimorfismos do gene PLIN1 (*PLIN1*) em humanos. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp?term=PLIN1>

Qi et al. (2004)⁷⁷ descreveram os polimorfismos mais estudados na literatura e associados à obesidade do gene PLIN1, indicando as localizações no gene (Figura 11).

SNPs	<i>PLIN1</i> *	<i>PLIN3</i> *	<i>PLIN4</i> *	<i>PLIN5</i> *	<i>PLIN6</i> *
dbSNP ID	rs2289487	rs2304794	rs894160	rs2304795	rs1052700
	6209 T>C	10171 A>T	11482 G>A	13041 A>G	14995 A>T
Localização	Intron 2	Intron 5	Intron 6	Exon 8	Exon 9

Figura 11- Nomenclatura dos polimorfismos da perilipina1 (*PLIN1*) (Qi et al., 2004). Os polimorfismos estão indicados com linhas verticais associadas ao nome do polimorfismo. A janela acima do diagrama do gene mostra uma sequência de nucleotídeos. dbSNP ID: número de identificação no banco de dado www.ncbi.nlm.nih.gov

Nesta época, foi utilizada a nomenclatura de *PLIN1*, *PLIN3*, *PLIN4*, *PLIN5* e *PLIN6* para designar os polimorfismos da figura 11.

Introduzimos um asterisco (*) nesta nomenclatura para diferenciá-la da atual nomenclatura da proteína *PLIN1*³⁷(página 8).

Estes polimorfismos da perilipina1 foram estudados em várias populações (Tabela 2), sendo associados à obesidade, diabetes e vários fatores que compõem a síndrome metabólica.

Qi et al.^{77,78,79} estudaram populações asiáticas (China, Malásia e Índia), hispânicas (mulheres brancas) e caucasianas dos Estados Unidos. Os polimorfismos

mais encontrados foram *PLIN1** e *PLIN4**, com frequência do alelo variando de 29 a 45%. Os *PLIN5** e *PLIN6** também foram estudados. Observou-se que alguns efeitos dos polimorfismos da perilipina1 podem ser mais evidentes em mulheres:

- Mulheres caucasianas: *PLIN5** e *PLIN6** foram associados à maior porcentagem de gordura corporal e à circunferência abdominal. Esses dois polimorfismos formam um haplótipo associado ao maior risco de obesidade.
- Mulheres da população hispânica: *PLIN1** e *PLIN4** foram associados ao menor IMC. A variante A do *PLIN4** também foi associada à menor relação cintura-quadril, menor glicemia plasmática e TG. O risco de obesidade foi menor para as variantes C do *PLIN1** e A do *PLIN4**.

Os haplótipos (*PLIN4**, *PLIN5** e *PLIN6**) foram estudados na população asiática e foram associados a risco de obesidade.

Mottagui et al. (2003)⁷² estudaram a expressão da proteína perilipina1 e mostraram que a variante da *PLIN4** (11482 G>A) está associada a uma menor quantidade de perilipina1 no adipócito e maior lipólise nas obesas.

Yan et al. (2004)⁸⁰ estudaram vários polimorfismos da perilipina1 na população chinesa. O polimorfismo mais frequente – 1243T (IMS-JST061887 no exon 3 na base de dados de SNPs japonês (<http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp>)) – foi associado ao aumento de colesterol total, mas não à obesidade e hipertensão.

Meirhaeghe et al. (2006)⁸¹ não verificaram associação entre obesidade e polimorfismos *PLIN4** na população francesa.

Corella et al. (2005)⁸² estudaram a presença de polimorfismos em uma população de obesos caucasianos americanos do norte. A presença da variante A do *PLIN4** foi associada a menor peso corporal inicial bem como à resistência à perda de peso após 1 ano de intervenção quando submetidos a dieta para emagrecer. Os portadores do genótipo GG tiveram a perda de peso maior.

As variantes genéticas que afetam a expressão da proteína, os “splicing” alternativos no RNAm ou a atividade da perilipina1 humana podem ser associados à variabilidade antropométrica ou à concentração plasmática de lipídeos, ambas envolvidas no risco de obesidade e de síndrome metabólica.

Em crianças e adolescentes obesos, descrevemos⁸³ a presença de variantes do gene da perilipina1 e sua influência na variabilidade antropométrica, na concentração plasmática de lipídeos e no risco de apresentar síndrome metabólica (Anexo 1).

Tabela 2- Os 8 estudos mais importantes de associações com polimorfismos da perilipina1.

Artigo	Polimorfismo	População	Resultados
1: Mottagui-Tabar et al. Evidence for an important role of perilipin in the regulation of human adipocyte lipolysis. Diabetologia. 2003 Jun;46(6):789-97.	(a)rs894160 (<i>PLIN4</i> *) (b)rs1052700 (<i>PLIN6</i> *)	SUÉCIA 127 mulheres (10 não obesas)	Objetivo: examinar adipócitos humanos e comparar com duas variantes <i>PLIN</i> Resultados Nos adipócitos de obesos: - lipólise de 2 a 4 vezes maior - expressão da perilipina1 menos 50% - correlação inversa entre perilipina1 no adipócito e no glicérol circulante e AG . A variante <i>PLIN4</i> * AA tem de 50% a 100% de lipólise e a perilipina1 está 80% reduzida em relação a GG
2: Qi L et al. Gender-specific association of a perilipin ... with obesity risk in a white population. Obes Res. 2004;12(11)	(a)6209T>C (b)11482G>A (c)13041A>G (d)14995A>T	EUA 734 brancos (373H, 361M)	Objetivo: associação com obesidade e outros fenótipos. Resultados Mulheres: % de associação na gordura corpórea e CA de c e d Não houve associação com homens
3: Qi L et al. Genetic variation at the perilipin (<i>PLIN</i>) locus is associated with obesity-related phenotypes in White women. Clin Genet. 2004 Oct;66(4):299-310.	<i>PLIN1</i> *:6209T>C <i>PLIN3</i> : 10171A>T <i>PLIN4</i> *:11482G>A <i>PLIN5</i> *:13041A>G <i>PLIN6</i> *:14995A>T	ESPANHA 1.589 pacientes 801 Mulheres brancas (281 obesas)	Objetivo: associação a obesidade Resultados Não homens/ sim Mulheres Associação significativa de <i>PLIN1</i> * e <i>PLIN4</i> * ao baixo IMC (SNP protetor) GA: 2x menos risco de obesidade <i>PLIN1</i> *: variante C menos peso <i>PLIN4</i> *: assoc a menor relação cintura-quadril, glicose,TG
4: Yan W, et al. Polymorphisms in <i>PLIN</i> and hypertension combined with obesity and lipid profiles in Han Chinese. Obes Res. 2004 Nov;12(11):1733-7.	(a)1237(T/C) (b)1243(C/T) (c)1323(C/G)	CHINA 503 com HO 511 controles	Objetivo: associação a hipertensão e obesidade Resultados: Não houve associação de a e b com HO (maior prevalência com b) Diferença significativa: col. Tot e b Homem: b tem maior CT, HDL e LDL
5: Qi L et al. Intragenic linkage disequilibrium structure of the human perilipin gene (<i>PLIN</i>) ... risk in a multiethnic Asian population. J Mol Med. 2005 Jun;83(6):448-56.	(a)6209C>T intron2 (b)10171A>T intron5 (c)11482G>A intron6 (d)13041A>G exon8 (e)14995A>T exon9	SINGAPURA 4.131 Asiáticos (China, Malásia e Índia)	Objetivo: associação ao risco de obesidade Resultados: <i>PLIN</i> 11212(CAAAT) haplótipo associado a maior risco na Malásia e Índia. (e) ass a risco aumentado de obesid na Malásia e Índia
6: Corella D et al. Obese subjects carrying 11482G>A polymorphism at the perilipin locus are resistant to weight loss after dietary energy restriction. J Clin Endocrinol Metab. 2005 Sep;90(9):5121-6.	Vários polimorfismos <i>PLIN1</i> *: 6209T>C <i>PLIN4</i> *:11482G>A <i>PLIN5</i> *: 13041A>G <i>PLIN6</i> *: 14995A>T	EUA 150 obesos, (IMC 42kg/m ²) 48 seguiram 1 ano de prog. hipocalórico	Objetivo associação a obesidade e perda de peso de 48 obesos (33GG, 15 GAA) Resultados Polimorfismo resistente à perda de peso <i>PLIN4</i> *: assoc entre peso corporal e risco de obesidade nos variante A. Maior efeito no peso corporal
7: Meirhaeghe et al. Study of <i>PLIN</i> SNPs in a French population. J Negat Results Biomed. 2006 Jul 12;5:10.	rs4578621 e rs894160 : <i>PLIN4</i> *	FRANÇA 1.120 s (227 obesos)	Objetivo: associações a obesidade e diabete Resultados: Não houve associação
8: Deram et al. Effects of perilipin (<i>PLIN</i>) gene variation on metabolic syndrome risk and weight loss in obese children and adolescents. J Clin Endocrinol Metab. 2008 Dec; 93(12):4933-40.	(a)rs894160 (<i>PLIN4</i> *) (b)rs1052700 (<i>PLIN6</i> *)	BRASIL 234 crianças e adolescentes obesos	Objetivo : examinar a associação da perda de peso e alterações metabólicas com variantes <i>PLIN</i> intervenção 5 mes Resultados <i>PLIN4</i> *: variante AA 3. Risco 4 vezes maior de Síndrome metabólica x GG <i>PLIN6</i> *: TT perde mais peso x AA

2 OBJETIVOS

Os objetivos desta pesquisa na população de crianças e adolescentes brasileiros obesos do Ambulatório de Obesidade Infantil do Hospital das Clínicas da FMUSP foram:

- 1- Determinar a prevalência dos polimorfismos da perilipina1 (PLIN1): *PLIN1**, *PLIN4** e *PLIN6** na população eutrófica e obesa de crianças e adolescentes.
- 2- Examinar as associações entre os SNPs da perilipina1 e:
 1. Os fenótipos relacionados à obesidade e as características clínicas e laboratoriais associadas à síndrome metabólica.
 2. A resposta ao programa de reeducação alimentar, orientação de atividade física e acompanhamento psicológico com objetivo de perda de peso de 5 meses de duração.

3 MÉTODOS

3.1 Protocolo do estudo

A pesquisa foi desenvolvida no laboratório de Investigação Médica/ LIM25 em conjunto com o Ambulatório de Obesidade Infantil do Grupo de Obesidade da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP).

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética da Instituição (protocolo de pesquisa nº 1025/06) (Anexo 2). As crianças e adolescentes consentiram verbalmente sua participação no estudo. Os pacientes foram inseridos no protocolo após a assinatura pelo responsável do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 3), conforme preconiza a resolução nº 196 do Conselho Nacional de Saúde, de 10 de outubro de 1996.

3.2 População do estudo

Foram avaliados dois grupos de crianças e adolescentes de ambos os sexos com idades entre 7 e 14 anos:

- **Crianças e adolescentes obesos (CAO):** 335 em acompanhamento no Ambulatório de Obesidade Infantil e com IMC maior ou igual ao percentil 95 para idade e sexo, de acordo com os gráficos do CDC⁸⁴.

Este grupo era composto por crianças e adolescentes que procuraram o tratamento para obesidade no serviço desde março de 2001.

- **Crianças e adolescentes eutróficos (CAE):** 58 não obesos trazidos pelos pais que se interessaram pela possibilidade de avaliação médica, nutricional e laboratorial oferecida pelo grupo do Ambulatório de Obesidade Infantil. As crianças eram provenientes da escola EMEF Professor Olavo Pezotti e do próprio serviço (filhos de funcionários do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da USP).

Critérios de exclusão: Indivíduos aparentados, com uso crônico de medicação, com descendência asiática ou portadores de síndromes genéticas relacionadas à obesidade.

3.3 Descrição da intervenção nos CAO

O programa consistiu em 20 semanas de atendimento mensal no ambulatório. Os pacientes foram atendidos por uma equipe composta por nutricionistas, professores de educação física, psicólogos e médicos visando um programa de modificação do estilo de vida com reeducação alimentar e incentivo à prática de exercícios físicos. As crianças eram atendidas individualmente pelos médicos endocrinologistas e, quando necessário, pelo psiquiatra e em grupo por psicólogos, professores de educação física e nutricionistas (individualmente e em grupo) que orientavam para uma alimentação equilibrada.

Antes da primeira consulta, pacientes e cuidadores foram orientados quanto ao preenchimento do registro de consumo alimentar. A primeira consulta nutricional, com duração média de 40 minutos, foi dedicada à avaliação e correção do registro de consumo alimentar e ao preenchimento do protocolo para compreensão da rotina e dos hábitos alimentares do paciente. Nesta consulta, o plano alimentar foi elaborado individualmente, sendo o indivíduo orientado a seguir uma dieta balanceada, reduzindo as quantidades em função de seus registros sem chegar a menos de 1.800 kcal/dia, conforme recomendação da OMS e do Ministério da Saúde para distribuição calórica dos macronutrientes.

Por um período de 5 meses, as crianças compareceram mensalmente ao ambulatório para avaliação antropométrica e reforço das orientações nutricionais em consultas individuais de aproximadamente 30 minutos. A cada retorno, realizávamos dinâmicas por aproximadamente uma hora para abordar aspectos da educação nutricional com as crianças e os cuidadores. Tratávamos de temas como pirâmide alimentar, lista de substituições, porcionamento, técnicas dietéticas para diminuir a utilização de óleo e aumentar o consumo de alimentos de baixa densidade energética, rotulagem nutricional e como adequar-se em festas, feriados e férias.

3.4 Avaliação do consumo alimentar

O instrumento utilizado para a avaliação do consumo dos CAO foi o registro de consumo alimentar (RCA) de três dias, sendo dois dias da semana e um do fim de semana, de modo a cobrir a quantidade e variabilidade de alimentos

consumidos no período^{85,86,87}. Este instrumento tem sido descrito há mais de 15 anos como o mais adequado em crianças.

Já na triagem, as crianças receberam o RCA e foram instruídas a trazê-lo na primeira consulta. Todos os meses, os pacientes eram orientados a preencher o RCA e trazê-lo a cada retorno. Para seu preenchimento adequado, além das orientações verbais, fornecíamos um material impresso com explicação detalhada (Anexo 4). O atendimento individual com a nutricionista era dedicado à avaliação e correção do registro de consumo alimentar e preenchimento do protocolo para compreensão da rotina e dos hábitos alimentares do paciente.

Para o grupo CAE, o qual foi atendido apenas um dia para avaliação, avaliamos o consumo alimentar pelo método de recordação da criança das 24 horas anteriores.

Para o cálculo de energia e nutrientes, utilizamos o software brasileiro Programa Virtual Nutri®⁸⁸ com compilação de rótulos de alimentos e tabelas de composição nutricional.

3.5 Avaliação do estado nutricional

3.5.1 Parâmetros Antropométricos:

Peso: O peso corporal em quilogramas (kg) foi aferido duas vezes, considerando-se o peso médio. Foi utilizada uma balança digital Filizola®, com capacidade máxima para 150 kg com graduações de 100 em 100 gramas, estando os participantes da pesquisa descalços e com roupas leves.

Altura: A altura em centímetros (cm) foi aferida três vezes, considerando-se a estatura média, e determinada por meio de um estadiômetro graduado em centímetros e com barra de madeira vertical fixa, com esquadro móvel para posicionamento sobre a cabeça do indivíduo, estando o mesmo descalço, com os pés unidos, em posição ereta, olhando para frente.

Índice de Massa Corpórea (IMC) (kg/m^2): O indivíduo foi considerado eutrófico quando o IMC era de $< p85$ para idade e sexo, sobrepeso quando o IMC era de $\geq p85$ e $< p95$ e obeso quando o IMC era de $\geq p95$ nas curvas de IMC do CDC⁸⁹.

Desvio padrão do índice de massa corpórea (ZIMC): $Z \text{ score} = 1/S \log(Q/M)$, no qual $Q = \text{IMC}$; $S =$ coeficiente de variação individual para sexo e idade; $M =$ mediana. Em estudo realizado em nosso grupo, dividimos o ZIMC em tercís e demonstramos que crianças e adolescentes com $\text{ZIMC} > 2,45$ apresentam menor HDLC, maior resistência à insulina e maior ocorrência de SM, o que confere maior risco cardiovascular⁹⁰. De forma semelhante, Weiss propõe em seu estudo que indivíduos com $\text{ZIMC} \geq 2,50$ seriam obesos graves⁹¹. Portanto, a obesidade será classificada como leve ou moderada se o IMC for de $\geq p 95$ para idade e sexo e $\text{ZIMC} < 2,50$ e grave se o IMC for de $\geq p 95$ e $\text{ZIMC} \geq 2,50$.

Circunferência abdominal (CA): A CA da criança e adolescente foi aferida na altura da crista ilíaca com fita inelástica de modo que esta ficasse paralela ao chão em expiração profunda. O valor obtido foi comparado aos valores referentes ao percentil 90 da tabela publicada a partir do estudo de 9.713 indivíduos de 2 a 18 anos conduzido pelo *National Health and Nutrition Examination Survey III* (NHANESIII). Consideramos como CA aumentada quando o valor medido estava acima do valor correspondente ao percentil 90⁹².

3.5.2 Análise da Composição Corporal pelo Método de Bioimpedância

O aparelho de bioimpedância elétrica utilizado para a avaliação da composição corporal foi o Body Composition Analyser (BiaQuantum RJL Systems, Inc, MI, EUA). A bioimpedância foi realizada com os indivíduos adequadamente hidratados, em decúbito dorsal, sobre uma superfície não condutora e com os membros separados. O relatório de composição corporal discriminando o percentual de massa gorda (MG%) e de massa magra foi obtido a partir das medidas de reactância e resistência e dos dados referentes a sexo, idade, altura e peso.

3.6 Métodos laboratoriais

A coleta de sangue venoso periférico foi realizada após mais de 8 horas e até 12 horas de jejum com determinação de todas as medidas laboratoriais, como descritas a seguir:

3.6.1 Dosagem de glicemia (mg/dL)

A determinação da glicemia 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 pelo método enzimático colorimétrico automatizado utilizando a hexoquinase. Valor de referência em crianças (VR): 60 – 99 mg/dL. Segundo as recomendações da

Associação Americana de Diabetes, consideramos glicemia de jejum alterada quando a glicose em jejum encontrava-se entre 100 mg/dL e 125 mg/dL; tolerância à glicose diminuída quando a glicemia de 120 minutos após 75g de glicose encontrava-se entre 140 mg/dL e 199 mg/dL; e DM2 quando a glicemia de jejum encontrava-se em ≥ 126 mg/dL em duas medidas ou, também, glicemia de 120 minutos após 75g de glicose ≥ 200 mg/dL⁹³.

3.6.2 Dosagem de insulina (mU/L)

A concentração sérica de insulina foi determinada no Laboratório de Hormônios do Hospital das Clínicas Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo utilizando-se o estojo comercial B080-101 AutoDELFIA, PerkinElmer do Brasil. VR: < 25 mU/L. Indivíduos pré-púberes foram considerados hiperinsulinêmicos quando as concentrações séricas de insulina em jejum estavam em ≥ 15 mU/L. Para os púberes, o nível de corte utilizado foi de 20 mU/L, já que na puberdade existe aumento das concentrações séricas de insulina basal^{94,95}.

3.6.3 Dosagem de ácido úrico (mg/dL)

A concentração sérica de ácido úrico foi determinada no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pelo método enzimático colorimétrico automatizado. VR: 2,4–5,7 mg/dL para mulheres; 3,4–7,0 mg/dL para homens.

3.6.4 Avaliação dos lipídios plasmáticos:

Colesterol total (CT) (mg/dL): A concentração plasmática de CT foi determinada no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo por sistema automatizado modular utilizando estojos comerciais enzimáticos da Roche (Mannheim, Alemanha). VR: < 200mg/dL.

Lipoproteína de baixa densidade (LDLC) (mg/dL): A concentração plasmática de LDLC foi determinada por meio de cálculo matemático pela equação de Friedwald, na qual $LDLC = CT - (HDL + VLDL)^{96}$. VR: < 130 mg/dL.

Lipoproteína de alta densidade (HDL) (mg/dL): A concentração plasmática de HDL foi determinada no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo por sistema automatizado modular utilizando estojos comerciais enzimáticos da Roche (Mannheim, Alemanha). VR: > 45 mg/dL. Adotamos o nível de corte de 40 mg/dL para diagnosticar baixo HDL⁹⁷.

Triglicérides (mg/dL): A concentração plasmática de triglicérides foi determinada no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo por sistema automatizado modular utilizando estojos comerciais enzimáticos da Roche (Mannheim, Alemanha). VR: <150mg/dL para adultos. Consideramos hipertrigliceridemia quando a concentração de triglicérides encontrava-se acima ou igual a 110 mg/dL ¹²¹

3.6.5 Adiponectina ($\mu\text{g/mL}$)

A concentração sérica de adiponectina foi determinada no Laboratório de Nutrição Humana e Doenças Metabólicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – LIM/25. A dosagem da adiponectina foi realizada por ELISA em duplicata com o estojo comercial EZHADP-61K, marca Linco Research, Inc. St Charles, Missouri, EUA.

3.6.6 Leptina (ng/mL)

A concentração sérica de leptina foi determinada no Laboratório de Nutrição Humana e Doenças Metabólicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – LIM/25 pelo estojo comercial EZHL-80SK (ELISA), Linco Research, Inc. St Charles, Missouri, EUA. VR: 3,7 – 11,1 ng/mL para mulheres; 2,0 – 5,6 ng/mL para homens. As análises foram feitas em duplicata.

3.7 Avaliação das variáveis metabólicas

3.7.1 Avaliação da resistência à insulina

HOMA-IR: O HOMA (“Homeostasis Model Assessment”) foi calculado pela fórmula matemática: $\text{insulina T0 } (\mu\text{U/mL}) \times \text{glicose T0 } (\text{mmol/L}) / 22,5^{98}$. Este tem sido proposto como um método para avaliar a sensibilidade ou resistência à insulina e a função das células β a partir das concentrações de insulina e de glicemia de jejum.

Razão da área sob a curva de insulina e glicose (AUCins/AUCgli):

Este índice, que avalia a secreção de insulina em relação à glicemia, foi calculado com base nas concentrações plasmáticas de glicose e de insulina nos tempos (T) 0, 30, 60, 90, 120 minutos após ingestão de 1,75 g de glicose anidra ou equivalente por quilograma de peso até o máximo de 75 g do teste oral de tolerância à glicose (TOTG).

3.7.2 Teste oral de tolerância à glicose: TOTG

No TOTG, o sangue venoso periférico foi coletado para a determinação das concentrações de glicemia e de insulina nos tempos 0, 30, 60, 90, 120 minutos com a finalidade de excluir pacientes com diabetes, além de avaliar o grau de resistência à insulina. Os valores de glicemia e insulina plasmáticas foram utilizados para a determinação da área sob a curva.

3.7.3 Avaliação da Síndrome Metabólica (SM)

Recentemente, foi publicada uma nova classificação de SM para jovens pela *International Diabetes Federation (IDF)*⁹⁹. Os critérios estabelecidos pela IDF para avaliação de SM preconizam divisão por faixa etária para se excluir as diferenças encontradas no grau de desenvolvimento nas diferentes idades das crianças. Indivíduos com menos de 6 anos de idade foram excluídos devido à falta de dados nessa faixa etária. Em crianças de 6 a 10 anos, preconiza-se a avaliação da CA e, se

esta estiver acima do percentil 90 para idade e sexo, conforme tabela publicada no estudo de Fernandez et al.⁶⁶, deve ser orientado emagrecimento. Nessa faixa etária, deverão ser realizadas outras investigações metabólicas se houver antecedente familiar de SM, DM2, dislipidemia, doença cardiovascular, Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) ou obesidade. Para adolescentes de 10 a 16 anos, o IDF recomenda a avaliação da obesidade pela medida da CA e que esta seja diagnosticada se a CA estiver acima do percentil 90 para idade e sexo; os níveis de corte para adultos devem ser utilizados se forem mais baixos do que os níveis correspondentes ao percentil 90. A SM foi diagnosticada quando houve a presença de obesidade visceral e mais dois dos seguintes fatores: $TG \geq 150\text{mg/dL}$, $HDL-C < 40\text{ mg/dL}$, $PA \geq 130 \times 85\text{ mmHg}$ ou glicemia de jejum $\geq 100\text{mg/dL}$.

3.8 Avaliação da pressão arterial

A pressão foi aferida pelo método auscultatório, com manguito apropriado para a circunferência do braço. Para avaliar a HAS, as medidas de pressão sistólica (PAS) e diastólica (PAD) foram comparadas aos percentis das Tabelas do *National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Children and Adolescents*¹⁰⁰ para sexo, idade e percentil da altura. A pressão arterial foi considerada alterada quando acima do p90. A classificação adotada pelo IDF é de $PA \geq 130 \times 85\text{ mmHg}$.

3.9 Análise genética

3.9.1 Extração do DNA – procedimento com sal (“Salting Out”)

A extração de DNA genômico de leucócitos foi realizada com sangue periférico, de acordo com o método de “Salting Out”¹⁰¹. Foram coletados 10 mL de sangue venoso em tubos contendo 25 mM de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético). O *pellet* leucocitário foi obtido a partir da lise dos glóbulos vermelhos com o uso da solução de lise (1mM NH_4HCO_3 , 114 mM NH_4Cl), incubação a 4°C por 30 minutos seguida de centrifugação do material a 4°C por 15 minutos a 3000 rotações por minuto (rpm) (Hettich-Rotina 35R, Alemanha), desprezando-se o sobrenadante. Esse procedimento foi repetido mais uma vez. O botão de glóbulos brancos foi então suspenso em 6 mL de solução de lise de glóbulos brancos (10 mM Tris, 10 mM EDTA, 150 mM de NaCl), 120 μL de SDS 10° (Sigma, St.Louis, MO, EUA), 80 μL de proteinase K (10 mg/mL) (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, EUA) e incubado durante 18 horas a 37°C com agitação. No dia seguinte, foram adicionados 2,4 mL de NaCl saturado. Essa solução foi agitada vigorosamente por 15 segundos e centrifugada por 15 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante contendo o DNA desproteínizado foi transferido para um tubo limpo, onde foram adicionados 2 volumes de etanol absoluto gelado e homogeneizando cuidadosamente por inversão. O DNA precipitado foi retirado do tubo, lavado duas vezes com etanol gelado a 70°, em seguida com etanol absoluto e seco por centrifugação a vácuo (SpeedVac System, S ISS100, NY, EUA) durante 5 minutos 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 foi avaliado pela relação de absorbância de 260 e 280 nm e a integridade do material verificada após eletroforese em gel de agarose a 1%. As amostras foram armazenadas a 4°C até sua utilização.

3.9.2 Genotipagem por método TaqMan®

O estudo da genotipagem foi feito no laboratório de Nutrição e Genômica na Universidade Tufts em Boston, Estados Unidos, no J.M.-US Department of Agriculture Human Nutrition Research Center on Aging. Foram genotipados três polimorfismos do gene da perilipina1 (*PLIN*): *PLIN1** 6209T>C (intron 2), *PLIN4** 11482G>A (intron 6) e *PLIN6** 14995A>T (exon 9, região não traduzida) (Tabela 3).

A genotipagem foi realizada usando a discriminação alélica 5' nuclease do método Taqman Assay® com o sistema ABI 7900HT (Applied Biosystems). O procedimento (Figura 12) foi realizado com boas técnicas laboratoriais para otimizar com exatidão os resultados da genotipagem, comparando os ensaios com controles internos e análises repetitivas.

Figura 12- Ensaios de genotipagem com Taqman® (Applied Biosystems™)

A discriminação alélica é realizada com o “annealing” seletivo das sondas Taqman (VIC e FAM). Fase 1: Ensaio com os componentes DNA, sondas VIC e FAM não ativadas. Fase 2: desnaturação e “annealing” dos componentes. Fase 3: polimerização e geração de sinal fluorescente.

Figura 13- Exemplo de resultado obtido pelo método Taqman®, leitura por fluorescência

Neste estudo, foram incluídos crianças e adolescentes obesos selecionados aleatoriamente da população do ambulatório de Obesidade Infantil do Hospital das Clínicas, na cidade de São Paulo, Brasil. Do ponto de vista genético, a população brasileira é miscigenada.

Tabela 3- Sequências para amplificações dos SNPs *PLIN1, *PLIN4** e *PLIN6****

SNP	www.ncbi.nlm.nih.gov	Primers e sondas	
PLIN1*			
6209 T/C	rs 2289487	Sense	5'AATGAGTGGCATCCCCAA3'
Intron 2		Antisense	5'AAGAAATTGACTGAGCAAGGG3'
		Sonda	AAGAAATTGACTGAGCAAGGG
PLIN4*			
11482 G/A	rs 894160	Sense	5'TCCTCTGTGATCTGGATGATCT3'
Intron 6		Antisense	5'TCCTCTGTGATCTGGATGATCT3'
		Sonda	CTCTGATGAACATCCTCTGATGATC
PLIN6*			
14995 A/T	rs 1052700	Sense	5'TGATCTGTTCCCCCTCTGATGAA3'
Exon 9		Antisense	5'CACCCAAGAGCTTTTGCATCTG3'
		Sonda	VIC: CTGATGATCAAGGCTCC FAM: TCTGATGATCTGGCTCC

3.10 Análise estatística

A análise estatística inicial do estudo foi feita pelo programa SPSS versão 13 (Statistical Package for Social Science Inc., Chicago, Illinois, EUA). Avaliou-se a normalidade das variáveis pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e as variáveis sem distribuição normal foram normalizadas utilizando a transformação logarítmica (log10). As médias das variáveis quantitativas foram comparadas utilizando o teste t de Student e a análise de variância (ANOVA) de um caminho com análise post-hoc de Tukey e as variáveis qualitativas foram analisadas pelo teste qui-quadrado. Foi utilizada a correlação de Spearman para análise das relações bivariadas. Foi aplicada uma regressão logística ajustada para sexo, idade e estágio puberal e SM como variável dependente para avaliar o risco relativo (HR) (e seu intervalo de confiança para avaliação de ter SM quando portador de variante da perilipina1. Utilizamos o programa Helix TreeTM para calcular o Equilíbrio de Hardy-Weinberg e o desequilíbrio de ligação entre os SNPs. Foram considerados significativos valores p de <0,05.

4 RESULTADOS

Foram avaliados 393 crianças e adolescentes de 7 a 14 anos: 335 obesos (CAO) do Ambulatório de Obesidade Infantil e 58 não obesos (CAE). Dos CAO, 75 não concluíram o programa de 20 semanas (22,4%) e 26 foram excluídos (falta de avaliações laboratoriais, antropométricas ou genéticas). Um CAE também foi excluído por falta de dados.

Avaliamos 291 crianças e adolescentes nas análises estatísticas, sendo 234 obesos do Ambulatório de Obesidade Infantil e 57 não obesos. Destes, 184 (63,2%) eram do sexo feminino e 107 (36,8%) do sexo masculino e 50,4% eram púberes. Todos foram avaliados pelos critérios de TANNER.

Dos 234 CAO analisados estatisticamente, 78 eram meninos (33,3%) e 156 eram meninas (66,7%), sendo 48,3% púberes e dos 57 CAE, 29 (50,1%) eram meninos e 28 (49,9%) eram meninas; sendo 56% púberes.

No presente estudo, os resultados das análises estatísticas não demonstraram diferença entre os gêneros e, portanto, foram analisados conjuntamente.

4.1 Resultados da população geral do estudo

4.1.1 Resultados iniciais

Não encontramos diferenças nas médias das idades entre CAE e CAO.

Como esperado, as crianças obesas apresentavam peso, altura, IMC, ZIMC, percentual de massa gorda e CA maiores do que as crianças sem obesidade (Tabela 4).

Além disso, observamos maior pressão arterial e maiores concentrações basais de insulinemia, leptinemia, ácido úrico, HOMA-IR, LDL-C e TG e menores concentrações de HDL-C e adiponectina no grupo CAO.

Tabela 4- Características clínicas e laboratoriais das amostras de crianças e adolescentes eutróficos (CAE) e obesos (CAO)

	CAE N=57	CAO N=234	P
Idade (anos)	10,9 ± 1,6	10,6 ± 1,3	0,364
Peso (kg)	37,1 ± 10,0	68,3 ± 15,4	0,000
IMC (kg/m ²)	17,4 ± 2,7	30,4 ± 4,5	0,006
ZIMC	-0,16 ± 1,0	2,31 ± 0,28	0,000
Circunferência Abdominal (cm)	64,2 ± 7,3	96,5 ± 10,7	0,000
PAS (mmHg)	107 ± 13	112 ± 15	0,015
PAD (mmHg)	69 ± 13	70 ± 12	0,416
Glicemia jejum (mg/dL)	85 ± 6,9	85,6 ± 7,5	0,656
Insulinemia jejum (μU/mL)	5,4 ± 3,2	17,6 ± 9,8	0,000
HOMA-IR	1,2 ± 0,7	3,7 ± 2,2	0,000
CT (mg/dL)	153 ± 26,1	158,9 ± 31,9	0,135
HDL-C (mg/dL)	58,8 ± 12,1	41,8 ± 9,7	0,000
LDL-C (mg/dL)	81,2 ± 21,6	96,6 ± 28,7	0,000
TG (mg/dL)	64,5 ± 23,4	102,4 ± 46,6	0,000
Ácido úrico (mg/dL)	4,0 ± 0,9	5,0 ± 1	0,000
Adiponectina (μg/mL)	15,0 ± 4,9	12,4 ± 5,6	0,001
Leptina (ng/mL)	5,6 ± 4,5	39,2 ± 19,7	0,000
Massa Magra (kg)	30,7 ± 7,1	42,5 ± 8,5	0,000
Massa Gorda (kg)	7,3 ± 4,4	25,4 ± 7,7	0,000
% Massa Gorda	18,3 ± 7,1	36,9 ± 4,2	0,000
Consumo alimentar (kcal/dia)	1820 ± 648	1976 ± 657	0,175

Nota: Dados apresentados em média ± desvio-padrão. Teste t de Student.

IMC: Índice de massa corpórea. ZIMC: escore Z do IMC. PAS Pressão Arterial. Sistólica. PAD: Pressão Arterial. Diastólica. HOMA-IR: Homeostasis Model Assessment para avaliação da resistência à Insulina. CT: Colesterol total. HDL-C Lipoproteína de alta densidade. LDL-C: lipoproteína de baixa densidade. TG: Triglicerídeos.

Síndrome Metabólica (SM) avaliada pelo IDF

Observamos que 44 CAO (19%) apresentavam SM, de acordo com os critérios da IDF. Nenhum CAE apresentava SM (Tabela 5).

Na avaliação da ocorrência de fatores de risco metabólicos, observamos que o grupo obeso apresentava maior frequência de aumento de CA, dislipidemia e SM.

Observamos baixa ocorrência de glicemia de jejum alterada nos dois grupos: 8 CAO (3,4%) e 1 CAE (1,8%). Nenhuma criança do CAE apresentava hiperinsulinemia, enquanto esta esteve presente em 38,9% das crianças obesas.

Tabela 5- Frequências (%) dos componentes de Síndrome Metabólica (critérios do IDF) na amostra de crianças e adolescentes eutróficos e obesos

	CAE	CAO	<i>p</i>
	N=57	N=234	
Circunferência abdominal $\geq$ percentil 90	3,5	99,1	0,00
Pressão arterial PAS $\geq$130 ou PAD $\geq$85 (mmHg)	12,3	17,8	0,35
Glicemia de jejum $\geq$ 100 mg/dL	1,8	3,4	0,51
HDL-C < 40 mg/dL	5,3	46,2	0,00
TG $\geq$150 mg/dL	0	14,1	0,00
SM	0	19	0,00

Nota: Critérios de SM do IDF (2007): Circunferência abdominal $\geq$ percentil 90 e mais dois fatores: Pressão arterial PAS (sistólica) ou PAD (diastólica), Glicemia de jejum, HDL-C (lipoproteína de alta densidade) , TG: triglicerídeos , SM: síndrome metabólica.

4.1.2 Resultados do grupo obeso após intervenção

Após 20 semanas de atendimento mensal de nosso grupo de intervenção para mudança de estilo de vida, observamos que 96,2% dos pacientes (225) perderam ZIMC (Tabela 6).

Tabela 6- Características clínicas e laboratoriais da amostra de crianças e adolescentes obesos no basal e após 5 meses de intervenção, cálculo da diferença (Inicial – final)

(N=234)	Inicial	Final	Inicial-final Diferença (±DP)
Peso (kg)	68,3 ± 15,4	65,8 ± 15,1	2,53 (±3,6)*
IMC (kg/m ²)	30,4 ± 4,5	28,5 ± 4,5	1,8 (±1,5)*
ZIMC final	2,31 ± 0,28	2,1 ± 0,4	0,2 (±0,16)*
Circunferência Abdominal (cm)	96,5 ± 10,7	93,8 ± 10	2,2 (±12,3)*
Glicemia jejum (mg/dL)	85,6 ± 7,5	80 ± 6,9	16,3 (±31)
Insulina jejum (μU/mL)	17,6 ± 9,8	14,5 ± 7,8	3,6 (±9,5)*
HOMA-IR	3,7 ± 2,2	2,9 ± 1,6	1,0 (±2,2)*
CT (mg/dL)	159 ± 32	158 ± 31	1,5 (±24,4)*
HDL-C (mg/dL)	41,8 ± 9,7	45,3 ± 10,3	- 3,6 (±7)*
LDL-C (mg/dL)	96,6 ± 28,7	92,5 ± 29,1	4,1 (±28)*
TG (mg/dL)	102,4 ± 46,6	100,5 ± 49,1	2,5 (±45,1)
Adiponectina (μg/mL)	12,4 ± 5,6	12,3 ± 5,3	-1 (±3)
Leptina (ng/mL)	39,2 ± 19,7	36,4 ± 21,3	3,9 (±13,8)
Consumo alimentar (kcal/dia)	1976 ± 657	1563 ± 547	404 (±810)*

Nota: Dados apresentados em média ±desvio-padrão. *p<0,05

IMC: Índice de massa corpórea. ZIMC:escore Z do IMC. HOMA-IR: Homeostasis Model Assesment para avaliação da resistência à Insulina. CT: Colesterol total. HDL-C Lipoproteína de alta densidade. LDL-C: lipoproteína de baixa densidade. TG: Triglicerídeos.

Ao comparar as medidas metabólicas e clínicas entre o grupo CAO antes e depois, houve uma melhora significativa (p<0,05) dos pesos, CA, IMC, ZIMC e concentrações de HDL-C, insulina, HOMA-IR e consumo alimentar. Não houve diferença significativa nos níveis de TG.

4.2 Genotipagem

4.2.1 Genotipagem do grupo eutrófico

Foram avaliadas e genotipadas no laboratório da Tufts University, em Boston, EUA com método TaqMan® 57 crianças e adolescentes eutróficas.

As frequências dos alelos mais raros dos polimorfismos *PLIN1**, *PLIN4** e *PLIN6** foram 58,8%, 35,1% e 29,8%, respectivamente (Tabela 7).

Tabela 7- Distribuições dos alelos e genotipagens dos SNPs da perilipina1 *PLIN1* em crianças e adolescentes eutróficos

Alelos	<i>n</i> (%)	Genótipos	<i>n</i> (%)	Valor de <i>P</i>
<i>PLIN1</i> * - 6209 T/C				
T	47 (41,2)	TT	13 (22,8)	0,07
C	67 (58,8)	TC	21 (36,8)	
		CC	23 (40,4)	
<i>PLIN4</i> * - 11482 G/A				
G	74 (65,9)	GG	26 (45,6)	0,25
A	40 (35,1)	GA	22 (38,8)	
		AA	9 (15,8)	
<i>PLIN6</i> * - 14995 A/T				
A	80 (70,2)	AA	30 (52,6)	0,22
T	34 (29,8)	AT	20 (35,1)	
		TT	7 (12,3)	

Nota: Frequência genotípica e alélica observada no estudo e esperada pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg - χ^2 .

A distribuição dos genótipos dos três polimorfismos estudados encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,05$).

4.2.2 Frequência dos alelos na população obesa

As frequências dos alelos mais raros dos polimorfismos *PLIN1**, *PLIN4** e *PLIN6** foram 48,3%, 30% e 25,6%, respectivamente. (Tabela 8)

Tabela 8- Distribuições dos alelos e genotipagens dos SNPs da perilipina1 *PLIN1* em crianças e adolescentes obesos

Alelos	<i>n</i> (%)	Genótipo	<i>n</i> (%)	Valor de <i>P</i>
<i>PLIN1</i> * - 6209 T/C				
T	242 (51,7)	TT	65 (27,8)	0,52
C	226 (48,3)	TC	112 (47,9)	
		CC	57 (24,4)	
<i>PLIN4</i> * - 11482 G/A				
G	328 (70)	GG	116 (49,6)	0,74
A	140 (30)	GA	96 (41)	
		AA	22 (9,4)	
<i>PLIN6</i> * - 14995 A/T				
A	348 (74,4)	AA	134 (57,3)	0,11
T	120 (25,6)	AT	80 (34,2)	
		TT	20 (8,5)	

Nota: Frequência genotípica e alélica observada no estudo e esperada pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg - χ^2 .

A distribuição genotípica esteve na frequência esperada de acordo com o cálculo de Hardy-Weinberg .

4.2.3 Desequilíbrio de ligação

O conceito de desequilíbrio de ligação (LD) entre os polimorfismos é essencial nesta pesquisa. O desequilíbrio de ligação corresponde a uma situação em que dois alelos correspondentes a dois polimorfismos distintos de um mesmo

cromossomo estão mais comumente associados na população em geral do que o acaso. Esta correlação (D) é definida como a diferença entre as frequências observadas e as frequências teóricas das combinações alélicas. Se D for positivo, o alelo raro do primeiro polimorfismo estará mais frequentemente associado ao alelo raro do segundo polimorfismo. Inversamente, se D for negativo, o alelo raro do primeiro alelo estará mais frequentemente associado ao alelo frequente do segundo polimorfismo. O valor de desequilíbrio de ligação depende em parte das variações das frequências dos polimorfismos. Uma medida de desequilíbrio de ligação menos sensível às variações de frequência (D') é mais frequentemente utilizada. Ela corresponde à razão D observada em seu valor máximo ou mínimo possível em função das frequências alélicas. Quanto mais D' se aproxima de 1, mais o desequilíbrio é forte.

Nós avaliamos o desequilíbrio de ligação entre os SNPs pelo Helix tree®. Um forte desequilíbrio de ligação (LD) foi encontrado entre os polimorfismos *PLIN1** e *PLIN4** ($D'=0,99$; $P<0,001$) (Figura 14).

Figura 14- Gráfico ilustrativo do resultado obtido após cálculo do desequilíbrio de ligação entre os SNPs *PLIN1**, *PLIN4**, *PLIN5** e *PLIN6**. (adaptado do Helix Tree®) Tons de rosa mais intensos demonstram maior desequilíbrio de ligação. O *PLIN5** foi avaliado junto com os polimorfismos desta tese.

Seguindo os achados da genotipagem e devido a esse DL, os resultados de *PLIN1** e *PLIN4** obtidos na avaliação das crianças e adolescentes foram similares. Por conta disso, descreveremos nas tabelas os resultados relativos a *PLIN4** e *PLIN6**.

Figura 15- Arquitetura do gene da perilipina1.(adaptado de Soenen et al. 2009)¹⁰². Todas as variantes localizam-se em partes não transcritas do gene. Foi observado desequilíbrio de ligação entre o polimorfismo *PLIN1** e *PLIN4** ($D'=0,99$; $p<0,001$)

Ao avaliar as frequências alélicas dos três polimorfismos estudados do *PLIN1*, não houve diferença estatisticamente significativa nas frequências entre a população CAE e CAO.

4.3 Resultados por polimorfismos na fase inicial:

4.3.1 Associações entre os SNPs e dados iniciais das CAO

Os dados antropométricos, bioquímicos, características clínicas e consumo alimentar iniciais, de acordo com o genótipo, estão descritos na tabela 9.

Não foram encontradas diferenças em relação aos dados antropométricos e consumo alimentar quando o grupo de CAO foi avaliado na presença do alelo A do *PLIN4** e do alelo T do *PLIN6**.

Para avaliar a relação entre os polimorfismos *PLIN4** e *PLIN6** e os parâmetros antropométricos e perfil bioquímico, os portadores do genótipo raro AA do *PLIN4** foram agrupados com aqueles com genótipo heterozigoto GA (AA+GA). Também, os portadores do genótipo raro do TT do *PLIN6** foram agrupados com aqueles com genótipo heterozigoto AT (TT+AT).

Tabela 9- Relação entre os SNPs *PLIN4 e *PLIN6** e parâmetros antropométricos, perfil metabólico e consumo alimentar no basal em CAO (N=234)**

	<i>PLIN4</i> * 11482G>A			<i>PLIN6</i> * 14995A>T		
	GG (N=116)	GA+AA (N=118)	<i>P</i>	AA (N=134)	AT+TT (N=100)	<i>p</i>
Idade (anos)	10,7 ± 1,3	10,6 ± 1,3	0,91	10,7 ± 1,4	10,6 ± 1,2	0,83
Peso (kg)	66,8 ± 14,1	69,8 ± 16,5	0,18	69,1 ± 16,3	67,3 ± 14,1	0,43
IMC (kg/m ²)	30,1 ± 3,9	30,6 ± 5,0	0,53	30,7 ± 4,7	30,0 ± 4,1	0,28
ZIMC	2,30 ± 0,3	2,32 ± 0,3	0,88	2,32 ± 0,3	2,29 ± 0,3	0,46
Circunferência abdominal (cm)	95,7 ± 9,5	97,1 ± 11,7	0,39	97,1 ± 11,4	95,6 ± 9,6	0,33
PAS (mmHg)	111 ± 13	113 ± 16	0,42	112 ± 14	112 ± 15	0,99
PAD (mmHg)	70 ± 12	70 ± 12	0,80	70 ± 12	71 ± 11	0,35
Glicemia jejum (mg/dl)	85 ± 7	86 ± 8	0,16	85 ± 8	86 ± 7	0,37
Insulina jejum (μU/ml)	16,5 ± 9,8	18,6 ± 9,8	0,03	18,3 ± 10,3	16,5 ± 9,1	0,20
HOMA-IR	3,5 ± 2,1	4,0 ± 2,3	0,02	3,9 ± 2,2	3,6 ± 2,2	0,21
CT (mg/dl)	158 ± 31,9	159 ± 32,0	0,75	159 ± 34,1	158,3 ± 28,7	0,98
HDL-C (mg/dl)	43,6 ± 10,1	40,0 ± 9,0	0,003	42,4 ± 9,9	40,9 ± 9,4	0,27
LDL-C (mg/dl)	95,6 ± 28,1	97,5 ± 29,3	0,64	96,3 ± 29,9	97,0 ± 27,0	0,76
TG (mg/dl)	93,9 ± 42,5	111 ± 49,1	0,003	103 ± 46,9	102 ± 46,5	0,98
Consumo alimentar Kcal/24h	1951 ± 648	2001 ± 672	0,69	1946 ± 671	2031 ± 639	0,51

Nota: Dados apresentados em média ±desvio-padrão. Teste t de Student.

IMC: Índice de massa corpórea. ZIMC:escore Z do IMC. PAS Pressão Arterial. Sistólica. PAD: Pressão Arterial. Diastólica. HOMA-IR: Homeostasis Model Assesment para avaliação da resistência à Insulina. CT: Colesterol total. HDL-C Lipoproteína de alta densidade. LDL-C: lipoproteína de baixa densidade. TG: Triglicerídeos.

Não houve diferença significativa nos parâmetros bioquímicos e clínicos para o polimorfismo *PLIN6**.

Os portadores do alelo A do *PLIN4** apresentaram concentrações mais elevadas de TG (P=0,003), insulina (P=0,034) e HOMA-IR (P=0,015), além de menores concentrações de HDL-C (P=0,003).

Quando os grupos foram comparados pelo *PLIN1** (Tabela 10), os resultados foram similares, mas não idênticos aos grupos de portadores de *PLIN4**. Observamos diferenças similares entre portadores do alelo menor que apresentaram níveis maiores de TG (p=0,002) e menores de HDL-C (p=0,029), além de pressão diastólica maior (p=0,042).

Não observamos diferença significativa dos níveis de insulina e HOMA-IR.

Tabela 10- Relações entre o polimorfismo *PLIN1 e parâmetros antropométricos, perfil metabólico e consumo alimentar no basal no grupo de CAO (N=234)**

	<i>PLIN 1* 6209 T/C</i>		<i>p</i>
	TT (n=65)	TC+CC (n=169)	
Idade (anos)	10,7 ± 1,3	10,7 ± 1,3	0,94
Peso (kg)	68,5 ± 14,0	68,3 ± 15,9	0,77
IMC (kg/m2)	30,4 ± 3,5	30,4 ± 4,8	0,74
ZIMC	2,33 ± 0,2	2,30 ± 0,3	0,31
Circunferência abdominal (cm)	97 ± 9	96,2 ± 11,2	0,44
PAS (mmHg)	110 ± 12	113 ± 15	0,22
PAD (mmHg)	68 ± 11	71 ± 12	0,042
Glicemia jejum (mg/dl)	85 ± 8	86 ± 7,2	0,18
Insulina jejum (μU/ml)	17,3 ± 9,9	17,66 ± 9,8	0,64
HOMA-IR	3,63 ± 2,1	3,79 ± 2,2	0,46
CT (mg/dl)	154 ± 26	161 ± 33	0,25
HDL-C (mg/dl)	44,1 ± 10,8	40,9 ± 9,1	0,029
LDL-C (mg/dl)	92 ± 24	98 ± 30	0,25
TG (mg/dl)	88 ± 40	108 ± 48	0,002
Consumo Alimentar (Kcal/24h)	2000 ± 687	1966 ± 650	0,86

Nota: Dados apresentados em média ±desvio-padrão. Teste t de Student.

IMC: Índice de massa corpórea. ZIMC:score Z do IMC. PAS Pressão Arterial. Sistólica. PAD: Pressão Arterial. Diastólica. HOMA-IR: Homeostasis Model Assesment para avaliação da resistência à Insulina. CT: Colesterol total. HDL-C Lipoproteína de alta densidade. LDL-C: lipoproteína de baixa densidade. TG: Triglicerídeos.

Síndrome Metabólica avaliada pelo IDF

Como descrito anteriormente na tabela 5, , 44 crianças e adolescentes (19%) do grupo de CAO apresentavam SM, de acordo com os critérios da IDF.

Crianças e adolescentes portadores do alelo A do *PLIN4** apresentaram uma maior prevalência de SM (25,9%) quando comparados com o grupo de genótipo selvagem GG (12,1%) (Tabela 11).

O risco relativo da ocorrência de SM para portadores do alelo A do *PLIN4** é de:

■ 2,38 (95% IC 1,1-4,9) para o genótipo GA quando comparado ao GG

■ 3,46 (95% IC 1,2-9,9) para o genótipo AA quando comparado ao GG

(Variável dependente: SM e ajustada pelo sexo, idade e estado puberal, IC: intervalo de confiança)

Tabela 11- Frequência (%) dos componentes de SM em crianças e adolescentes obesos segundo a presença dos polimorfismos *PLIN4 e *PLIN6****

	<i>PLIN4</i> * 11482 G/A			<i>PLIN6</i> * 14995 A/T		
	GG	GA+AA	<i>p</i>	AA	AT+TT	<i>p</i>
Circunferência abdominal $\geq$ percentil 90	99,1	99,1	<i>0,98</i>	99,2	99	<i>0,83</i>
Pressão arterial PAS $\geq$130 ou PAD $\geq$85 (mmHg)	12,6	22,8	<i>0,046</i>	18	17,5	<i>0,93</i>
Glicemia $\geq$100 mg/dL	2,6	4,3	<i>0,48</i>	3,8	3	<i>0,75</i>
HDL-C $<$40 mg/dL	40,5	51,7	<i>0,09</i>	43,3	50	<i>0,31</i>
TG $\geq$150 mg/dL	10,3	17,8	<i>0,11</i>	16,4	11	<i>0,24</i>
SM	12,1	25,9	<i>0,008</i>	18,2	20	<i>0,7</i>

Nota: Critérios de SM do IDF (2007): Circunferência abdominal $\geq$ percentil 90 e mais dois fatores: Pressão arterial PAS (sistólica) ou PAD (diastólica), Glicemia de jejum, HDL-C: lipoproteína de alta densidade , TG: triglicerídeos , SM: síndrome metabólica.

Quando divididas por presença do polimorfismo *PLINI**, as crianças apresentaram resultados similares (devido ao desequilíbrio de ligação).

Quando foi observado o grupo de crianças menores de 10 anos (77 crianças, 33%), 13 (16,9%) foram diagnosticadas com SM. Todas as crianças menores de 10 anos e com SM eram portadoras do alelo C do *PLINI**. Este achado nos levou a avaliar seus dados metabólicos divididos por *PLINI** (Tabela 12).

Tabela 12- Frequência (%) dos componentes da SM em crianças e adolescentes obesos, segundo a presença dos polimorfismos *PLINI**

	<i>PLINI*</i> 6209 T/C		
	TT	TC+CC	<i>p</i>
Circunferência abdominal ≥ percentil 90	100	98,8	0,39
Pressão arterial PAS ≥130 ou PAD ≥85 (mmHg)	8,1	21,5	0,19
Glicemia ≥100 mg/dL	3,1	3,6	0,85
HDL-C <40 mg/dL	38,5	49,1	0,14
TG ≥150 mg/dL	9,2	16	0,19
SM	10,8	22,2	0,052

Nota: Critérios de SM do IDF (2007): Circunferência abdominal ≥ percentil 90 e mais dois fatores: Pressão arterial PAS (sistólica) ou PAD (diastólica), Glicemia de jejum, HDL-C: lipoproteína de alta densidade, TG: triglicerídeos, SM: síndrome metabólica.

Observamos uma prevalência similar de SM e uma prevalência maior de hipertensão nos portadores do alelo C do *PLINI** em comparação com o *PLIN4**.

O *risco relativo* para portadores do alelo C do *PLINI** da ocorrência de:

- SM: 2,36 (95% Intervalo de Confiança 1-5,6)
- Hipertensão: 3,1 (95% Intervalo de Confiança 1,2-8,4).

(Variável dependente: SM e ajustada pelo sexo, idade e estado puberal, IC: intervalo de confiança)

Teste oral de tolerância à glicose

O teste oral de tolerância à glicose (TOTG) foi realizado em 229 indivíduos. Não se observou diferença relativa à presença dos alelos para glicemia, mas sim, para insulinemia (Figura 16).

Figura 16- Valores de Glicemia e de insulinemia durante o Teste Oral de Tolerância à Glicose dos pacientes portadores do genótipo *PLIN4**(G>A)

Observamos que a área sob a curva de insulinemia foi significativamente maior para os portadores do alelo A do *PLIN4** ($P=0,005$). Além disso, durante o TOTG, foram encontrados maiores níveis de insulinemia em todos os tempos (Figura 17). O genótipo AA do *PLIN4** mostrou uma hiperinsulinemia durante todos os tempos quando comparado com o genótipo selvagem GG.

Figura 17- Valores de Insulinemia durante o Teste Oral de Tolerância à Glicose dos pacientes portadores do genótipo do *PLIN4** (G>A)

4.4 Resultados após intervenção: Associações entre os SNPs após 20 semanas

Os dados antropométricos, bioquímicos, de características clínicas e consumo alimentar de acordo com o genótipo e após a intervenção clínica de 20 semanas estão descritos na tabela 13.

Foi observada uma perda ponderal (2,53 kg em média) e houve diminuição do ZIMC ($0,20 \pm 0,16$) em 226 crianças e adolescentes (96,6%).

Nos portadores do alelo A do *PLIN4** e do alelo T do *PLIN6**, não houve diferenças significativas no consumo alimentar quando comparados com o genótipo selvagem. Apesar do consumo alimentar semelhante, as crianças portadoras do alelo T do *PLIN6** apresentaram uma maior perda de peso ($P=0,003$), diminuição do ZIMC ($P=0,014$) e diminuição da circunferência abdominal ($P=0,05$) em comparação ao grupo genótipo (AA) selvagem do *PLIN6**. Este grupo de portadores do alelo T do *PLIN6** também apresentou menores níveis de insulinemia ($P=0,02$) e do HOMA-IR ($P=0,012$).

Tabela 13- Relação entre os haplótipos *PLIN4/*PLIN6** e parâmetros antropométricos, perfil metabólico e consumo alimentar após 20 semanas de intervenção dos 234 CAO**

N=234	<i>PLIN4</i> * 11482G>A			<i>PLIN6</i> * 14995A>T		
	GG	GA+AA	<i>p</i>	AA	AT+TT	<i>p</i>
Peso (kg)	64,5 ± 14,5	67,1 ± 15,7	0,19	67,2 ± 16,2	64,0 ± 13,4	0,43
Perda de peso (kg)	2,4 ± 3,7	2,7 ± 3,6	0,51	1,9 ± 3,5	3,3 ± 3,7	0,00
IMC (kg/m ²)	28,3 ± 4,3	28,8 ± 4,8	0,51	29,1 ± 4,9	27,8 ± 3,9	0,04
ZIMC	2,10 ± 0,3	2,12 ± 0,4	0,65	2,14 ± 0,4	2,06 ± 0,3	0,11
Perda de ZIMC	0,21 ± 0,2	0,19 ± 0,1	0,43	0,18 ± 0,1	0,23 ± 0,2	0,01
Circunferência abdominal (cm)	93,1 ± 9,5	94,5 ± 10,6	0,51	95,5 ± 10,5	91,4 ± 9,0	0,05
Glicemia jejum (mg/dl)	80 ± 7	80 ± 8	0,75	80 ± 8	80 ± 7	0,56
Insulina jejum (μU/ml)	14,1 ± 7,5	15,0 ± 8,0	0,51	15,5 ± 7,8	13,2 ± 7,6	0,02
HOMA-IR	2,7 ± 1,4	3,0 ± 1,7	0,43	3,1 ± 1,5	2,6 ± 1,6	0,01
CT (mg/dl)	156,9 ± 29,0	158,7 ± 33,2	0,79	156,6 ± 32,6	159,3 ± 29,1	0,45
HDL-C (mg/dl)	47,0 ± 10,7	43,6 ± 9,6	0,02	45,6 ± 10,4	44,8 ± 10,1	0,64
LDL-C (mg/dl)	90,4 ± 27,1	94,6 ± 31,0	0,35	91,2 ± 30,7	94,3 ± 26,9	0,31
TG(mg/dl)	98,7 ± 46,2	102,4 ± 52,1	0,71	100,2 ± 53,9	100,9 ± 42,2	0,60
Cons. alimentar: kcal/24h	1637 ± 543	1493 ± 549	0,21	1618 ± 551	1474 ± 540	0,25

Nota: Dados apresentados em média ±desvio-padrão. Teste t de Student.

IMC: Índice de massa corpórea. ZIMC:score Z do IMC. HOMA-IR: Homeostasis Model Assesment para avaliação da resistência à Insulina. CT: Colesterol total. HDL-C Lipoproteína de alta densidade. LDL-C: lipoproteína de baixa densidade. TG: Triglicerídeos.

4.5 Análise de haplótipos

Um haplótipo corresponde a um conjunto de alelos de vários polimorfismos, próximos uns dos outros no mesmo par de cromossomo. Devido ao desequilíbrio de ligação, as combinações alélicas dos polimorfismos próximos uns dos outros geram menos diversidade do que se eles não estivessem correlacionados. Ao selecionar um subconjunto adequado de polimorfismos (SNPs) para caracterizar os blocos de haplótipos, é possível captar a diversidade da sequência de uma região com um número limitado de SNPs¹⁰³.

Portadores do alelo A do *PLIN4** demonstraram um maior risco metabólico, enquanto portadores do alelo T do *PLIN6** demonstraram uma melhor resposta à intervenção multidisciplinar com relação à perda de peso.

Para avaliarmos o efeito isolado e as interações dos diferentes polimorfismos *PLIN4** e *PLIN6** estudados, constituímos um haplótipo dos SNPs *PLIN4** 11482G/A e *PLIN6** 14995A/T. O grupo de 234 crianças e adolescentes foi dividido em quatro grupos possíveis em função dos alelos selvagens ou raros (Tabela 14). Os alelos foram chamados de 1 ou 2, sendo 1 para alelo selvagem e 2 para alelo mais raro.

Tabela 14- Grupos de haplótipos segundo os 2 SNPs *PLIN4(11482G/A)/ *PLIN6**(14995A/T) dos 234 CAO**

Haplótipos <i>PLIN4</i> */ <i>PLIN6</i> *	<i>PLIN6</i> * AA (selvagem) N= 134 1	<i>PLIN6</i> * T variante (AT+TT) N= 100 2
<i>PLIN4</i> * GG (selvagem) N= 116 1	1.1 N=84 (35,9%) GG/AA	1.2 N=32 (13,7%) GG/AT+TT
<i>PLIN4</i> * variante A (GA+AA) N= 118 2	2.1 N=50 (21,4%) GA+AA/AA	2.2 N=68 (29%) GA+AA/AT+TT

Grupos:

1.1 (GG/AA): selvagens do *PLIN4** e *PLIN6**

1.2 (GG/AT+TT): selvagens do *PLIN4** e portadores do alelo T do *PLIN6**

2.1 (GA+AA/AA): portadores do alelo A do *PLIN4** e selvagens do *PLIN6**

2.2 (GA+AA/AT+TT): portadores do alelo A do *PLIN4** e do alelo T do *PLIN6**

Figura 18- Prevalência dos grupos de haplótipos *PLIN4/*PLIN6****

As medidas antropométricas, bioquímicas, clínicas e de consumo alimentar, iniciais e após intervenção de acordo com os haplótipos estão descritas na tabela 15.

Tabela 15- Relação entre os haplótipos *PLIN4(11482G>A)/*PLIN6**(14995A>T) e os parâmetros antropométricos e perfil metabólico no basal e após intervenção de CAO**

Haplótipo <i>PLIN4</i> */ <i>PLIN6</i> *	GG/AA 1.1		GG/AT+TT 1.2		GA+AA/AA 2.1		GA+AA/AT+TT 2.2	
BASAL	n=84	35,9%	n=32	13,7%	n=50	21,4%	n=68	29%
Idade (anos)	10,7 ± 1,3		10,5 ± 1,4		10,6 ± 1,5		10,7 ± 1,2	
Peso (kg)	68 ± 14,6		63,6 ± 12,2		70,9 ± 18,7		69 ± 14,7	
IMC (kg/m ²)	30,5 ± 4,1		29,3 ± 3,2		31,1 ± 5,7		30,3 ± 4,4	
ZIMC	2,31 ± 0,3		2,28 ± 0,2		2,34 ± 0,3		2,30 ± 0,3	
Circunf. abdominal (cm)	96,7 ± 9,7		93,2 ± 8,3		97,8 ± 13,8		96,7 ± 10,1	
PAS (mmHg)	111 ± 13		112 ± 13		114 ± 16		112 ± 16	
PAD (mmHg)	70 ± 13,0		72 ± 10		70 ± 11		70 ± 12	
Glicemia jejum (μU/dl)	84 ± 7,4		87 ± 6,7		87 ± 7,5		86 ± 7,6	
Insulina jejum (μU/dl)	17,8 ± 10,5		13,3 ± 6,7		19,2 ± 10,1		18,1 ± 9,7	
HOMA-IR	3,73 ± 2,2		2,85 ± 1,5		4,15 ± 2,0		3,90 ± 2,4	
CT (mg/dl)	158,5 ± 33,4		157,9 ± 28		160,9 ± 35,7		158,5 ± 29,3	
HDL (mg/dl)	43,55 ± 10,3		43,66 ± 9,8		40,40 ± 9,0		39,66 ± 9,0	
LDL (mg/dl)	94,83 ± 28,9		97,75 ± 26,2		98,72 ± 31,7		96,57 ± 27,5	
TG (mg/dl)	98,45 ± 46,2		81,81 ± 28,2		110,38 ± 47,6		110,96 ± 50,5	
kcal / 24h	1935 ± 587		2024 ± 923		1965 ± 811		2033 ± 539	
Após intervenção (20 sem.)								
Peso (kg)	66,2 ± 14,7		60 ± 13,0		68,9 ± 18,5		65,8 ± 13,3	
Perda peso (kg)	1,90 ± 3,7		3,59 ± 3,6		1,98 ± 3,1		3,20 ± 3,8	
IMC (kg/m ²)	28,9 ± 4,4		26,9 ± 3,6		29,4 ± 5,6		28,3 ± 4,0	
ZIMC	2,13 ± 0,3		2,00 ± 0,3		2,16 ± 0,4		2,10 ± 0,4	
Perda ZIMC	0,18 ± 0,1		0,29 ± 0,2		0,18 ± 0,1		0,20 ± 0,1	
Circunf. abdominal (cm)	94,2 ± 9,0		88,8 ± 10,9		98,4 ± 12,9		92,3 ± 8,4	
Glicemia jejum (μU/dl)	80 ± 7,4		81 ± 7,4		82 ± 7,9		80 ± 7,4	
Insulina jejum (μU/dl)	14,4 ± 7,3		12,9 ± 8,1		17,2 ± 8,4		13,3 ± 7,4	
HOMA-IR	2,80 ± 1,3		2,42 ± 1,5		3,49 ± 1,8		2,64 ± 1,6	
CT (mg/dl)	156 ± 29		159 ± 28		158 ± 38		160 ± 30	
HDL (mg/dl)	47,2 ± 10,4		46,5 ± 11,5		42,9 ± 10,0		44,1 ± 9,3	
LDL (mg/dl)	89,5 ± 27,7		92,7 ± 26,0		93,9 ± 35,5		95,0 ± 27,5	
TG (mg/dl)	98,9 ± 47,0		98,3 ± 44,8		102,6 ± 64,6		102,2 ± 41,2	
kcal / 24h	1664 ± 585		1551 ± 406		1550 ± 505,5		1439 ± 597	

Nota: Dados apresentados em média ±desvio-padrão. Teste t de Student.

IMC: Índice de massa corpórea. ZIMC:escore Z do IMC. PAS Pressão Arterial. Sistólica. PAD: Pressão Arterial. Diastólica. HOMA-IR: Homeostasis Model Assesment para avaliação da resistência à Insulina. CT: Colesterol total. HDL-C Lipoproteína de alta densidade. LDL-C: lipoproteína de baixa densidade. TG: Triglicerídeos.

Grupos: 1.1 (GG/AA): selvagens do *PLIN4** e *PLIN6**

1.2 (GG/AT+TT): selvagens do *PLIN4** e portadores do alelo T do *PLIN6**

2.1 (GA+AA/AA): portadores do alelo A do *PLIN4** e selvagens do *PLIN6**

2.2 (GA+AA/AT+TT): portadores do alelo A do *PLIN4** e do alelo T do *PLIN6**

4.5.1 Resultados no Basal por haplótipos do *PLIN4**/*PLIN6**

Não foram observadas diferenças significativas para medidas antropométricas e consumo alimentar entre os quatro grupos na situação basal. Com relação às variáveis metabólicas, houve diferenças para insulina, HOMA-IR, HDL-C e TG (Figura 19 e 20).

Figura 19- Média de HDL-C e TG por haplótipo *PLIN4/*PLIN6** .**

HDL-C: lipoproteína de alta densidade TG: Triglicerídeos

Figura 20- Média de HOMA-IR por haplótipo *PLIN4/*PLIN6****

HOMA-IR : Homeostasis Model assesment da resistência a insulina.

O grupo do haplótipo 1.2 (selvagem do *PLIN4** e portadores do alelo T do *PLIN6**) demonstrou menores valores de HOMA-IR quando comparado com os três outros grupos: 1.1 ($P=0,045$), 2.1 ($P=0,001$) e 2.2 ($P=0,009$)(Figura 20).

Nenhuma criança do grupo 1.2 apresentou concentrações de $TG \geq 150 \text{ mg/dL}$.

O grupo 2.1 (portadores do alelo A do *PLIN4** e selvagem do *PLIN6**) apresentou uma prevalência alta de hipertrigliceridemia (20% apresentaram $TG \geq 150 \text{ mg/dL}$), hipertensão (27,7%) e glicemia $\geq 100 \text{ mg/dL}$ (4%), sendo esta o dobro dos níveis encontrados nos outros grupos.

Tabela 16- Frequência (%) dos componentes da SM em crianças e adolescentes obesos segundo a presença dos haplótipos *PLIN4 /*PLIN6****

	1.1 GG/AA N=84	1.2 GG/AT+TT N=32	2.1 GA+AA/AA N=50	2.2 GA+AA/AT+TT N=68	<i>p</i>
Circunferência abdominal $\geq$ percentil 90	98,8	100	100	98,5	0,78
Pressão arterial PAS ≥ 130 ou PAS $\geq 85 \times$ (mmHg)	12,3	13,3	27,7	19,4	0,15
Glicemia jejum $\geq 100 \text{ mg/dL}$	2,4	3,1	6,1	2,9	0,71
HDL-C $< 40 \text{ mg/dL}$	39,3	43,8	50	53	0,77
TG $\geq 150 \text{ mg/dL}$	14,3	0	20	16,2	0,74
SM	14,3	6,3	25	26,5	0,47

Nota: Critérios de SM do IDF (2007): Circunferência abdominal $\geq$ percentil 90 e mais dois fatores: Pressão arterial PAS (sistólica) ou PAD (diastólica), Glicemia de jejum, HDL-C: lipoproteína de alta densidade, TG: triglicerídeos, SM: síndrome metabólica.

A maior prevalência de SM foi encontrada nos grupos de haplótipos 2.1 (GA+AA/AA) e 2.2 (GA+AA/AT+TT), com 25% e 26,5%, respectivamente.

Os dois outros grupos apresentaram uma menor incidência de SM, sendo 14,3% para 1.1 (GG/AA) e 6,3% para 1.2 (GG/AT+TT) (Tabela 16) (Figura 21).

Figura 21- Prevalência de SM por haplótipo *PLIN4**/*PLIN6**

4.5.2 Resultados após intervenção por haplótipos *PLIN4**/*PLIN6**

O grupo 1.2 (selvagens do *PLIN4** e portadores do alelo T do *PLIN6**) obteve a melhor resposta com a relação à perda de peso (Figura 22).

Em comparação com os outros grupos, foi observada uma diminuição significativa do ZIMC: 1.1 ($P=0,002$), 2.1 ($P=0,006$) e 2.2 ($P=0,018$) (Figura 23).

Figura 22- Perda de peso nos grupos de haplótipos *PLIN4**/*PLIN6**

O haplótipo 2.1 (portadores do alelo A do *PLIN4** e selvagens do *PLIN6**) permaneceu com os maiores valores de HOMA-IR em relação aos outros grupos: 1.1 ($P=0,05$), 1.2 ($P=0,014$) e 2.2 ($P=0,01$) (Figura 24).

Figura 23- Perda de ZIMC nos grupos de haplótipos *PLIN4*/PLIN6**

Figura 24- HOMA-IR após intervenção nos grupos de haplótipos *PLIN4*/PLIN6**

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, observamos que a obesidade no grupo pediátrico, independentemente de seu grau de gravidade, apresenta-se acompanhada de aumento da circunferência abdominal, principal fator associado ao risco cardiovascular¹⁰⁴.

As crianças e adolescentes obesos envolvidos nesta pesquisa apresentaram maiores níveis pressóricos, HOMA-IR e trigliceridemia e menores concentrações de HDL-C, que são fatores associados à doença cardiovascular^{105,106,107}, quando comparados ao CAE. Observamos uma ocorrência importante de fatores de risco associados à obesidade, destacando-se a hiperinsulinemia que, apesar de não fazer parte dos critérios utilizados no diagnóstico de SM, não foi observada em indivíduos sem obesidade e estava presente em quase 40% dos CAO. Os valores que encontramos estão de acordo com as evidências de que são frequentemente encontradas concentrações elevadas de insulina em obesos, por conta do aumento da secreção de insulina pelas células beta pancreáticas, como uma compensação para a resistência à sua ação¹⁰⁸.

O programa multidisciplinar com modificação do estilo de vida e orientação nutricional é descrito como sendo a melhor intervenção na obesidade infantil^{109,110}. Após 20 semanas, observou-se que 96,2% das crianças e adolescentes obesos diminuíram o grau de obesidade (com diminuição média de 10% de ZIMC e de 2,5kg de peso corporal). Os resultados decorrentes da nossa intervenção assemelham-se aos dados da literatura^{111,112}. Os estudos de intervenção que trazem os melhores resultados quanto ao emagrecimento são aqueles em que as crianças permanecem em

um sistema de internato, com alimentação controlada e prática de atividade física regular¹¹³. Em um estudo de revisão que pretende avaliar diversos programas de intervenção, verificou-se que os resultados mais relevantes são encontrados em programas aplicados em um período de 6 meses a 1 ano que incluem educação nutricional e promoção de atividade física e nos quais há estímulo para o envolvimento dos pais¹¹⁴.

A taxa de abandono do tratamento em nosso serviço de obesidade infantil foi de 22%, menor do que aquela encontrada em algumas publicações da literatura^{115,116}. Esta taxa de adesão pode ser explicada por ser este um programa de atendimento multidisciplinar mensal e pela maior informação fornecida através das aulas sobre alimentação, pelo apoio psicológico, pela atividade física e pelo efeito da interação entre as crianças no tratamento em grupo.

Ressaltamos que, no presente estudo, ao avaliar o consumo calórico, não se observou diferença na média de ingestões (em kcal) entre o grupo eutrófico e o grupo obeso, as quais estiveram inclusive abaixo dos requerimentos energéticos estimados para este grupo etário. Apesar de termos utilizado a metodologia recomendada para aplicação do registro de consumo alimentar de três dias, é bastante provável que tenha havido uma subestimação no relato de ingestão dos CAO. Além disso, a avaliação das ingestões do grupo CAE foi realizada pelo método de recordatório de 24 horas com um desvio padrão importante. A ocorrência do sub-relato também foi observada por Fontanive e col. (2002)¹¹⁷, ao avaliarem o consumo de meninas brasileiras. Por sua vez, Goris & Westerterp (2000)¹¹⁸ identificaram uma discrepância entre a ingestão energética relatada e o gasto energético, medido pelo método de água marcada, de 20% a 50% em indivíduos obesos.

Quanto ao consumo energético, foi obtida diminuição significativa (média de 404 kcal) após a intervenção. Em uma pesquisa comparando crianças obesas não tratadas com crianças obesas submetidas a intervenção por um período de 3 meses, Nemet e col. (2005)¹¹⁹ observaram que, entre as 24 que completaram os 3 meses de tratamento, houve diminuição significativa no consumo de calorias, carboidratos, lipídeos e proteínas. O déficit energético observado pelos autores após a intervenção foi de 390 kcal, semelhante aos nossos resultados.

No presente estudo, avaliamos três polimorfismos (*PLIN1**, *PLIN4** e *PLIN6**) e obtivemos frequências similares àquelas na literatura^{77,78,82}. Também observamos um desequilíbrio de ligação (LD) entre *PLIN1** e *PLIN4**, como já descrito em outras populações⁷⁷; devido a este LD, nossos resultados para estes dois polimorfismos ficaram similares. Descrevemos apenas os resultados para *PLIN4** e *PLIN6**.

Estes polimorfismos são bastante frequentes e observamos, no grupo de crianças e adolescentes obesos avaliado, que 50,4% das crianças são portadoras de pelo menos um alelo A do *PLIN4** e 42,7% são portadoras de pelo menos um alelo T do *PLIN6**.

Mostramos que os SNPs do gene *PLIN1* têm influência no risco de SM e na perda de peso após a intervenção com orientação nutricional e aconselhamento comportamental.

A presença do alelo A do *PLIN4** 11482G>A foi associada a um maior risco de Síndrome Metabólica, enquanto a presença do alelo T do *PLIN6** 14995A>T foi associada a uma melhor resposta de perda ponderal após o período de intervenção multidisciplinar.

Apesar de não terem sido encontradas diferenças significativas nas medidas antropométricas e consumo alimentar no ponto basal entre os grupos de portadores dos polimorfismos estudados da *perilipina1*, os portadores do alelo A do *PLIN4** apresentaram uma prevalência maior de SM. Esta se deve principalmente à ocorrência de hipertrigliceridemia e hipertensão e a um risco relativo de SM, o qual passa de 2,4 (95% Intervalo de confiança 1,1-4,9) no genótipo GA para 3,5 (95% Intervalo de confiança 1,2-9,9) no genótipo AA quando comparados ao genótipo selvagem (GG). Nossos dados demonstraram que, na presença de obesidade, o alelo A do *PLIN4** estava associado a um pior perfil metabólico, com concentrações maiores de TG e maior resistência à insulina (HOMA-IR) e concentrações menores de HDL-C, além de uma prevalência duas vezes maior de SM em comparação com o genótipo selvagem (25,9% e 12,1%, respectivamente).

Observamos ainda que o alelo A do *PLIN4** está associado a uma maior resposta insulínica no teste oral de tolerância à glicose e maior resistência à insulina (HOMA-IR).

Estes achados contrastam com estudos encontrados na população adulta em geral, os quais observaram uma associação entre a presença do alelo A do *PLIN4** e risco menor de obesidade^{77,82}. Estudos prévios demonstraram que mulheres homozigotas para o alelo A do *PLIN4** apresentavam menor expressão de *perilipina1* e maior lipólise no tecido adiposo subcutâneo, quando comparadas às mulheres com genótipo selvagem⁷². A lipólise observada nos portadores do alelo A do *PLIN4** ocasiona maior liberação de AG na corrente sanguínea, limitando o armazenamento de TG.

Entretanto, em nossa população, o sedentarismo em conjunto com a inadequação dos hábitos alimentares poderia sobrepor a proteção oferecida pela

presença do alelo A por conta do aumento de ácidos graxos livres liberados pelo adipócito. Sugerimos que a sobrecarga de AG não esterificados no plasma leva a um desequilíbrio do perfil metabólico nos portadores do alelo A do *PLIN4**. No modelo animal knock-out da perilipina1, a lipólise acentuada leva à resistência à insulina¹²⁰. Sabe-se que no ser humano a associação de obesidade e sobrecarga de AG não esterificados no plasma também pode levar à resistência à insulina¹²¹ e, posteriormente, ao diabetes tipo 2¹²².

O alelo A do *PLIN4**, apesar de associado a um menor risco de obesidade em várias populações, pode tornar-se um obstáculo para reconquistar a homeostase metabólica quando maus hábitos alimentares e o sedentarismo facilitam a instalação da obesidade. Esse achado está de acordo com um resultado recente sugerindo que a obesidade pode influenciar associações entre as variações do gene *PLIN1* e o risco de diabetes¹²³.

Em adultos obesos portadores do alelo A do *PLIN4**, observou-se resistência à perda de peso durante o período de um ano de intervenção com dieta com restrição calórica quando comparados a portadores do genótipo GG⁸². Não confirmamos este achado porque todas as crianças perderam peso e não houve diferença significativa na perda de peso ou ZIMC entre os genótipos do *PLIN4**. A alteração metabólica que observamos nessas crianças portadoras do alelo A do *PLIN4** poderia constituir uma barreira à perda de peso futura, visto que esses pacientes mantiveram a maior resistência à insulina após intervenção independente da perda de peso.

Os portadores do alelo T do *PLIN6** apresentaram uma maior perda de peso (3,3 kg x 1,9 kg) e uma maior redução no ZIMC (10% x 7,8%) após 20 semanas de intervenção multidisciplinar quando comparados ao genótipo selvagem AA. Este

polimorfismo *PLIN6** foi associado em várias populações a um risco maior de obesidade e de CA maior ⁷⁹. Embora não tenham apresentado diferenças antropométricas ou metabólicas na população de CAO antes da intervenção, os portadores do alelo T do *PLIN6** demonstraram uma melhor resposta após 20 semanas de tratamento multidisciplinar para perda de peso.

Estes dois polimorfismos *PLIN4** e *PLIN6** apresentam diferentes influências nos fenótipos associados à obesidade. Questionamo-nos qual seriam os fenótipos dos portadores das duas variantes. Constituímos haplótipos *PLIN4** 11482G>A / *PLIN6** 14995A>T classificando as crianças em 4 grupos: 1.1 (selvagem, sem variante), 1.2 (com alelo T *PLIN6**), 2.1 (com alelo A *PLIN4**) e 2.2 (com alelo A *PLIN4** e T *PLIN6**).

O efeito da presença do alelo A do *PLIN4** no maior risco de SM foi avaliado com os haplótipos *PLIN4** 11482G>A / *PLIN6** 14995A>T, sendo observado que a prevalência de SM era quatro vezes maior nos grupos 2.1 (AA) e 2.2 (AT) (ambos portadores do alelo A do *PLIN4**) do que no grupo 1.2 (GT) (portadores somente do alelo T do *PLIN6**), confirmando o efeito do alelo A do *PLIN4** no risco relativo de SM mesmo com a presença do alelo T do *PLIN6**.

Para avaliarmos a influência da presença do alelo T do *PLIN6**, estudamos as crianças do grupo 1.2. Neste grupo, a prevalência de SM foi de 6% e, quando comparado ao grupo selvagem 1.1, foi de 14%, o que evidencia que a presença do alelo T do *PLIN6** confere uma proteção contra a SM em comparação às crianças selvagens do haplótipo. Poderíamos inferir com este resultado que as crianças portadoras do alelo T do *PLIN6** (sem a presença do alelo A do *PLIN4**) teriam uma maior “adaptação” metabólica à obesidade sem apresentarem a mesma

frequência de alterações durante o período de investigação em comparação com os outros genótipos.

Observamos ainda que o grupo 1.2 teve uma diminuição mais expressiva no ZIMC em comparação com o grupo 1.1 (12,7% x 7,8%), assim como os grupos 2.1 e 2.2. O efeito do alelo T do *PLIN6** na proteção contra SM e na maior perda de ZIMC parece ter uma influência menor, sendo inativado pela presença do alelo A do *PLIN4**.

O presente estudo é o primeiro a relatar que crianças e adolescentes obesos portadores do alelo T do *PLIN6**, mesmo com grau de obesidade semelhante ao genótipo selvagem, têm menores alterações metabólicas e apresentaram uma melhor resposta à intervenção multidisciplinar.

Estudos da literatura associaram a presença do alelo T do *PLIN6** a maior risco de obesidade em algumas populações^{78,79}. As crianças portadoras do alelo T do *PLIN6** avaliadas em nossa pesquisa têm o mesmo grau de obesidade que a forma selvagem. Nossos dados indicam que a presença do alelo T do *PLIN6** não está associada ao maior grau de obesidade e conferiu à nossa população de crianças obesas um efeito protetor contra desenvolvimento de alterações metabólicas.

Não observamos estudos funcionais publicados sobre o polimorfismo *PLIN6**, mas Jang et al. (2006)¹²⁴ demonstraram que *PLIN4** e *PLIN6** podem estar localizados na região 3', onde ocorre “*splicing alternativo*”, alterando o produto de transcrição e resultando em isoformas de perilipina1. Estas isoformas protéicas foram transcritas de RNAm “*spliced*” e mostraram uma eficiência alterada à lipólise.

Esses polimorfismos não estão na região traduzida do *PLIN1*. O *PLIN4** encontra-se na região intrônica e o *PLIN6** na região exônica não transcrita. Uma

hipótese é que eles estejam em desequilíbrio de ligação com outra região com variantes funcionais¹²⁵.

Esse estudo demonstra que crianças e adolescentes, mesmo com um padrão de obesidade similar, podem apresentar perfis metabólicos e respostas à intervenção diferentes. A variabilidade dos SNPs do *PLIN1* pode ter um efeito significativo em resposta à perda de peso e à Síndrome Metabólica. Apesar disso, precisamos ser cautelosos ao extrapolar essas conclusões para outras populações, além de ser necessária a replicação deste estudo.

Apesar das limitações encontradas, o presente estudo parece confirmar os achados da literatura sobre as associações do *PLIN1* com a obesidade. Os benefícios potenciais da avaliação molecular personalizada são importantes, e este trabalho contribui para o conjunto de informações que pode eventualmente levar a este objetivo.

O aconselhamento preventivo com mudança do estilo de vida, que é sempre retratado como prática saudável, deveria ser enfatizado especialmente em crianças e adolescentes portadores do alelo A do *PLIN4** que apresentam sobrepeso. De fato, este polimorfismo é descrito como protetor contra a obesidade nas populações, provavelmente por ter uma lipólise acelerada. Após instalação da obesidade, tal proteção desaparece, dando origem a um maior comprometimento metabólico.

Por fim, nossos dados demonstram que polimorfismos comuns da perilipina1 podem prognosticar resultados diferentes do tratamento multidisciplinar em crianças e adolescentes obesos e, dessa forma, intervenções diferentes devem ser consideradas.

Ressaltamos com essas observações a importância da avaliação da obesidade infantil como uma doença, na qual os indivíduos não são iguais e, portanto, apresentam respostas metabólicas diferentes.

6 CONCLUSÃO

-
- A presença do alelo A do *PLIN4** é associada a um risco maior de síndrome metabólica.
 - Os portadores do alelo T do *PLIN6** apresentam uma resposta melhor ao programa de reeducação alimentar e de atividade física.
 - Estudos dos haplótipos:
 - A presença do alelo A do *PLIN4** deteriora a resposta ao programa de reeducação alimentar dos portadores do alelo T do *PLIN6**
 - A presença do alelo T do *PLN6** (sem o alelo A do *PLIN4**) tem um efeito protetor à SM em comparação com o selvagem.
 - Os polimorfismos *PLIN4** e *PLIN6**, frequentes em nossa população, têm influência nas co-morbidades e podem ajudar a antecipar os resultados de estratégias de tratamento multidisciplinares. Eles poderiam ser considerados como base para a prevenção e o tratamento.

7 ANEXOS

ANEXO 1

ORIGINAL ARTICLE

Endocrine Research

Effects of Perilipin (*PLIN*) Gene Variation on Metabolic Syndrome Risk and Weight Loss in Obese Children and Adolescents

Sophie Deram, Christiane Y. Nicolau, Pablo Perez-Martinez, Isabel Guazzelli, Alfredo Halpern, Bernardo L. Wajchenberg, Jose M. Ordovas, and Sandra M. Villares

Laboratory of Human Nutrition and Metabolic Disease (S.D., C.Y.N., I.G., A.H., S.M.V.), Laboratório de Investigação Médica 25, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), and Children Obesity's Outpatient Clinic, Hospital das Clínicas of the University of São Paulo Medical School, University of São Paulo Medical School, São Paulo, Brazil CEP 01246-903; Reina Sofia University Hospital (P.P.-M.), Lipids and Atherosclerosis Research Unit, University of Cordoba, CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), 14071 Cordoba, Spain; Endocrine Service and Heart Institute of the Hospital das Clínicas FMUSP (B.L.W.), 05403-000 São Paulo, Brazil; and Nutrition and Genomics Laboratory (J.M.O.), Jean Mayer U.S. Department of Agriculture Human Nutrition Research Center on Aging at Tufts University, Boston, Massachusetts 02111

Context: Genetic polymorphisms at the perilipin (*PLIN*) locus have been investigated for their potential utility as markers for obesity and metabolic syndrome (MS). We examined in obese children and adolescents (OCA) aged 7–14 yr the association of single-nucleotide polymorphisms (SNP) at the *PLIN* locus with anthropometric, metabolic traits, and weight loss after 20-wk multidisciplinary behavioral and nutritional treatment without medication.

Design: A total of 234 OCA [body mass index (BMI) = 30.4 ± 4.4 kg/m²; BMI Z-score = 2.31 ± 0.4] were evaluated at baseline and after intervention. We genotyped four SNPs (*PLIN1* 6209T→C, *PLIN4* 11482G→A, *PLIN5* 13041A→G, and *PLIN6* 14995A→T).

Results: Allele frequencies were similar to other populations, *PLIN1* and *PLIN4* were in linkage disequilibrium ($D' = 0.999$; $P < 0.001$). At baseline, no anthropometric differences were observed, but minor allele A at *PLIN4* was associated with higher triglycerides (111 ± 49 vs. 94 ± 42 mg/dl; $P = 0.003$), lower high-density lipoprotein cholesterol (40 ± 9 vs. 44 ± 10 mg/dl; $P = 0.003$) and higher homeostasis model assessment for insulin resistance (4.0 ± 2.3 vs. 3.5 ± 2.1 ; $P = 0.015$). Minor allele A at *PLIN4* was associated with MS risk (age and sex adjusted) hazard ratio 2.4 (95% confidence interval = 1.1–4.9) for genotype GA and 3.5 (95% confidence interval = 1.2–9.9) for AA. After intervention, subjects carrying minor allele T at *PLIN6* had increased weight loss (3.3 ± 3.7 vs. 1.9 ± 3.4 kg; $P = 0.002$) and increased loss of the BMI Z-score (0.23 ± 0.18 vs. 0.18 ± 0.15 ; $P = 0.003$). Due to group size, risk of by-chance findings cannot be excluded.

Conclusion: The minor A allele at *PLIN4* was associated with higher risk of MS at baseline, whereas the *PLIN6* SNP was associated with better weight loss, suggesting that these polymorphisms may predict outcome strategies based on multidisciplinary treatment for OCA. (*J Clin Endocrinol Metab* 93: 4933–4940, 2008)

The worldwide increasing prevalence of obesity in children and adolescents threatens to affect both their current social integration and their future adult health (1–3) and underscores the urgency to find efficient and successful preventive and therapeutic measures (4).

The basis for this increase in obesity has been attributed to the current obesogenic environment; however, genetic factors (5) play a significant role in both the predisposition to gain as well as the resistance to lose excess body weight.

0021-972X/08/\$15.00/0

Printed in U.S.A.

Copyright © 2008 by The Endocrine Society

doi: 10.1210/jc.2008-0947 Received May 1, 2008. Accepted September 15, 2008.

First Published Online September 23, 2008

Abbreviations: BMI, Body mass index; HDL, high-density lipoprotein; HOMA-IR, homeostasis model assessment for insulin resistance; LD, linkage disequilibrium; LDL, low-density lipoprotein; MS, metabolic syndrome; OCA, obese children and adolescents; OGTT, oral glucose tolerance test; SNP, single-nucleotide polymorphism; TC, total cholesterol; TG, triglyceride; VLDL, very-low-density lipoprotein.

In Brazil, the prevalence of overweight experienced a 3-fold increase in children and adolescents in the period from 1974–1997, especially in urban areas and at the higher end of social class (6). Recently, the Brazilian Consumer Expenditure Survey (2002–2003) estimated that 16.7% of young people (10–19 yr) were affected by overweight, and 2.3% were affected by obesity (7), with the highest prevalence (22.4%) being detected among individuals aged 10–11 yr.

Perilipins are proteins localized at the surface of the lipid droplet in adipocytes, steroid-producing cells, and ruptured atherosclerotic plaques, and they play a key role in the cellular regulation of triglyceride deposition and mobilization (8). Perilipin facilitates the formation and storage of lipids (inhibiting lipolysis) in droplets as well as the increase in lipolysis upon stimulation with catecholamines. Perilipin knockout mouse models are resistant to diet-induced obesity, display reduced body fat, and paradoxically, develop an increased risk of glucose intolerance and peripheral insulin resistance (9). In obese women (compared with normal-weight women), basal and noradrenalin-induced rates of lipolysis were found to be 2- to 4-fold increased, whereas the perilipin content of adipocytes decreased by 50% (10).

In humans, the perilipin gene (*PLIN*) has been localized to chromosomal location 15q26.1 (11), within a region previously linked to obesity, hypertriglyceridemia, and diabetes (12, 13). We have shown that polymorphisms in the *PLIN* locus were associated with obesity-related phenotypes in White, Malay, and Indian women but not in Chinese women (11, 12), and none were found on a large group of French Caucasian men and women (13). Moreover the *PLIN4* 11482 G→A was associated with weight-loss resistance in an obese population (14). Furthermore, in patients with type 2 diabetes treated with rosiglitazone, the variant A of *PLIN4* showed less increase in body weight (15). Most probably, none of the single-nucleotide polymorphisms (SNPs) examined are functional, but they may be in linkage disequilibrium (LD) with so far undetected SNPs. Taken together, the experimental and observational data support the hypothesis that *PLIN* plays an important role in the pathogenesis of obesity and may be involved in human lipid metabolism (16, 17).

In view of the current evidence in adult populations, we investigated whether the *PLIN* locus was associated with anthropometric and metabolic measures and weight reduction in response to a 20-wk behavioral and nutritional recommendation treatment in a group of Brazilian obese children and adolescents (OCA).

Patients and Methods

Patients and study design

Study subjects consisted of 335 OCA aged from 7–14 yr old participating in a 20-wk lifestyle and nutritional reeducation weight-loss program with balanced diet and without weight-loss medication supported by nutritionists, physical therapists, psychologists, and endocrinologists. Of those, 75 didn't conclude the program (22.4%), and 26 were excluded (missing results for laboratory, anthropometric, or genetic measures). Thus, statistical analyses were based on 234 OCA [78 boys and 156 girls, aged 10.7 ± 1.3 yr; body mass index (BMI) = 30.4 ± 4.5 kg/m², BMI Z-score = 2.31 ± 0.28 ; 49% pubescent] randomly selected among those

referred to the Children Obesity's Outpatient Clinic of the Hospital das Clínicas of the University of São Paulo Medical School.

This study included only children and adolescents with a BMI greater than the 95th percentile charts (by age and gender) from Centers for Disease Control growth charts (18). Children with diagnosed endocrine or genetic disease associated with or prone to obesity were excluded from the study. The study was approved by the Institutional Ethical Committee. The patients and their parents were given written and oral complete information about the research project, its purposes, procedures, and potential risks and had signed the consent forms.

Multidisciplinary clinical intervention

Subjects visited monthly the outpatient clinic and had a nutritional and eating behavior group meeting, a personalized nutritional orientation, a personal diet survey, a meeting with a psychologist, a group meeting (six to 10 participants per group) with a physical educator, and a consultation with an endocrinologist. Whenever necessary, the children were invited to consult the clinic psychiatrist. The nutritional course was oriented on recommendations of food-based dietary guidelines considering the dietary habits of children and families, with an average of 1800 kcal/d and no restrictive but balanced diet education program.

Dietary evaluation was based on a 3-d food intake record. In the first visit at the clinic, patients received dietary questionnaires to be filled out at home for three different days, including one weekend day. Patients were responsible for completing the food record, with their parent's supervision. The nutrition team provided appropriate information about portion sizes using graphic examples. The notes were reviewed during treatment to correct possible errors, thereby vetting the information for use to estimate the consumption of the children using the Virtual Nutri version 1.0 for Windows software.

Anthropometric and laboratory measurements

Familial medical history was collected by questionnaire. Weight and height of patients were measured to the nearest 0.1 cm and 0.1 kg, respectively, to establish BMI and BMI Z-score according to the curves of the Centers for Disease Control. Waist circumference was measured at the umbilicus with a nonstretchable tape. Pubertal developmental stage was determined according to the method of Marshall and Tanner (19, 20). Body composition was analyzed by bioelectrical impedance analysis method with body composition analyzer equipment (RJL Systems, Inc., Clinton Township, MI), using an adequately validated formula for age, weight, and height to estimate lean and fat mass (21). Sitting blood pressure was obtained using the right arm after the subject had rested quietly for at least 5 min.

To evaluate the metabolic profile, blood samples were taken via antecubital vein catheter for the measurement of glucose, insulin, total cholesterol (TC), high-density lipoprotein (HDL)-C, low-density lipoprotein (LDL)-C, very-low-density lipoprotein (VLDL)-C, and triglyceride (TG) at fasting. Glucose was determined by an automatic enzymatic colorimetric method using hexokinase (Cobas Integra; Roche, Basel, Switzerland). Insulin was determined by Auto Delfia fluoroimmunoassay (Perkin-Elmer, Turku, Finland). TC, HDL-C, and TG were analyzed by automatic enzymatic colorimetric method (Cobas Mira; F. Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland) using commercial kits from Roche (Mannheim, Germany). LDL-C and VLDL-C were determined by Friedewald formula $VLDL-C = TG/5$ and $LDL-C = TC - (HDL-C + VLDL-C)$. The homeostasis model assessment for insulin resistance (HOMA-IR) was calculated using the following formula: $\text{insulin resistance} = \text{insulin } (\mu\text{U/ml}) \times \text{glucose (mmol/liter)} / 22.5$. Oral glucose tolerance test (OGTT) was performed by giving 1.75 g/kg up to a maximum of 75 g glucose solution and blood withdrawn at 0, 30, 60, 90, and 120 min afterward for the measurement of plasma glucose and insulin. Leptin and adiponectin were evaluated through ELISA kits (Linco Research, St. Louis, MO).

Metabolic syndrome (MS) was defined using the International Diabetes Foundation (IDF) criteria (22), which for the 10- to 16-yr-old age group included obesity at 90th percentile or higher (or adult cutoff if

lower), assessed by waist circumference, and then two of the following: triglycerides at least 150 mg/dl, HDL-C higher than 40 mg/dl, blood pressure at least 130 mm Hg systolic or at least 85 mm Hg diastolic, plasma glucose at least 100 mg/dl (OGTT recommended), or known type 2 diabetes mellitus. We applied these criteria to all children of the study.

PLIN genotyping

The genotyping study was carried out in the Nutrition and Genomics Laboratory, at the Jean Mayer U.S. Department of Agriculture Human Nutrition Research Center on Aging. DNA extraction was performed by standard procedures. Four polymorphisms at the *PLIN* locus were genotyped: *PLIN1* 6209T→C (rs2289487, intron 2), *PLIN4* 11482G→A (rs894160, intron 6), *PLIN5* 13041A→G (rs2304795, exon 8, synonymous), and *PLIN6* 14995A→T (rs1052700, exon 9, untranslated region). Genotyping was carried out using the 5'-nuclease allelic discrimination TaqMan assay with ABI 7900HT system (Applied Biosystems, Foster City, CA). Standard good laboratory practices were undertaken to assure the accuracy of genotype data. Internal controls and repetitive experiments were used. Final success rate for *PLIN* genotyping in the study participants was 99%. This study included OCA randomly selected among those attending the Childhood Obesity's Outpatient Unit in the city of São Paulo, Brazil. The Brazilian population is a very mixed one when considering genetics (23), and because our work is an intervention study comparing the same cohort, we didn't consider evaluating admixture.

Statistical analysis

χ^2 tests were used to verify differences between observed and expected frequencies, assuming Hardy-Weinberg equilibrium, to test LD and differences in percentages. Pairwise LD coefficients were estimated by the HELIX TREE program. D and D' coefficients were calculated. Normal distribution for all continuous variables was tested, and some were logarithmically transformed. At baseline, independent *t* test for independent groups was applied to compare crude means between genotypes. In addition, to estimate and compare adjusted means, analysis of covariance was used to test the null hypotheses of no association between genetic variants and obesity-related phenotypes. For haplotypes, ANOVA and Turkey test were performed. When interactions showed a *P* value <0.05, *post hoc* analyses with Turkey tests were performed. Using the χ^2 test, we investigated association between assessed categorical variables. Logistic regression models were fitted to estimate the hazard ratio with 95% confidence interval. Finally, paired-sample *t* tests were performed to compare variables at baseline and after intervention. All tests were conducted with an $\alpha = 0.05$ and values of *P* < 0.05 were considered significant. Statistical analyses were performed using SPSS software. The power of the sample size was calculated through MINITAB for windows and was evaluated at 85%. The size of the group is small, and the risk of by chance findings cannot be excluded for some of the variables examined.

Results

In the current study, we did not detect gender heterogeneity in the results. Therefore, data for boys and girls were analyzed together. The frequencies for the less common allele of the *PLIN1*, *PLIN4*, *PLIN5*, and *PLIN6* polymorphisms were 0.48, 0.30, 0.38, and 0.26, respectively. Genotype distributions did not deviate from Hardy-Weinberg expectations (supplemental Table 1, published as supplemental data on The Endocrine Society's Journals Online web site at <http://jcem.endojournals.org>). Figure 1 shows the LD plot (D') for the SNPs examined. Strong pairwise LD was observed between the *PLIN1* and the *PLIN4* polymorphisms (D' = 0.99; *P* < 0.001). Conversely, D' for *PLIN5* and *PLIN6* are much lower, and in addition, these SNPs are part of the DNA Block that includes the 3' of the *PLIN* locus. Similar

FIG. 1. Pairwise (D') plots for representative regions of *PLIN* gene for the four SNPs studied: *PLIN1* (rs2289487), *PLIN4* (rs894160), *PLIN5* (rs2304795), and *PLIN6* (rs1052700). Each square in the triangle plots the level of LD between a pair of sites; comparisons between neighboring sites lie along the diagonal. Darker shade indicates strong LD; lighter indicates weak LD.

metabolic and anthropometric results were observed between *PLIN1* and *PLIN4* SNP groups due to their LD, and *PLIN5* SNPs did not reveal any significant associations; therefore, we limited our study to *PLIN4* and *PLIN6*.

Association between *PLIN* SNPs and baseline data

The basal anthropometric, biochemical, and clinical characteristics by genotype are shown in Table 1. No significant allele-related differences in metabolic measures were observed at baseline for *PLIN6* SNPs.

However, there were significant baseline differences for *PLIN4* with higher TG (*P* = 0.003) and lower HDL-C (*P* = 0.003) for the minor A allele. We also observed that the minor A allele of *PLIN4* was associated with higher insulin concentrations (*P* = 0.034) and HOMA-IR measures (*P* = 0.015). No significant associations were observed between these two SNPs and glucose, TC, leptin, and adiponectin concentrations or for body composition results. None of the *PLIN* SNPs showed any association with baseline daily caloric intake (Table 1).

Using the IDF criteria in children, we observed that 44 (19%) of the 232 children and adolescents were classified as having MS (two didn't have all needed measurements available for classification) (Table 2).

At baseline, subjects carrying the minor A allele at *PLIN4* had a significantly higher prevalence of MS (25.9%) compared with 12.1% for the GG genotype.

Hazard ratios for the presence of MS using as reference the wild-type GG for *PLIN4* 11482G→A was evaluated using logistic regression after adjusting for sex, age, and pubertal stage. The MS hazard ratio for the genotype GA was 2.38 (95% confidence interval = 1.1–4.9) and for AA 3.46 (95% confidence interval = 1.2–9.9). There was no difference in MS prevalence for SNP *PLIN6*. These results were confirmed on the whole group at baseline when including children who didn't finish the intervention.

TABLE 1. Anthropometric and metabolic parameters at baseline and after 20 wk intervention according to *PLIN4* and *PLIN6* variants

	<i>PLIN4</i> 11482G→A			<i>PLIN6</i> 14995A→T		
	GG (n = 116)	GA+AA (n = 118)	P	AA (n = 134)	AT+TT (n = 100)	P
Baseline						
Age (yr)	10.7 ± 1.3	10.6 ± 1.3	0.91	10.7 ± 1.4	10.6 ± 1.2	0.83
Weight (kg)	66.8 ± 14.1	69.8 ± 16.5	0.18	69.1 ± 16.3	67.3 ± 14.1	0.43
BMI (kg/m ²)	30.1 ± 3.9	30.6 ± 5.0	0.53	30.7 ± 4.7	30.0 ± 4.1	0.28
BMI Z-score	2.30 ± 0.3	2.32 ± 0.3	0.88	2.32 ± 0.3	2.29 ± 0.3	0.46
Waist circumference (cm)	95.7 ± 9.5	97.1 ± 11.7	0.39	97.1 ± 11.4	95.6 ± 9.6	0.33
Blood pressure systolic (mm Hg)	111 ± 13	113 ± 16	0.42	112 ± 14	112 ± 15	0.99
Blood pressure diastolic (mm Hg)	70 ± 12	70 ± 12	0.80	70 ± 12	71 ± 11	0.35
Fasting glycemia (mg/dl)	85 ± 7	86 ± 8	0.16	85 ± 8	86 ± 7	0.37
Fasting insulin (μU/ml)	16.5 ± 9.8	18.6 ± 9.8	0.03 ^a	18.3 ± 10.3	16.5 ± 9.1	0.20
HOMA-IR	3.5 ± 2.1	4.0 ± 2.3	0.02 ^a	3.9 ± 2.2	3.6 ± 2.2	0.21
TC (mg/dl)	158.3 ± 31.9	159.5 ± 32.0	0.75	159.4 ± 34.1	158.3 ± 28.7	0.98
HDL-C (mg/dl)	43.6 ± 10.1	40.0 ± 9.0	0.003 ^a	42.4 ± 9.9	40.9 ± 9.4	0.27
LDL-C (mg/dl)	95.6 ± 28.1	97.5 ± 29.3	0.64	96.3 ± 29.9	97.0 ± 27.0	0.76
TG (mg/dl)	93.9 ± 42.5	110.7 ± 49.1	0.003 ^a	102.9 ± 46.9	101.6 ± 46.5	0.98
Diet (kcal/d)	1951 ± 648	2001 ± 672	0.69	1946 ± 671	2031 ± 639	0.51
After intervention (20 wk)						
Weight (kg)	64.5 ± 14.5	67.1 ± 15.7	0.19	67.2 ± 16.2	64.0 ± 13.4	0.43
Weight loss (kg)	2.4 ± 3.7	2.7 ± 3.6	0.51	1.9 ± 3.5	3.3 ± 3.7	0.00 ^a
BMI (kg/m ²)	28.3 ± 4.3	28.8 ± 4.8	0.51	29.1 ± 4.9	27.8 ± 3.9	0.04 ^a
BMI Z-score	2.10 ± 0.3	2.12 ± 0.4	0.65	2.14 ± 0.4	2.06 ± 0.3	0.11
BMI loss Z-score	0.21 ± 0.2	0.19 ± 0.1	0.43	0.18 ± 0.1	0.23 ± 0.2	0.01 ^a
Waist circumference (cm)	93.1 ± 9.5	94.5 ± 10.6	0.51	95.5 ± 10.5	91.4 ± 9.0	0.05 ^a
Fasting glycemia (mg/dl)	80 ± 7	80 ± 8	0.75	80 ± 8	80 ± 7	0.56
Fasting insulin (μU/ml)	14.1 ± 7.5	15.0 ± 8.0	0.51	15.5 ± 7.8	13.2 ± 7.6	0.02 ^a
HOMA-IR	2.7 ± 1.4	3.0 ± 1.7	0.43	3.1 ± 1.5	2.6 ± 1.6	0.01 ^a
TC (mg/dl)	156.9 ± 29.0	158.7 ± 33.2	0.79	156.6 ± 32.6	159.3 ± 29.1	0.45
HDL-C (mg/dl)	47.0 ± 10.7	43.6 ± 9.6	0.02 ^a	45.6 ± 10.4	44.8 ± 10.1	0.64
LDL-C (mg/dl)	90.4 ± 27.1	94.6 ± 31.0	0.35	91.2 ± 30.7	94.3 ± 26.9	0.31
TG (mg/dl)	98.7 ± 46.2	102.4 ± 52.1	0.71	100.2 ± 53.9	100.9 ± 42.2	0.60
Diet (kcal/d)	1637 ± 543	1493 ± 549	0.21	1618 ± 551	1474 ± 540	0.25

n = 234.

^a P < 0.05, independent t test.**OGTT**

An OGTT was performed in 229 of the 234 obese children. We didn't observe allele-related differences for glucose; however, the average area under the curve for insulin was significantly higher for carriers of the minor A allele at *PLIN4* ($P = 0.005$). Specifically, A allele carriers had significant or borderline

significantly higher insulin levels at baseline ($P = 0.066$) and 30 ($P = 0.011$), 60 ($P = 0.026$), 90 ($P = 0.086$), and 120 ($P = 0.035$) min after the glucose load (Fig. 2). No significant difference for the insulin response was observed for *PLIN6*.

Associations between *PLIN* and relevant traits after weight-loss intervention

After 20 wk clinical intervention, 226 children and adolescents (96.6%) lowered their BMI Z-score (-0.20 ± 0.16) and their body weight (mean -2.53 kg). Simultaneously, a number of metabolic variables experienced significant improvement, including lowering of insulin and HOMA-IR and increase of HDL in the entire group as well as when considering groups separated per genotype ($P < 0.0001$). We didn't find any allele-related differences for daily caloric intake evaluated at the end of the intervention period (Table 1). Despite this, carriers of the minor T *PLIN6* allele showed a significantly greater weight loss ($P = 0.003$) and loss of BMI Z-score ($P = 0.014$), accompanied by a significant lower waist circumference ($P = 0.05$), lower fasting insulin ($P = 0.02$), and lower HOMA-IR ($P = 0.012$) compared with wild type. Carriers of the A allele at *PLIN4* maintained significantly lower HDL-C levels ($P = 0.005$) when comparing

TABLE 2. Prevalence of MS per polymorphisms *PLIN4* and *PLIN6*

	<i>PLIN4</i> 11482 G→A		<i>PLIN6</i> 14995 A→T	
	GG (%)	GA+AA (%)	AA (%)	AT+TT (%)
MS (IDF criteria) (n = 232)				
Waist circumference ≥90th percentile	99.1	99.1	99.2	99.0
Blood pressure ≥130 SBP or ≥85 DBP (mm Hg)	12.6	22.8	18.0	17.5
Glucose ≥100 mg/dl	2.6	4.3	3.8	3.0
HDL <40 mg/dl	40.5	51.7	43.3	50.0
TG ≥150 mg/dl	10.3	17.8	16.4	11.0
Total (n = 44, 19% have MS)	12.1	25.9	18.2	20.0

DBP, Diastolic blood pressure; IDF, International Diabetes Federation; SBP, systolic blood pressure.

FIG. 2. Line plots of insulin response to OGTT according to *PLIN4* polymorphism: genotype GG compared with carriers of one or two A allele at *PLIN4*.

with wild type and had a significant decrease in TG concentrations ($P = 0.022$).

Haplotype analysis

Two different patterns were found associated with these *PLIN* SNPs in this obese population. Carriers of the minor allele *PLIN4* had a higher-risk metabolic status. Conversely, the SNP *PLIN6* was not associated with a different metabolic status but to a better response to weight loss during the multidisciplinary program. To gain further insight, we divided the group of 234 OCA in four haplotypes groups using the two SNPs

PLIN4 11482G→A and *PLIN6* 14995A→T. The four groups are 1.1 (GA) (35.9%), 1.2 (GT) (13.7%), 2.1 (AA) (21.4%), and 2.2 (AT) (29%) (1 codes the common and 2 codes the presence of minor allele). The anthropometric, biochemical, and clinical characteristics of the study subjects according to the haplotypes are presented in Table 3 for baseline and after intervention.

At baseline

We didn't observe significant differences either for anthropometric measures or for daily caloric ingestion between the four groups. Statistically significant differences

were observed for insulin, HOMA-IR, HDL-C (Fig. 3), and TG (Fig. 3).

The 1.2 haplotype (carrying exclusively the T allele for *PLIN6*) showed a significantly lower HOMA-IR than the three other groups: 1.1 ($P = 0.045$), 2.1 ($P = 0.001$), and 2.2 ($P = 0.009$).

The highest prevalence of MS was 25% for haplotypes 2.1 (AA) and 26.5% for 2.2 (AT), both carrying the minor allele A for *PLIN4*. The two other groups showed a lower prevalence for MS: 14.3% for 1.1 (GA) and a remarkably low 6.3% for 1.2

TABLE 3. Anthropometric and metabolic parameters (baseline and after intervention) for haplotypes *PLIN4* 11482G→A/*PLIN6* 14995A→T

Haplotype <i>PLIN4/PLIN6</i>	GA 1.1 (n = 84, 35.9%)	GT 1.2 (n = 32, 13.7%)	AA 2.1 (n = 50, 21.4%)	AT 2.2 (n = 68, 29%)
Baseline				
Age (yr)	10.7 ± 1.3	10.5 ± 1.4	10.6 ± 1.5	10.7 ± 1.2
Weight (kg)	68 ± 14.6	63.6 ± 12.2	70.9 ± 18.7	69 ± 14.7
BMI (kg/m ²)	30.5 ± 4.1	29.3 ± 3.2	31.1 ± 5.7	30.3 ± 4.4
BMI Z-score	2.31 ± 0.3	2.28 ± 0.2	2.34 ± 0.3	2.30 ± 0.3
Waist circumference (cm)	96.7 ± 9.7	93.2 ± 8.3	97.8 ± 13.8	96.7 ± 10.1
Blood pressure systolic (mm Hg)	111 ± 13	112 ± 13	114 ± 16	112 ± 16
Blood pressure diastolic (mm Hg)	70 ± 13.0	72 ± 10	70 ± 11	70 ± 12
Fasting glycemia (μU/dl)	84 ± 7.4	87 ± 6.7	87 ± 7.5	86 ± 7.6
Fasting insulin (μU/dl)	17.8 ± 10.5	13.3 ± 6.7	19.2 ± 10.1	18.1 ± 9.7
HOMA-IR	3.73 ± 2.2	2.85 ± 1.5	4.15 ± 2.0	3.90 ± 2.4
TC (mg/dl)	158.5 ± 33.4	157.9 ± 28	160.9 ± 35.7	158.5 ± 29.3
HDL-C (mg/dl)	43.55 ± 10.3	43.66 ± 9.8	40.40 ± 9.0	39.66 ± 9.0
LDL-C (mg/dl)	94.83 ± 28.9	97.75 ± 26.2	98.72 ± 31.7	96.57 ± 27.5
TG (mg/dl)	98.45 ± 46.2	81.81 ± 28.2	110.38 ± 47.6	110.96 ± 50.5
Diet (kcal/d)	1935 ± 587	2024 ± 923	1965 ± 811	2033 ± 539
After intervention (20 wk)				
Weight (kg)	66.2 ± 14.7	60 ± 13.0	68.9 ± 18.5	65.8 ± 13.3
Weight loss (kg)	1.90 ± 3.7	3.59 ± 3.6	1.98 ± 3.1	3.20 ± 3.8
BMI (kg/m ²)	28.9 ± 4.4	26.9 ± 3.6	29.4 ± 5.6	28.3 ± 4.0
BMI Z-score	2.13 ± 0.3	2.00 ± 0.3	2.16 ± 0.4	2.10 ± 0.4
BMI loss Z-score	0.18 ± 0.1	0.29 ± 0.2	0.18 ± 0.1	0.20 ± 0.1
Waist circumference (cm)	94.2 ± 9.0	88.8 ± 10.9	98.4 ± 12.9	92.3 ± 8.4
Fasting glycemia (μU/dl)	80 ± 7.4	81 ± 7.4	82 ± 7.9	80 ± 7.4
Fasting insulin (μU/dl)	14.4 ± 7.3	12.9 ± 8.1	17.2 ± 8.4	13.3 ± 7.4
HOMA-IR	2.80 ± 1.3	2.42 ± 1.5	3.49 ± 1.8	2.64 ± 1.6
TC (mg/dl)	156.2 ± 29.4	158.8 ± 28.5	157.5 ± 38	159.5 ± 29.6
HDL-C (mg/dl)	47.21 ± 10.4	46.50 ± 11.5	42.91 ± 10.0	44.05 ± 9.3
LDL-C (mg/dl)	89.53 ± 27.7	92.68 ± 26.0	93.98 ± 35.5	95.03 ± 27.5
TG (mg/dl)	98.85 ± 47.0	98.25 ± 44.8	102.63 ± 64.6	102.20 ± 41.2
Diet (kcal/d)	1664 ± 585	1551 ± 406	1550 ± 505.5	1439 ± 597

FIG. 3. Mean measures for HDL and TG at baseline for haplotypes *PLIN4* 11482G→A/*PLIN6* 14995A→T: haplotypes GA = 1.1, GT = 1.2, AA = 2.1, and AT = 2.2. Independent *t* test, *P* < 0.05.

(GT). The high prevalence of MS of group 2.1 (carrying exclusively the A allele of *PLIN4*) was due to hypertriglyceridemia (20% had TG ≥150 mg/dl) and hypertension (27.7%). We also observed in this group 2.1 a higher prevalence of glucose ≥100 mg/dl, which was doubled compared with the other three groups. We observed that no children from the 1.2 (GT) haplotype had TG levels of 150 mg/dl or higher.

After intervention (Table 3)

The 1.2 haplotype had the best response to weight-loss intervention (loss of BMI Z-score 0.29 ± 0.2 and mean loss of weight 3.59 kg). The 1.2 group had a significantly better loss of BMI Z-score than the three other groups: 1.1 (*P* = 0.009), 2.1 (*P* = 0.011), and 2.2 (*P* = 0.038).

The haplotype 2.1 remained with a significantly higher HOMA-IR than the three other groups: 1.1 (*P* = 0.035), 1.2 (*P* = 0.016), and 2.2 (*P* = 0.018).

Discussion

Our data show that in OCA, the *PLIN* locus is associated with MS risk and with response to a weight-loss program based on dietary and behavioral advice. Specifically, carriers of variant A of *PLIN4* 11482G→A may be at higher risk for MS, whereas being carrier of variant T of *PLIN6* 14995A→T predicts a better weight-loss response to a multidisciplinary behavioral intervention.

For the SNPs studied, there were in our population no significant differences at baseline for either anthropometric mea-

asures or daily caloric ingestion. However, carriers of allele A of *PLIN4* showed a significantly higher hazard ratio for MS, primarily from hypertriglyceridemia and hypertension. This appears to be in contrast with previous reports showing that the minor A allele at *PLIN4* has been associated with lower risk of obesity (11, 12). However, in the presence of obesity, our data support that this allele was associated with a worse metabolic profile consisting of higher TG, lower HDL-C, higher insulin response to the oral glucose load, and higher insulin resistance (HOMA-IR). The influence of *PLIN4* SNP in MS is confirmed by the haplotypes of the SNPs *PLIN4* 11482G→A/*PLIN6* 14995A→T, as shown by the 4-fold prevalence of MS observed among groups 2.1 (AA) and 2.2 (AT), both containing minor allele A at *PLIN4*, as compared with haplotype group 1.2 (GT), containing exclusively the minor allele T at *PLIN6*. We observed that group 1.2 had the lowest prevalence of MS. Previous evidence shows that obese women homozygous for the minor A allele at *PLIN4* had a higher basal and noradrenaline-induced lipolysis and reduced perilipin (10) as compared with wild type. We propose that in our population, despite the potential for a higher lipolysis associated with this allele, the very sedentary life and bad dieting, probably overcame the protection offered by increased fatty acid release from the adipocyte and brought up the metabolic unbalance resulting from nonesterified fatty acids flooding the blood circulation. Therefore, being obese combined with higher lipolysis induces first insulin resistance (24) and followed probably by early type 2 diabetes (25).

After the 20-wk dietary and behavioral intervention, a large variability in responses was observed, and our initial hypothesis was that variability at the *PLIN* locus may be, in part, involved

in this differential response. Indeed, the results from our study support the notion that after intervention, carriers of the minor T allele for the *PLIN6* had a higher mean weight loss (3.3 vs. 1.9 kg) when compared with the wild type and a greater success reducing obesity as measured by the loss of BMI Z-score (10 vs. 7.8%). Moreover, using haplotype analysis, we compared the groups 1.2 (carrying exclusively the T allele of *PLIN6*) and 1.1 (none of the minor alleles) to evaluate the influence of the presence of *PLIN6* variant, and our data show that the baseline MS prevalence in the 1.2 group (6%) was less than half as compared with the 1.1 group (14%). Likewise, BMI Z score after intervention experienced a greater decrease in 1.2 (12.7%) as compared with 1.1 subjects (7.8%). This study is the first to report that *PLIN6* variant has a better response to weight loss in multidisciplinary intervention in obese children, and this observation needs to be validated in an independent sample to verify whether it applies to other populations. Even though *PLIN6* variant was associated with obesity risk in some populations (12, 26), we confirm the findings that this variant was not associated with other MS risk factors. *PLIN6* is located in the 3' region where alternative splicing occurs, altering the transcription product resulting in perilipin isoform (12) with different lipolytic efficiency (27).

A multidisciplinary program of lifestyle and dietary change (28) is described as the best intervention for childhood obesity and successful changes are noted in the majority of the children of our group after 5 months. However, under the common feature of obesity, children differ considerably in their metabolic status, which may drive the diversity in responses observed in this and other multidisciplinary programs. We have shown in this study that the genetic variability at the *PLIN* locus may have a significant effect on response to weight loss.

It should be taken into consideration that the A variant of *PLIN4*, shown as being a protective variant (12, 13, 29) against obesity, could become an obstacle to regain metabolic homeostasis once obesity has been established. This observation is in agreement with a recent finding suggesting that obesity may modify the associations between *PLIN* variations and diabetes risk (30). Whereas our sample size could be considered small, our intervention study is highly controlled, and small sample sizes are often sufficient in this design. However, we need to be very cautious before extrapolating our conclusions to other populations, and replication of our findings is essential.

In conclusion, these findings show that these common *PLIN* polymorphisms may predict outcome strategies based on multidisciplinary treatment for obesity in children and should be considered on a prevention/treatment basis and that preventive counseling with lifestyle changes should be emphasized in overweight children with this *PLIN4* A variant.

Acknowledgments

We sincerely thank research subjects who participated in the study. We also thank the support of Eliana Frazzatto, Mariana Rodrigues, and Barbara Lourenço.

Address all correspondence and requests for reprints to: Sophie Deram, Laboratory of Human Nutrition and Metabolic Disease—LIM-25

of HC-FMUSP, Avenida Doutor Arnaldo, 455, Room 4305, São Paulo-SP, Brazil, CEP 01246-903. E-mail: sophiederam@usp.br.

This work was supported by Grants CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) (Brazil), NIH/NHLBI HL54776 and NIH/NIDDK DK075030, and by contract 58-1950-9-001 from the U.S. Department of Agriculture Research Service.

Disclosure Statement: The authors have nothing to disclose.

References

- Kiess W, Reich A, Muller G, Meyer K, Galler A, Bennek J, Kratzsch J 2001 Clinical aspects of obesity in childhood and adolescence: diagnosis, treatment and prevention. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25(Suppl 1):S75–S79
- Ebbeling CA, Pawlak DB, Ludwig DS 2002 Childhood obesity: public-health crisis, common sense cure. *Lancet* 360:473–482
- Gortmaker SL, Must A, Perrin JM, Sobol AM, Dietz WH 1993 Social and economic consequences of overweight in adolescence and young adulthood. *N Engl J Med* 329:1008–1012
- Barlow SE, Dietz WH 1998 Obesity evaluation and treatment: Expert Committee recommendations. The Maternal and Child Health Bureau, Health Resources and Services Administration and the Department of Health and Human Sciences. *Pediatrics* 102:1–11
- Mutch DM, Clément K 2006 Genetics of human obesity. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 20:647–664
- Wang Y, Monteiro C, Popkin BM 2002 Trends of obesity and underweight in older children and adolescents in the United States, Brazil, China, and Russia. *Am J Clin Nutr* 75:971–977
- IBGE 2006 Consumer Expenditure Survey, 2002–2003: Rio de Janeiro. <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaoodevida/pof/2003medidas/pof2003medidas.pdf> (accessed 20 June 2007)
- Tai ES, Ordoval JM 2007 The role of perilipin in human obesity and insulin resistance. *Curr Opin Lipidol* 18:152–156
- Tansey JT, Szalryd C, Gruia-Gray J, Roush DL, Zee JV, Grailova O, Reitman ML, Deng CX, Li C, Kimmel AR, Londos C 2001 Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:6494–6499
- Mottagui-Tabar S, Ryden M, Lofgren P, Faulds G, Hoffstedt J, Brookes AJ, Andersson I, Arner P 2003 Evidence for an important role of perilipin in the regulation of human adipocyte lipolysis. *Diabetologia* 46:789–797
- Qi L, Corella D, Sorli JV, Portoles O, Shen H, Coltell O, Godoy D, Greenberg AS, Ordoval JM 2004 Genetic variation at the perilipin (*PLIN*) locus is associated with obesity-related phenotypes in white women. *Clin Genet* 66:299–310
- Qi L, Shen H, Larson I, Schaefer EJ, Greenberg AS, Tregouet DA, Corella D, Ordoval JM 2004 Gender-specific association of a perilipin gene haplotype with obesity risk in a white population. *Obes Res* 12:1758–1765
- Meirhaeghe A, Thomas S, Ancot F, Cottel D, Arveiler D, Ferrières J, Amouyel P 2006 Study of the impact of perilipin polymorphisms in a French population. *J Negat Results Biomed* 5:10
- Corella D, Qi L, Sorli JV, Godoy D, Portoles O, Coltell O, Greenberg AS, Ordoval JM 2005 Obese subjects carrying the 11482G>A polymorphism at the perilipin locus are resistant to weight loss after dietary energy restriction. *J Clin Endocrinol Metab* 90:5121–5126
- Kang S, Cha B, Kim H, Kim S, Hur K, Lee H, Shim W, Ahn C, Lee HC 2006 The 11482G>A polymorphism in the perilipin gene is associated with weight gain with rosiglitazone treatment in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 29:1320–1324
- Yan W, Chen S, Huang J, Shen Y, Qiang B, Gu D 2004 Polymorphisms in *PLIN* and hypertension combined with obesity and lipid profiles in Han Chinese. *Obes Res* 12:1733–1737
- Perez-Martinez P, Lopez-Miranda J, Perez-Jimenez F, Ordoval JM 2008 Influence of genetic factors in the modulation of postprandial lipemia. *Atheroscler Suppl* 9:49–55
- US Department of Health and Human Services 2000 CDC growth charts: United States. <http://www.cdc.gov/growthcharts/>
- Marshall WA, Tanner JM 1969 Variations in the pattern of pubertal changes in girls. *Arch Dis Child* 44:291–303
- Marshall WA, Tanner JM 1970 Variations in the pattern of pubertal changes in boys. *Arch Dis Child* 45:13–23
- Pecoraro P, Guida B, Caroli M, Trio R, Falconi C, Principato S, Pietroboli A 2003 Body mass index and skinfold thickness versus bioimpedance analysis: fat mass prediction in children. *Acta Diabetol* 40(Suppl 1):S278–S281

22. Zimmet P, Alberti G, Kaufman F, Tajima N, Silink M, Arslanian S, Wong G, Bennett P, Shaw J, Caprio S; International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention of Diabetes 2007 The metabolic syndrome in children and adolescents. *Lancet* 369: 2059–2061
23. Pimenta JR, Zuccherato LW, Debes AA, Maselli L, Soares RP, Moura-Neto RS, Rocha J, Bydlowski SP, Pena SD 2006 Color and genomic ancestry in Brazilians: a study with forensic microsatellites. *Hum Hered* 62:190–195
24. Avramoglu RK, Basciano H, Adeli K 2006 Lipid and lipoprotein dysregulation in insulin resistant states. *Clin Chim Acta* 368:1–19
25. Ten S, Maclaren N 2004 Insulin resistance syndrome in children. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2526–2539
26. Qi L, Tai ES, Tan CE, Shen H, Chew SK, Greenberg AS, Corella D, Ordovas JM 2005 Intragenic linkage disequilibrium structure of the human perilipin gene (*PLIN*) and haplotype association with increased obesity risk in a multiethnic Asian population. *J Mol Med* 83: 448–456
27. Jang Y, Kim OY, Lee JH, Koh SJ, Chae JS, Kim JY, Park S, Cho H, Lee JE, Ordovas JM 2006 Genetic variation at the perilipin locus is associated with changes in serum free fatty acids and abdominal fat following mild weight loss. *Int J Obes (Lond)* 30:1601–1608
28. Suskind RM, Blecker U, Udall Jr JN, Von Almen TK, Schumacher HD, Carlisle L, Sothorn MS 2000 Recent advances in the treatment of childhood obesity. *Pediatr Diabetes* 1:23–33
29. Perez-Martinez P, Yiannakouris N, Lopez-Miranda J, Arnett D, Tsai M, Galan E, Straka R, Delgado-Lista J, Province M, Ruano J, Borecki I, Hixson J, Garcia-Bailo B, Perez-Jimenez F, Ordovas JM 2008 Postprandial triacylglycerol metabolism is modified by the presence of genetic variation at the perilipin (*PLIN*) locus in 2 white populations. *Am J Clin Nutr* Mar 87:744–752
30. Qi L, Zhang C, Greenberg A, Hu FB 2008 Common variation in perilipin gene, central obesity, and risk of type 2 diabetes in US women. *Obesity (Silver Spring)* 16:1061–1065

ANEXO 2

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 14.02.07, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa **nº 1025/06**, intitulado: **"POLIMORFISMO DO GENE DA PERILIPINA EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES OBESOS"**, apresentado pelo Departamento **de CLÍNICA MÉDICA**, inclusive Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador (a) Responsável: **SANDRA MARA FERREIRA VILLARES**

Pesquisador (a) Executante: **SOPHIE MARIE MICHELE DERAM**

CAPPesq, 14 de fevereiro de 2007.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

ANEXO 3

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CAIXA POSTAL, 8091 – SÃO PAULO - BRASIL

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

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

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

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA

POLIMORFISMOS DO GENE DA PERILIPINA EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES
OBESAS

.....
 PESQUISADOR: Sophie Marie Michele Deram

CARGO/FUNÇÃO: Nutricionista INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº CRN 21065

UNIDADE DO HCFM-USP: Departamento de Clínica Médica – Disciplina de Endocrinologia & Metabologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO RISCO MÍNIMO X RISCO MÉDIO
 RISCO BAIXO RISCO MAIOR

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 4 anos

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

1. Objetivos da pesquisa: Procurar o material genético chamado Perilipina que pode causar obesidade, diabetes, pressão alta e outras alterações.
2. O sangue será colhido no início e final dos cinco meses de acompanhamento do paciente. Da amostra de sangue, será extraído o material genético e realizados exames para procurar as alterações e doenças como diabetes.
3. Pode-se sentir desconforto pela picada da agulha para coleta de sangue.
4. As crianças serão acompanhadas mensalmente durante 5 primeiros meses e após conforme necessidade individual, recebendo orientações e tratamento de suas doenças com equipe composta por profissionais de várias áreas.
5. Os pacientes com modificações da perilipina serão especialmente orientados em relação ao risco de desenvolvimento de diabetes, obesidade e resistência à perda de peso.

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

1. Será fornecido acesso a qualquer tempo às informações relacionadas à pesquisa
2. Pode-se retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem prejuízo à continuidade da assistência.
3. Os dados pessoais fornecidos pelo paciente e os resultados durante a pesquisa são confidenciais.
4. Se acontecerem danos à saúde por causa da pesquisa, o LIM25, laboratório de Estudos Moleculares da Obesidade colocará assistência a disposição do paciente
5. No caso desta pesquisa não cabe indenização, porque somente será utilizado sangue coletado juntamente com os exames de rotina do ambulatório.

Dra Sandra Mara Ferreira Villares

Av Dr Arnaldo, 455 4 Andar Sala 4305

CEP: 01246-903 Telefone: (11) 3061-7253 ramal 18

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

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

São Paulo, de de 20.... .

assinatura do sujeito da pesquisa ou
responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

ANEXO 4

Registro do Consumo Alimentar - RCA

Orientações para o preenchimento do RCA

1. Registrar os alimentos e líquidos ingeridos por 3 dias, sendo dois dias de semana e um do fim de semana (sábado ou domingo);
2. Escolha três dias da mesma semana (ex: segunda, quinta e sábado);
3. Não deixe de preencher o cabeçalho da folha, com o nome da criança e a data correspondente ao dia do registro;
4. Para não haver esquecimento, o registro deve ser feito imediatamente após o consumo ou o mais rápido possível;
5. A criança é responsável pelo preenchimento;
6. Os pais (ou responsável) devem supervisionar e auxiliar;
7. O responsável pelo paciente deve assegurar-se de que não faltou nenhuma informação e revisar o dia com a criança, checando os alimentos descritos e as quantidades;
8. Na primeira coluna, anotar a refeição (café da manhã, lanche, almoço ou jantar), o local e o horário
9. Na segunda coluna anotar o alimento e descrever o alimento ou a forma de preparo;
10. Na terceira coluna descrever a quantidade. Especificar as unidades consumidas e, quando for o caso, descrever em medidas caseiras (xícara de chá, xícara de café, copo de requeijão, copo americano, colher de sopa, colher de chá, pires, prato de sobremesa, concha, escumadeira, etc...).
11. O RCA deve ser entregue às nutricionistas no dia da primeira consulta.

NÃO ESQUEÇA DE TRAZÊ-LO!!!!

Registro do Consumo Alimentar- RCA

Nome: _____ Data: ____/____/____

Refeição (local/horário)	Alimento	Quantidade

8 REFERÊNCIAS

-
- ¹ Gregoire FM. Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell. *Exp Biol Med* 2001 Dec; 226(11):997-1002
- ² Ravussin E, Gautier JF. Metabolic predictors of weight gain. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999 Feb; 23(1):37-41
- ³ Goran MI. Energy metabolism and Obesity. *Méd Clin North Am* 2000 Mar; 84(2):347-362
- ⁴ Hedley AA, Ogden CL, Johnson CL, Carroll MD, Lester R, Flegal K. Prevalence of overweight and obesity among US children, adolescents, and adults, 1999–2002. *JAMA*. 2004;291:2847–50.
- ⁵ DeOnis M, Blossner M. Prevalence and trends of overweight among preschool children from developing countries. *Am J Clin Nutr*. 2000;72:1032-39
- ⁶ Wang Y, Monteiro C, Popkin BM. Trends of obesity and underweight in older children and adolescents in the United States, Brazil, China and Russia. *Am J Clin Nutr*. 2002; 75:971-7.
- ⁷ IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Antropometria e análise do estado nutricional de crianças e adolescentes no Brasil. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2002-2003. Rio de Janeiro, 2006.
- ⁸ Passos MA, Cintra I, Branco L, Machado H, Fisberg M. Body mass index percentiles in adolescents of the city of São Paulo, Brazil, and their comparison with international parameters *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2010; 54/3.
- ⁹ Ebbeling CA, Pawlak DB, Ludwig DS. Childhood obesity: public-health crisis, common sense cure. *Lancet* 2002; 360:473-82.
- ¹⁰ Greenberg AS, Oben MS. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *Am J Clin Nutr* 2006; 83 (suppl): 461S-5S.
- ¹¹ Daniels SR, Arnett DK, Eckel RH, Gidding SS, Hayman LL, Kumanyika S et al. Overweight in children and adolescents: pathophysiology, consequences, prevention, and treatment. *Circulation* 2005; 111:1999-2012.
- ¹² August GP, Caprio S, Fennoy I, Freemark M, Kaufman FR, Lustig RH, et al; Endocrine Society. Prevention and treatment of pediatric obesity: an endocrine society clinical practice guideline based on expert opinion. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008 Dec;93(12):4576-99.

-
- ¹³ Speiser PW, Rudolf MCJ, Anhalt H, Camacho-Hubner C, Chiarelli F, Eliakim A et al. Consensus Statement: Childhood obesity. *J Endocrinol Metab.* 2005. 90:1871-87.
- ¹⁴ Lobstein T, Baur L, Uauy R. Obesity in children and young people: a crisis in public health. *Obes Rev.* 2004; 5(suppl):4-85.
- ¹⁵ Mello ED, Luft VC., Obesidade infantil: como podemos ser eficazes? *Jornal de Pediatria.* 2004; 80:173-82.
- ¹⁶ Wadden TA, Butryn ML, Byrne KJ. Efficacy of lifestyle modification for long term weight control. *Obesity research.* 12 (Suppl):151S-162S.
- ¹⁷ Boog, MC. Educação nutricional: passado, presente, futuro. *Rev Nutr. Puccamp.* 1997; 10(1):5-19.
- ¹⁸ Powers SK et al. Mensuração do Trabalho, da Potência e do Gasto Energético. In: *Fisiologia do Exercício: Teoria e Aplicação ao Condicionamento e ao Desempenho.* São Paulo: Ed Manole, 2000.
- ¹⁹ Costa ML, Speridião PGL, Fagundes Neto U. Gasto energético. The eletronic journal of pediatric, gastroenterology, nutrition and liver disease. 2007, 11. [cited 2007 sep 22] Available from: http://www.e-gastroped.com.br/mar07/gasto_energetico.htm7
- ²⁰ Freedmann MR, King J, Kennedy E. Popular diets: a scientific rewiew. *Obes Res.* 2001; 19 (Suppl): 1-40.
- ²¹ Dansinger ML; Gleason JÁ; Grifith JL. Selker HP; Scafer EJ. Comparision of the Atkins, Ornish, Weight watchers and zone diets for weight loss and heart disease risk reduction. *JAMA.* 2005; 293:43-54.
- ²² Noble CA, Kushner RF. An update on low carbohydrate, high protein diets. *Curr Opin Gastrol.* 2006; 22:156-9.
- ²³ Word Health Organization. *Obesity: preventing and managing the global epidemic.* Genebra: WHO; 1997.
- ²⁴ Brasil - Ministério sa Saúde. Guia Alimentar para a população brasileira. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.
- ²⁵ Spielgeman BM, Flier JS. Adipogenesis and obesity:rounding out the big Picture. *Cell* 1996; 87: 377-389
- ²⁶ Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. Recombinant Mouse ob Protein: Evidence for a Peripheral Signal Linking Adiposity and Central Neural Networks. *Science.* 1995;269:546-49

-
- ²⁷ Zhang Y, Proença R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional Cloning of the Mouse obese gene and its Human Homologue. *Nature*. 1994;372:425-32
- ²⁸ Frayn KN, Karpe F, Fielding BA, MacDonald IA, Coppack SW. Integrative physiology of human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003; 27: 875–888.
- ²⁹ Nielsen S, Guo Z, Albu JB, Klein S, O'Brien PC, Jensen MD. Energy expenditure, sex, and endogenous fuel availability in humans. *J Clin Invest* 2003; 111: 981–988.
- ³⁰ A. Guilherme, J.V. Virbasius, V. Puri, M.P. Czech, Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 2008; 367–377.
- ³¹ R.H. Unger. Lipotoxic diseases, *Annu. Rev. Med.* 53 2002 319–336.
- ³² J.E. Schaffer. Lipotoxicity: when tissues overeat, *Curr. Opin. Lipidol.* 14 2003 281–287.
- ³³ Brasaemle D, Dolios G, Shapiro L, Wang R, Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes, *J. Biol. Chem.* 279 2004; 46835–46842.
- ³⁴ Brasaemle D., Subramanian V., Garcia A., Marcinkiewicz A., Rothenberg A. Perilipin A and the control of triacylglycerol metabolism. *Mol Cell Biochem.* 2009 Jun;326(1-2):15-21
- ³⁵ C. Londos, C. Sztalryd, J.T. Tansey, A.R. Kimmel. Role of PAT proteins in lipid metabolism, *Biochimie* 87 2005; 45–49.
- ³⁶ N.A. Ducharme, P.E. Bickel, Lipid droplets in lipogenesis and lipolysis, *Endocrinology* 149 2008; 942–949.
- ³⁷ Kimmel A, Brasaemle D, McAndrews-Hill M, Sztalryd C, Londos C. Adoption of PERILIPIN as a unifying nomenclature for the mammalian PAT-family of intracellular lipid storage droplet proteins. *J Lipid Res.* 2010 Mar;51(3):468-71.
- ³⁸ Arner P. Human fat cell lipolysis: Biochemistry, regulation and clinical role. *Best practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2005; Vol. 19. No. 4, pp. 471-482.
- ³⁹ Fredrikson G, Tornqvist H, Belfrage B, Hormone-sensitive lipase and monoacylglycerol lipase are both required for complete degradation of adipocyte triacylglycerol, *Biochim. Biophys. Acta* 876 (1986) 288–293.

-
- ⁴⁰ Carey GB. Mechanisms regulating adipocyte lipolysis. *Advanced in Experimental Medicine and Biology* 1998; 441:157-170.
- ⁴¹ Tansey JT, Sztalryd C, Hlavin EM, Kimmel AR, Londos C. The central role of perilipin a in lipid metabolism and adipocyte lipolysis. *IUBMB Life*. 2004 Jul;56(7):379-85. Review.
- ⁴² Gaidhu MP, Anthony NM, Patel P, Hawke TJ, Ceddia RB. Dysregulation of lipolysis and lipid metabolism in visceral and subcutaneous adipocytes by high-fat diet: role of ATGL, HSL, and AMPK. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010 Apr;298(4):C961-71.
- ⁴³ Londos C, Brasaemle DL, Gruia-Gray J, Servetnick DA, Schultz CJ, Levin DM et al. Perilipin: unique proteins associated with intracellular neutral lipid droplets in adipocytes and steroidogenic cells. *Biochem Soc Trans* 1995 Aug; 23: 611–615.
- ⁴⁴ Hagström-Toft E, Qvisth V, Nennesmo I, Rydén M, Bolinder H, Enoksson S, Bolinder J, Arner P. Marked heterogeneity of human skeletal muscle lipolysis at rest. *Diabetes* 2002 Dec; 51(12):3376-83.
- ⁴⁵ Forcheron F, Legedz L, Chinetti G, Feugier P, Letexier D, Bricca G, Beylot M. Genes of cholesterol metabolism in human atheroma: overexpression of perilipin and genes promoting cholesterol storage and repression of ABCA1 expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Aug; 25(8):1711-7.
- ⁴⁶ Fujii H, Ikura Y, Arimoto J, Sugioka K, Iezzoni JC, Park SH et al. Expression of perilipin and adipophilin in nonalcoholic fatty liver disease; relevance to oxidative injury and hepatocyte ballooning. *J Atheroscler Thromb*. 2009; 16(6):893-901.
- ⁴⁷ Greenberg A., Egan j., Wek S., Garty N., Blanchette-Mackie E., Londos C. Perilipin, a Major Hormonally regulated Adipocyte-specific Phosphoprotein Associated with the Periphery of Lipid Storage Droplets. *J Biol Chemistry* 1991; Vol266,No17.June,11341-11346
- ⁴⁸ Brasaemle DL. Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J Lipid Res*. 2007 Dec;48(12):2547-59. Review.
- ⁴⁹ Nishiu J, Tanaka T, Nakamura Y. Isolation and chromosomal mapping of the human homolog of Perilipin (PLIN), a rat adipose tissue-specific gene, by differential display Method. *Genomics* 1998 Mar; 48,254-257
- ⁵⁰ Brasaemle D, Rubin B, Harten I, Gruia-Gray J, Kimmel A, Londos C. Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis. *J Biol Chem* 2000; 275: 38486–38493.

-
- ⁵¹ Garcia A, Subramanian V, Sekowski A, Bhattacharyya S, Love MW, Brasaemle DL. The amino and carboxyl termini of perilipin facilitate the storage of triacylglycerols. *J Biol Chem*. 2004 Feb 27;279(9):8409-16.
- ⁵² Souza SC, de Vargas LM, Yamamoto MT, Lien P, Franciosa MD, Moss LG et al. Overexpression of perilipin A and B blocks the ability of tumor necrosis factor to increase adipocyte lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 1998; 273(38): 24665–24669.
- ⁵³ Tansey J, Sztalryd C, Gruia-Gray J, Roush DL, Zee JV, Gavrilova O et al. Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet induced obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001 May; 98:6494–6499.
- ⁵⁴ Zhang, H. H., S. C. Souza, K. V. Muliuro, F. B. Kraemer, M. S. Obin, and A. S. Greenberg. Lipase-selective functional domains of perilipin A differentially regulate constitutive and protein kinase A-stimulated lipolysis. *J Biol Chem* 2003. **278**: 51535-51542.
- ⁵⁵ Miyoshi, H., S. C. Souza, H. H. Zhang, K. J. Strissel, M. A. Christoffolete, J. Kovan, A. Rudich, F. B. Kraemer, A. C. Bianco, M. S. Obin, and A. S. Greenberg. Perilipin promotes hormone-sensitive lipase-mediated adipocyte lipolysis via phosphorylation-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem* 2006. **281**: 15837-15844.
- ⁵⁶ Sztalryd, C., G. Xu, H. Dorward, J. T. Tansey, J. A. Contreras, A. R. Kimmel, and C. Londos. Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation. *J Cell Biol*. 2003. **161**: 1093-1103.
- ⁵⁷ Martinez-Botas J, Anderson J, Tessier D, Lapillone A, Chang BH, Quast MJ et al. Absence of perilipin results in leanness and reverses obesity in *Lepr*(db/db) mice. *Nat Genet* 2000 Dec; 26: 474–479.
- ⁵⁸ Zhai W, Xu C, Ling Y, Liu S, Deng J, Qi Y, et al. Increased lipolysis in adipose tissues is associated with elevation of systemic free fatty acids and insulin resistance in perilipin null mice. *Horm Metab Res*. 2010 Apr;42(4):247-53.
- ⁵⁹ Miyoshi H, Souza SC, Endo M, Sawada T, Perfield JW 2nd, Shimizu C, et al. Perilipin overexpression in mice protects against diet-induced obesity. *J Lipid Res*. 2010 May;51(5):975-82.
- ⁶⁰ Sztalryd C, Xu G, Dorward H, Tansey JT, Contreras JA, Kimmel AR et al. Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation. *J Cell Biol* 2003 Jun 23; 161(6):1093-1103.
- ⁶¹ Carmen G., Victor S. Signalling mechanisms regulating lipolysis. *Cellular Signalling*, 2006 Apr; 18(4): 401-408.

-
- ⁶² Londos C, Gruia-Gray J, Brasaemle DL, Rondinone CM, Takeda T, Dwyer NK et al. Perilipin: possible roles in structure and metabolism of intracellular neutral lipids in adipocytes and steroidogenic cells. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1996 Mar; 20 Suppl 3:S97-101. Review.
- ⁶³ Zimmermann R, Lass A, Haemmerle G, Zechner R. Fate of fat: The role of adipose triglyceride lipase in lipolysis. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Jun;1791(6):494-500.
- ⁶⁴ Yamaguchi T, Osumi T. Chanarin-Dorfman syndrome: Deficiency in CGI-58, a lipid droplet-bound coactivator of lipase. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Jun;1791(6):519-23.
- ⁶⁵ Large V, Peroni O, Letexier D, Ray H, Beylot M. Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes Metab*. 2004 Sep;30(4):294-309. Review.
- ⁶⁶ Souza SC, de Vargas LM, Yamamoto MT, Lien P, Franciosa MD, Moss LG, Greenberg AS. Overexpression of perilipin A and B blocks the ability of tumor necrosis factor alpha to increase lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*. 1998 Sep 18;273(38):24665-9.
- ⁶⁷ Arimura N, Horiba T, Imagawa M, Shimizu M, Sato R. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulates expression of the perilipin gene in adipocytes. *J Biol Chem*. 2004 Mar 12;279(11):10070-6.
- ⁶⁸ Dalen KT, Schoonjans K, Ulven S, Weedon-Fekjaer M, Bentzen T, Koutnikova H, Auwerx J, Nebb H. Adipose tissue expression of the lipid droplet- associating proteins S3-12 and perilipin is controlled by peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *Diabetes* 2004 May; vol. 53
- ⁶⁹ Nagai S, Shimizu C, Umetsu M, Taniguchi S, Endo M, Miyoshi H, et al. Identification of a functional peroxisome proliferator-activated receptor responsive element within the murine perilipin gene. *Endocrinology*. 2004 May;145(5):2346-56.
- ⁷⁰ Ke Y, Qiu J, Ogus S, Shen WJ, Kraemer FB, Chehab FF. Overexpression of leptin in transgenic mice leads to decreased basal lipolysis, PKA activity, and perilipin levels. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Dec 26;312(4):1165-70.
- ⁷¹ Kern P., Di Gregório G., Lu T., Rassouli N., Ranganathan G. Perilipin Expression in Human Adipose Tissue Is Elevated with Obesity. *The J. Clin. Endo & Metab*. 2004 89(3): 1352-1358.
- ⁷² Mottagui-Tabar S, Rydén M, Löfgren P, Faulds G, Hoffstedt J, Brookes AJ, Andersson I, Arner P. Evidence for an important role of perilipin in the regulation of human adipocyte lipolysis. *Diabetologia*. 2003 Jun;46(6):789-97.

-
- ⁷³ Wang Y, Sullivan S, Trujillo M, Lee MJ, Schneider SH, Brodin RE et al. Perilipin expression in human adipose tissues: effects of severe obesity, gender, and depot. *Obes Res*. 2003 Aug;11(8):930-936.
- ⁷⁴ Mori Y, Otabe S, Dina C, Yasuda K, Populaire C, Lecoœur C et al. Genome-wide search for type 2 diabetes in Japanese affected sib-pairs confirms susceptibility genes on 3q, 15q, and 20q and identifies two new candidate loci on 7p and 11p. *Diabetes* 2002 Apr; 51(4): 1247–1255.
- ⁷⁵ Duggirala R, Blangero J, Almasy L, Dyer TD, Williams KL, Leach RJ et al. A major susceptibility locus influencing plasma triglyceride concentrations is located on chromosome 15q in Mexican Americans. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 1237–1245.
- ⁷⁶ Lu X, Gruia-Gray J, Copeland NG, Gibert DJ, Jenkins NA, Londos C et al. The murine perilipin gene: the lipid droplet-associated perilipins derive from tissue-specific, mRNA splice variants and define a gene of ancient origin. *Mamm Genome* 2001 Sept; 12(9): 741–749.
- ⁷⁷ Qi L., Corella D., Sorli JV., Portoles O., Shen H., Coltell O., Godoy D., Greenberg AS., Ordovas JM.. Genetic variation at the perilipin (PLIN) locus is associated with obesity-related phenotypes in White women. *Clin Genet* 2004; 66:299-310.
- ⁷⁸ Qi L, Tai ES, Tan CE, Shen H, Chew SK, Greenberg AS et al. Intragenic linkage disequilibrium structure of the human perilipin gene (PLIN) and haplotype association with increased obesity risk in a multiethnic Asian population. *J Mol Med* 2005;83(6): 448–456.
- ⁷⁹ Qi L, Shen H, Larson I, Schaefer EJ, Greenberg AS, Tregouet DA, Corella D, Ordovas JM. Gender-specific association of a perilipin gene haplotype with obesity risk in a white population. *Obes Res* 2004 Nov; 12(11):1758-65.
- ⁸⁰ Yan W, Chen S, Huang J, Shen Y, Qiang B, Gu D. Polymorphisms in PLIN and hypertension combined with obesity and lipid profiles in Han Chinese. *Obes Res*. 2004 Nov;12(11):1733-7.
- ⁸¹ Meirhaeghe A, Thomas S, Ancot F, Cottel D, Arveiler D, Ferrières J et al. Study of the impact of perilipin polymorphisms in a French population. *J Negat Results Biomed* 2006 Jul; 12;5:10.
- ⁸² Corella D, Qi L, Sorli J, Godoy D, Portoles O, Coltell O et al. Obese subjects carrying the 11482G>A polymorphism at the Perilipin Locus are resistant to weight loss after dietary energy restriction. *J Clin Endocrinol Metab* 2005 Sep; 90(9): 5121-5126.
- ⁸³ Deram S, Nicolau CY, Perez-Martinez P, Guazzelli I, Halpern A, Wajchenberg BL, Ordovas JM, Villares SM. Effects of perilipin (PLIN) gene variation on

metabolic syndrome risk and weight loss in obese children and adolescents. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 Dec; 93(12):4933-40.

⁸⁴ NCHS - National Center for Health Statistics [on line]. CDC Growth Charts. Hyattsville, MD: U.S. Centers for Disease Control and Prevention, 2000. <http://www.cdc.gov>

⁸⁵ Crawford PB, Obarzanek E, Morrison J, Sabry ZI. Comparative advantage of 3-day food records over 24-hour recall and 5-day food frequency validated by observation of 9- and 10-year-old girls. *J Am Diet Assoc.* 1994 Jun;94(6):626-30.

⁸⁶ Sharma S, Roberts LS, Lustig RH, Fleming SE. Carbohydrate intake and cardiometabolic risk factors in high BMI African American children. *Nutr Metab (Lond).* 2010 Feb 9;7(1):10

⁸⁷ Aeberli I, Spinass GA, Lehmann R, l'Allemand D, Molinari L, Zimmermann M. Diet determines features of the metabolic syndrome in 6- to 14-year-old children. *Int J Vitam Nutr Res.* 2009 Jan;79(1):14-23.

⁸⁸ Philippi ST, Szarfarc SC, Latterza AR. *Virtual Nutri [programa de computador]. Versão 1.0 for Windows.* São Paulo: Departamento de Nutrição Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 1996.

⁸⁹ NCHS - National Center for Health Statistics [on line]. [cited 2007 aug 24] disponível em <http://www.cdc.gov/growthcharts>

⁹⁰ Deram SM, Nicolau CYM, Frazzatto E, Guazzelli IC, Halpern A, Villares SMF. Children obesity, insulin resistance and effect on weight-loss. *Int J Obes.* 2007;31:S164

⁹¹ Weiss R, Dziura J, Burgert TS, Tamborlane WV, Taksali SE, Yeckel CW, et al. Obesity and the metabolic syndrome in children and adolescents. *N Engl J Med.* 2004; 350:2362-74

⁹² Fernandez JR, Redden DT, Pietrobelli A, Allison DB. Waist circumference percentiles in nationally representative samples of African-American, European-American, and Mexican-American children and adolescents. *J Pediatr* 2004 Oct; 145(4):439-44.

⁹³ Type 2 diabetes in children and adolescents. American Diabetes Association. *Pediatrics.* 2000;105:671-80

⁹⁴ Ten S, Maclaren N. Insulin resistance in children. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:2526-39

⁹⁵ Goran MI, Gower BA. Longitudinal study on pubertal insulin resistance. *Diabetes.* 2001;50:2444-50

-
- ⁹⁶ 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;18: 499–502.
- ⁹⁷ Cook S, Weitzman M, Auinger P, Nguyen M, Dietz WH. Prevalence of a metabolic syndrome phenotype in adolescents: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2003; 157:821-27
- ⁹⁸ Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentration in man. *Diabetologia* 1985;28:412-19
- ⁹⁹ Zimmet P, Alberti G, Kaufman F, Tajima N, Silink M, Arslanian S et al. The metabolic syndrome in children and adolescents. *Lancet* 2007 Jun; 369:2059-61.
- ¹⁰⁰ The Fourth Report on the diagnosis, evaluation, and treatment of high blood pressure in children and adolescents. National high blood pressure education program working group on high blood pressure in children and adolescents. *Pediatrics*. 2004;114:555-76
- ¹⁰¹ Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16:1215.
- ¹⁰² Soenen S, Mariman EC, Vogels N, Bouwman FG, den Hoed M, Brown L, Westerterp-Plantenga MS. Relationship between perilipin gene polymorphisms and body weight and body composition during weight loss and weight maintenance. *Physiol Behav*. 2009 Jan 21.
- ¹⁰³ Zeggini E, Barton A, Eyre S, Ward D, Ollier W, Worthington J, John S. Characterisation of the genomic architecture of human chromosome 17q and evaluation of different methods for haplotype block definition. *BMC Genet*. 2005 Apr 25;6:21.
- ¹⁰⁴ Jansen I, Katzmarzyk PT, Ross R. Waist circumference and not body mass index explains obesity-related health risk. *Am J Clin Nutr*. 2005;79:379-84
- ¹⁰⁵ Despres JP, Lamarche B, Mauriege P, Cantin B, Lupien PJ, Dagenais GR. Risk factors for ischaemic heart disease: is it time to measure insulin? *Eur Heart J*. 1996;17:1453–54 (Editorial)
- ¹⁰⁶ Jiang X, Srinivasan SR, Webber LS, Wattigney WA, Berenson GS. Association of fasting insulin levels with serum lipid and lipoprotein levels in children, adolescents, and young adults: the Bogalusa study. *Arch Int Med* 1995;155:190-96

-
- ¹⁰⁷ Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PWF, Abbott RD, Kalousdian S, Kannel WB. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels: the Framingham Study. *JAMA*. 1986;256:2835-38
- ¹⁰⁸ Steinberger J. Diagnosis of metabolic syndrome in children. *Curr Op Lipidol*. 2003; 14:555-9.
- ¹⁰⁹ Uli N, Sundararajan S, Cuttler L. Treatment of childhood obesity. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2008 Feb;15(1):37-47. Review.
- ¹¹⁰ Oude Luttikhuis H, Baur L, Jansen H, Shrewsbury VA, O'Malley C, Stolk RP, Summerbell CD. Interventions for treating obesity in children. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009 Jan 21;(1):CD001872. Review.
- ¹¹¹ Fitch A, Bock J. Effective dietary therapies for pediatric obesity treatment. *Rev Endocr Metab Disord*. 2009 Sep;10(3):231-6.
- ¹¹² An JY, Hayman LL, Park YS, Dusaj TK, Ayres CG. Web-based weight management programs for children and adolescents: a systematic review of randomized controlled trial studies. *ANS Adv Nurs Sci*. 2009 Jul-Sep;32(3):222-40.
- ¹¹³ Rolland-Cachera MF, Thibault H, Souberbielle JC, Souli D. Massive obesity in adolescents: dietary interventions and behaviours associated with weight regain at 2 y follow-up. *Intern J Obes*. 2004; 25:514-9.
- ¹¹⁴ Bautista-Castaño I, Doreste J, Serra-Majen L. Effectiveness of interventions in the prevention of childhood obesity. *Eur J Epidemiol*. 2004; 19: 617-22.
- ¹¹⁵ Reinehr T, Widhalm K, l'Allemand D, Wiegand S, Wabitsch M, Holl RW; APV-Wiss Study Group and German Competence Net Obesity Two-year follow-up in 21,784 overweight children and adolescents with lifestyle intervention.. *Obesity (Silver Spring)*. 2009 Jun;17(6):1196-9.
- ¹¹⁶ Dao HH, Frelut ML, Oberlin F, Peres G, Bourgeois P, Navarro J. Effects of a multidisciplinary weight loss intervention on body composition in obese adolescents. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2004 Feb;28(2):290-9.
- ¹¹⁷ Fontanive RS, Costa RS, Soares EA. Comparison between the nutritional status of eutrophic and overweight adolescents living in Brazil. *Nutr Res*. 2002; 22:667-678.
- ¹¹⁸ Goris AHC, Westerterp KR. Improved reporting of habitual food intake after confrontation with earlier results on food reporting. *Br J Nutr*. 2000; 83:363-9
- ¹¹⁹ Nemet D, Barkan S, Epstein Y, Friedland O, Kowen G, Eliakin A. Short and long term beneficial effects of a combined dietary behavioral physical activity intervention for the treatment of childhood obesity. *Pediatrics*. 2005; 115:e443-9.

-
- ¹²⁰ Zhai W, Xu C, Ling Y, Liu S, Deng J, Qi Y, Londos C, Xu G. Increased lipolysis in adipose tissues is associated with elevation of systemic free fatty acids and insulin resistance in perilipin null mice. *Horm Metab Res*. 2010 Apr;42(4):247-53.
- ¹²¹ Avramoglu RK, Basciano H, Adeli K. Lipid and lipoprotein dysregulation in insulin resistant states. *Clin Chim Acta* 2006; 368:1 – 19.
- ¹²² Ten S, Maclaren N. Insulin Resistance Syndrome in Children. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(6):2526–2539.
- ¹²³ Qi L, Zhang C, Greenberg A, Hu FB. Common variations in perilipin gene, central obesity, and risk of type 2 diabetes in US women. *Obesity (Silver Spring)*. 2008 May;16(5):1061-5
- ¹²⁴ Jang Y, Kim OY, Lee JH, Koh SJ, Chae JS, Kim JY et al. Genetic variation at the perilipin locus is associated with changes in serum free fatty acids and abdominal fat following mild weight loss. *Int J Obes (Lond)* 2006 Nov; 30(11): 1601-1608.
- ¹²⁵ Ordovás JM, Smith CE. *PLIN1* gene: fat keeper and prevention switcher. *J Appl Physiol*. 2010 Mar;108(3):477-8.