UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Estudo de variantes da leptina e do receptor de leptina: impacto
sobre as características relacionadas com a obesidade**

Raquel de Oliveira

Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

Orientador:

Profa. Dra. Rosario Dominguez Crespo Hirata

São Paulo

2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Estudo de variantes da leptina e do receptor de leptina: impacto
sobre as características relacionadas com a obesidade**

Raquel de Oliveira

Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

Orientador:

Profa. Dra. Rosario Dominguez Crespo Hirata

São Paulo

2008

19.789

Raquel de Oliveira

**Estudo de variantes da leptina do receptor de leptina: impacto sobre as
características relacionadas com a obesidade**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Rosario Dominguez Crespo Hirata
orientador/presidente

Dra. Márcia Martins Silveira Bernik
1º. examinador

Profa.Dra. Ligia Ferreira Gomes
2º. examinador

São Paulo, 18 de julho de 2008.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais:

José Roberto e Maria das Dores

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome de sua diretora, Profa. Tit. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto, por abrir as portas desta instituição.

Ao Departamento de Análise Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome de seu chefe, Profa. Tit Dulcinéia Saes Parra Abdala.

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pela bolsa concedida.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade de São Paulo.

Aos médicos da seção de Coronariopatias do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, em especial ao Dr. Marcelo Sampaio Ferraz por sua ajuda imprescindível na obtenção das amostras obtidas para realização deste trabalho.

Aos médicos da divisão de Clínica Médica do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em especial ao Dr. Egídio Lima Dórea, pela valiosa contribuição na obtenção dos pacientes.

Aos funcionários da Unidade Básica de Atendimento à Saúde do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, pela ajuda, colaboração e paciência permitindo a triagem dos pacientes.

Aos funcionários do Serviço de Laboratório Clínico do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, pelo espaço cedido permitindo assim a triagem e a coleta das amostras.

E aos pacientes pela atenção e contribuição, pois sem eles este trabalho não seria possível.

Agradecimentos Pessoais

A Deus, pela sua infinita bondade e perseverança e sua eterna presença em todos os dias de minha vida.

Aos meus pais: José Roberto e Maria das Dores, por permitir a minha presença neste mundo cheio de aventuras, desafios, descobertas. Pela dedicação imensurável e por não deixar que jamais desistisse de lutar pelos meus sonhos, pelas lágrimas de tristeza nas minhas derrotas e as de alegrias a cada novo degrau que conquistei, por estarem sempre de braços abertos me esperando a cada volta para casa, sempre com uma palavra amiga e reconfortante. Obrigado por confiarem em mim e acreditar que um dia eu venceria e pela pessoa que me tornei graças á vocês. Obrigada, pai por tudo, pelo seu carinho, amor e sua dedicação e mãe obrigada pelo incentivo, pelas palavras de conforto, pelo colo e por seu amor não importando a distância, amo vocês.

As minhas irmãs: Ana Paula e Nathália, obrigada pelo carinho, apoio, dedicação, torcida, as conversas enfim por me escutarem e me desculpe pela ausência diária, vocês não sabem o quanto são importantes na minha vida e a saudade que sinto de vocês.

A minhas tias queridas: Elza e Maria Aparecida obrigada por estarem em minha vida e tornar assim ela mais suave. Obrigada pelo amor, carinho e dedicação e por lutarem junto comigo por este sonho.

A minha querida avó Maria obrigada pela sua presença em minha vida hoje e sempre, obrigada por caminhar ao meu lado e permitir que eu viva tudo isso, não tenho palavras para agradecê-la.

À minha orientadora, Profa.Dra. Rosário Dominguez Crespo Hirata, pela sua dedicação, por seus conselhos e principalmente por dividir comigo a sua paixão pela pesquisa que contagia á todos e por tentar despertar em nós seus alunos está mesma paixão, dedicação, profissionalismo e por me ajudar a tornar uma profissional melhor. Muito obrigada, por tudo.

Ao Prof.Tit Mário Hiroyuki Hirata, pelos seus conselhos, pela sua dedicação e por nos ajudar a tornar pessoas melhores acima de tudo. Muito obrigada.

A minha sempre presente amiga Rosana Cícera Nascimento, obrigada pela acolhida, pelo carinho e por conviver comigo. Você é a responsável por eu estar aqui, obrigada, amiga por tudo.

A técnica do laboratório Cristina Moreno Farjado obrigada pela ajuda, pelo carinho, paciência e sua dedicação diária, e por estar disposta a ajudar.

Aos meus amigos ontem e hoje do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico, obrigada por permitir esta magnífica troca de experiência e pelo enorme aprendizado e pela nossa convivência diária, fique sabendo que sem vocês todo este processo seria mais penoso e não teria a menor graça. Obrigada pela acolhida, pela palavra amiga e reconfortante sempre que precisei, todos vocês contribuíram para que este trabalho torna-se real, cada um com seu jeito próprio e especial. Muito obrigado por estes dois anos.

RESUMO

OLIVEIRA, Raquel. **Estudo das variantes do gene da leptina e do receptor de leptina: impacto sobre as características relacionadas com a obesidade.** 2008. 122f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Neste estudo, foi avaliada a relação entre polimorfismos dos genes da leptina (LEP) e receptores da leptina (LEPR) e parâmetros antropométricos, leptinemia, glicemia e lipídeos séricos, em indivíduos da população brasileira. Foram incluídos 238 indivíduos com idade entre 30 e 80 anos. Foram medidos o índice de massa corporal (IMC), a cintura abdominal (CA) e a razão cintura quadril (RCQ). Amostras de sangue periférico foram obtidas para análise do perfil bioquímico e extração de DNA. Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) *LEP* G-2548A e *LEPR* Lys109Arg, Gln223Arg e Lys656Asn foram detectados por PCR-RFLP. Os SNPs *LEPR* Lys109Arg e Gln223Arg foram associados com obesidade e com IMC e CA aumentados ($p < 0.05$). Estes polimorfismos também foram associados com leptina e glicose elevada ($p < 0.05$). O perfil lipídico sérico foi influenciado pelo polimorfismo *LEPR* Lys109Arg ($p < 0.05$). A relação entre os SNPs *LEPR* Lys109Arg e Gln223Arg e o perfil lipídico foi modificada pelo gênero. Os haplótipos *LEP* G-2548A/ *LEPR* Lys109Arg foram relacionados com diferenças no IMC de obesos. Os haplótipos *LEPR* Lys109Arg/Gln223Arg foram associados com diferenças na CA e glicemia e lipídeos séricos. Em conclusão, os polimorfismos *LEPR* Lys109Arg e Gln223Arg estão associados com obesidade e alterações de leptina, glicose e lipídeos circulantes de forma dependente do gênero.

Palavras-chave: Obesidade, leptina, receptor de leptina, polimorfismos genéticos, hiperglicemia, dislipidemia, índice de massa corporal.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Raquel. **Study of the leptin and the leptin receptor gene variants: impact on characteristics related with obesity.** 2008. 122f. Thesis (Master Degree). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

We have assessed the relationship between polymorphisms of the leptin (LEP) and the leptin receptor (LEPR) genes and anthropometric parameters, plasma leptin and glucose and serum lipids in individuals of the Brazilian population. We included 238 individuals with 30 to 80 years. Body mass index (BMI), abdominal circumference (AC) and waist-to-hip ratio (WHR) were measured. Peripheral blood samples were collected for analysis of the biochemical profile and DNA extraction. The single nucleotide polymorphisms (SNP) *LEP* G-2548A and *LEPR* Lys109Arg, Gln223Arg and Lys656Asn were detected by PCR-RFLP. The SNPs *LEPR* Lys109Arg and Gln223Arg were associated with obesity and with increased BMI and AC ($p < 0.05$). These polymorphisms were also associated with increase leptin and glucose ($p < 0.05$). The serum lipid profile was influenced by the *LEPR* Lys109Arg ($p < 0.05$). The relationship between the SNPs *LEPR* Lys109Arg and Gln223Arg and the lipid profile was modified by gender. The haplotypes *LEP* G-2548A/ *LEPR* Lys109Arg were related with differences on BMI in obese group. The haplotypes *LEPR* Lys109Arg/Gln223Arg were associated with differences on AC, glucose and serum lipids. In conclusion, the *LEPR* Lys109Arg and Gln223Arg polymorphisms are associated with obesity and alterations in blood leptin, glucose and lipids in a gender-dependent manner.

Key-words: Obesity, leptin, leptin receptor, gene polymorphism, hyperglycemia, dyslipidemia, body mass index.

Lista de figuras

		pg
Figura 1	Modelo evidenciando os hormônios e os neuropeptídeos envolvidos no controle do balanço energético	7
Figura 2	Gene da leptina. Modelo que representa exons, mRNA e pró-leptina	13
Figura 3	Gene do receptor de leptina. Modelo que representa os exons, a proteína e seus domínios e os principais polimorfismos	17
Figura 4	Eletroforese em gel de agarose á 2%perfil de RFLP (<i>A/w44I</i>) do SNP G-2548 A	29
Figura 5	Eletroforese em gel de poliacrilamida á 8 %perfil de RFLP (<i>MboII</i>) do SNP <i>LEPR</i> Lys109Arg	30
Figura 6	Eletroforese em gel de poliacrilamida á 8 %perfil de RFLP (<i>MspII</i>) do SNP <i>LEPR</i> Gln223Arg	31
Figura 7	Eletroforese em gel de poliacrilamida á 8 %perfil de RFLP (<i>BsTUI</i>) do SNP <i>LEPR</i> Lys656Asn	32

	Lista de tabelas	pg
Tabela 1	Iniciadores utilizados nos ensaios de PCR	26
Tabela 2	Enzimas e tamanhos dos fragmentos de restrição dos SNPs estudados	28
Tabela 3	Dados biodemográficos e determinações bioquímicas do grupo de estudo	35
Tabela 4	Distribuição dos genótipos e frequência de alelos do polimorfismo LEP G -2548A em indivíduos obesos e não-obesos	37
Tabela 5	Distribuição dos genótipos e frequência de alelos do polimorfismo <i>LEP</i> G -2548A em indivíduos obesos e não-obesos, de acordo com o gênero	38
Tabela 6	Relação entre o polimorfismo <i>LEP</i> e os parâmetros antropométricos e o perfil bioquímico em indivíduos obesos	39
Tabela 7	Relação entre o polimorfismo <i>LEP</i> e os parâmetros antropométricos e o perfil bioquímico em indivíduos não-obesos	40
Tabela 8	Distribuição dos genótipos e frequência de alelos do SNP LEPR Lys109Arg (A1960G) em indivíduos obesos e não-obesos	43
Tabela 9	Distribuição dos genótipos e frequência de alelos do SNP Lys109Arg (A1960G) do gene <i>LEPR</i> , de acordo com o gênero	44
Tabela 10	Relação entre o polimorfismo <i>LEPR</i> Lys109Arg (A1960) e os parâmetros antropométricos e o perfil lipídico em indivíduos obesos	45
Tabela 11	Relação entre o polimorfismo <i>LEPR</i> Lys109Arg (A1960) e os parâmetros antropométricos e o perfil lipídico em indivíduos não-obesos	46
Tabela 12	Relação entre o polimorfismo <i>LEPR</i> Lys109Arg (A1960) e os parâmetros antropométricos e o perfil lipídico em indivíduos obesos não diabéticos	47
Tabela 13	Relação entre o polimorfismo <i>LEPR</i> Lys109Arg (A1960) e os parâmetros antropométricos e o perfil lipídico em indivíduos não-obesos não diabéticos	48
Tabela 14	Distribuição dos genótipos e frequência de alelos do SNP <i>LEPR</i> Gln223Arg (A3468G) em indivíduos obesos e não-obesos	50
Tabela 15	Distribuição dos genótipos e frequência de alelos do SNP Gln223Arg (A3468G) do gene <i>LEPR</i> , de acordo com o gênero	51
Tabela 16	Relação entre o polimorfismo <i>LEPR</i> Gln223Arg (A3468G) e parâmetros antropométricos e o perfil lipídico em indivíduos obesos	52
Tabela 17	Relação entre o polimorfismo <i>LEPR</i> Gln223Arg (A3468G) e parâmetros antropométricos e o perfil lipídico em indivíduos não-obesos	53
Tabela 18	Distribuição dos genótipos e frequência de alelos do SNP LEPR Lys656Asn (G9546C) em indivíduos obesos e não-obesos	55
Tabela 19	Distribuição dos genótipos e frequência de alelos do SNP Lys656Asn (G9546C) do gene <i>LEPR</i> , de acordo com o gênero	55
Tabela 20	Relação entre o polimorfismo <i>LEPR</i> Lys656Asn (G9546C) e parâmetros antropométricos e o perfil lipídico em indivíduos obesos	56
Tabela 21	Relação entre o polimorfismo <i>LEPR</i> Lys656Asn (G9546C) e parâmetros antropométricos e o perfil lipídico em indivíduos não-obesos	57
Tabela 22	Associação de genótipos dos SNPs do gene <i>LEP</i> (G-2548 A) e do gene	60

	<i>LEPR</i> (Gln223Arg) em obesos	
Tabela 23	Associação de genótipos dos SNPs do gene <i>LEPR</i> (Lys109Arg) e (Gln233Arg) em não-obesos	61
Tabela 24	Análise de haplótipos do gene <i>LEP</i> G-2548A/ <i>LEPR</i> Gln233Arg em indivíduos obesos	62
Tabela 25	Análise de haplótipos do gene <i>LEP</i> G-2548 A/ <i>LEPR</i> Gln223Arg indivíduos não- obesos	63
Tabela 26	Análise de haplótipos do gene <i>LEPR</i> (Lys109Arg) e (Gln223Arg) indivíduos obesos	64
Tabela 27	Análise de haplótipos do gene <i>LEPR</i> (Lys109Arg) e (Gln223Arg) em indivíduos não- obesos	65
Tabela 28	Análise de haplótipos do gene <i>LEPR</i> (Lys109Arg) e (Gln223Arg) em mulheres não- obesos	66
Tabela 29	Análise de haplótipos do gene <i>LEPR</i> (Lys109Arg) e (Gln223Arg) em homens não-obesos	67

LISTA DE ABREVIATURAS

AgPR	Proteína Agouti
α -MSH	Hormônio α - estimulador de melanocortina
ApoA1	Apolipoproteína A1
ApoB	Apolipoproteína B
ARC	Núcleo Arqueado
Bp	Pares de Bases
CART	Transcrito regulador de cocaína e anfetamina
C/EBP	Região de ligação á proteína
CREB	Elemento de ligação á proteína responsivo ao AMPc
CRH	Hormônio Liberador de Corticotrofina
CT	Colesterol Total
DAC	Doença Arterial Coronariana
DM2	Diabetes do tipo 2
DMN	Núcleo Hipotalâmico Dorsomedial
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
GRE	Elemento responsivo á glicocorticóides
HAS	Hipertensão Arterial Sistólica
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
HDL-c	Colesterol da HDL
HVR	Região Hipervariável
HWE	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IMC	Índice de Massa Corporal
JAK-STAT	Janus Tirosina Quinase – STAT
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LDL-c	Colesterol da LDL
LHA	Núcleo Hipotalâmico Lateral
LEP	Gene da Leptina
LEPR	Gene do Receptor de Leptina

MCH	Hormônio Concentrador de Melanina
MCH-1	Proténa 1 do hormônio concentrador de melanina
MCH-2	Proténa 2 do hormônio concentrador de melanina
MC4R	Receptor Melanocortina-4
NPY	Neuropeptídeo Y
OB	Gene da Leptina
OB-R	Receptor da Leptina
OMS	Organização Mundial de Saúde
OXR1	Receptor de Orexina 1
OXR2	Receptor de Orexina 2
PC-1	Pró-hormônio convertase-1
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pp-MCH	Precursor do MCH
POMC	Pró-opiomelanocortina
PNV	Núcleo Hipotalâmico Paraventricular
RCQ	Relação Cintura-quadril
RFLP	Polimorfismo de Tamanho de Fragmentos de Restrição
SIM1	Single-minded
SNP	Polimorfismo de Um Único Nucleotídeo
SOCS-3	Supressor da Citocinina 3
T4 livre	Tiroxina livre
TSH	Hormônio estimulador da tireóide
VLDL	Lipoproteína de Muito Baixa Densidade
VLDL-c	Colesterol da VLDL
VMN	Núcleo Ventromedial
WAT	Tecido Adiposo Branco
WHR	Waist-to-hip
WHO	World Health Organization
WSXWS	Trp-Ser-Xaa-Trp-Ser

INDICE

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	20
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	21
3.1. Casuística.....	21
3.2. Amostras biológicas	21
3.3. Determinação das medidas antropométricas.....	22
3.4. Determinação dos parâmetros bioquímicos	23
3.5. Extração e análise de DNA genômico	24
3.6. Genotipagem por PCR-RFLP	25
3.7. Análise estatística dos resultados	32
4. RESULTADOS	33
4.1 Dados dos indivíduos do estudo	34
4.2 Polimorfismo <i>LEP</i> G-2458A	36
4.3 Polimorfismos <i>LEPR</i>	41
4.4 Análise de haplótipos	58
5. DISCUSSÃO	68
6. CONCLUSÕES	77
BIBLIOGRAFIA	78
APÊNDICES	91
ANEXOS.....	95

1. INTRODUÇÃO

1.1. Fisiopatologia e epidemiologia da obesidade

A obesidade é definida como excesso de gordura no organismo decorrência de um desequilíbrio entre a quantidade de energia ingerida e o gasto energético, por um longo período (REIS, 2006). O aporte excessivo e crônico de substratos combustíveis presentes nos alimentos e bebidas (proteínas, hidratos de carbono, lipídios e álcool) em relação ao gasto energético (metabolismo basal, efeito termogênico e atividade física) leva ao acúmulo de tecido adiposo e ao desenvolvimento da obesidade (MARQUES-LOPES *et al.*, 2004).

A obesidade é uma doença multifatorial causada por anormalidades no mecanismo de regulação e na função do hipotálamo (AHIMA *et al.*, 2004) e determinada por fatores genéticos e ambientais, tais como alimentação, atividade física e outros (WANTERS *et al.*, 2001). Uma dieta rica em carboidratos e de gordura saturada combinada com a redução da atividade física têm sido responsáveis pelo aumento dos casos de obesidade em nível mundial (WHO, 2000; BRAY, 2006).

A prevalência da obesidade tem atingido taxas alarmantes, afetando indivíduos de todos os grupos socioeconômicos, independente da idade, gênero e origem étnica, na maioria dos países desenvolvidos e em desenvolvimento (MONTEIRO *et al.*, 2004). A Organização Mundial da Saúde (OMS) observou que mais de 30% da população adulta tem sobrepeso ou já desenvolveu obesidade

(aproximadamente 20% dos homens e 30% das mulheres) (WHO, 2006). A OMS estimou que, em 2010, existirão 150 milhões de adultos obesos e 15 milhões de crianças obesas (WHO, 2006).

Nos EUA, uma pesquisa constatou que 17,1% das crianças e adolescentes apresentam sobrepeso e que 32,2% dos adultos são obesos, sendo que na população de origem hispânica essa taxa é de 36,8% (OGDEN *et al.*, 2006). Outro estudo relatou que a prevalência de obesidade em adultos aumentou de 13% para 32%, no período de 1960 a 2004 (WANG; BEYDOUN, 2007). Nesse estudo foi observado que 66% dos adultos têm excesso de peso ou são obesos. Entre as crianças e adolescentes, 16% têm sobrepeso e 34% estão em risco de sobrepeso. Os autores estimaram que, em 2015, 75% da população adulta apresentará sobrepeso e 41% desenvolverá obesidade.

Na Europa, a obesidade atinge mais de 20% de crianças e adolescentes (KOSTI; PANAGIOTAKOS, 2006). Na União Européia, os números de crianças com sobrepeso são estimados aumentar em 1,3 milhões por ano.

No continente Africano, também foi observado um aumento no número de indivíduos obesos. Em Marrocos, dados mostraram a evolução da obesidade no país que, na década de 80, era 4,1% da população adulta e, em 2000, este número passou para 13,3% dos indivíduos adultos, sendo maior em mulheres (22%) que em homens (8%) (RGUIBI; BELAHSEN, 2007). A prevalência de sobrepeso foi maior nas áreas urbanas que rurais e foi correlacionada positivamente com a idade e o nível educacional. Na África do Sul, obesidade e sobrepeso foram observados em todos os grupos étnicos da população adulta e,

em 1998, atingiu 57% das mulheres e 29% dos homens (VAN DER MERWE; PEPPER, 2006).

Nos países asiáticos, também houve aumento da proporção de indivíduos obesos ou com sobrepeso. Nos últimos 20 anos, o crescimento da taxa de obesos na China alcançou 400% na China (ASIA PACIFIC COHORT STUDIES COLLABORATION, 2007).

No Brasil, a prevalência da obesidade também aumentou nas últimas décadas. Entre 1973 e 1974, 2,4% dos homens e 7,0% das mulheres eram obesos. De 1974 a 1989, a proporção de indivíduos com excesso de peso aumentou de 21% para 32%. O sobrepeso e, principalmente, a obesidade afetaram proporcionalmente mais mulheres do que homens. Enquanto 27% da população masculina maior de 18 anos apresentavam algum grau de excesso de peso, essa taxa chegou a 38% em mulheres. Em 1996, observou-se aumento de 6,9% para os homens e 12,5% para as mulheres. O problema do excesso de peso foi mostrado ser grave em todas as regiões do país, mas, em termos relativos, a situação mais crítica era a do Sul, com cerca de 30% dos homens e 43% das mulheres afetadas, seguidas pelas as regiões Sudeste, Norte, Centro-Oeste e Nordeste, com 36%, 34%, 31% e 24%, respectivamente, de seus adultos com grau de excesso de peso (CAIRES, 2004).

Em um estudo realizado por Monteiro e colaboradores ao estudar homens e mulheres em idade adulta, entre os anos de 1975 a 1989 e no ano de 2003, observou que a obesidade aumentou consideravelmente em ambos os grupos 93% nos homens e 63% nas mulheres (MONTEIRO *et al.*, 2007).

O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística realizou uma pesquisa no período de 2002 a 2003, constatou que 40,6% da população adulta (38,6 milhões de pessoas) apresentam peso acima do recomendado e 9,9% (10,5 milhões de adultos) são obesos (IBGE, 2004). Em crianças e adolescentes, a prevalência de sobrepeso é de 13,9% e a de obesidade é de 20 a 25% e, a obesidade parece ser maior no gênero masculino (24%) em relação ao feminino (7%) quando avaliadas pela mesma faixa etária (15-17 anos) (FERREIRA; MAGALHÃES, 2006; SOUZA *et al.*, 2007). No Brasil a obesidade é a terceira doença nutricional superada apenas para anemia e desnutrição (TARDIO, FALCÃO; 2006).

A obesidade é um importante problema de saúde pública porque o excesso de peso está associado com uma série de doenças graves como: hipertensão, diabetes tipo 2, dislipidemia, doença cardiovascular, acidente vascular encefálico e também artrite, asma, e certos tipos de câncer (GREENBERG *et al.*, 2006).

A deposição da gordura influencia diretamente a gravidade e a associação da obesidade com as co-morbidades. Existem dois tipos básicos de distribuição de gordura: abdominal central (obesidade andróide) e gluteofemoral (obesidade ginóide). A obesidade central está associada com o maior risco do desenvolvimento de doenças, por exemplo, uma circunferência de cintura maior que 102 cm em homens e superior a 97 cm em mulheres é considerada obesidade central, porém já pode ser considerada como risco de complicações metabólicas uma cintura ≥ 80 cm e ≥ 94 cm em mulheres e homens adultos, respectivamente.

Esta medida é um indicador útil de risco clínico, principalmente para HAS, DM2 ou dislipidemia (WHO, 2000).

A principal co-morbidade associada à obesidade é a diabetes tipo 2, e estima-se que 80-90% dos diabéticos são obesos e o risco está diretamente relacionado ao aumento do índice de massa corporal (SARTORELLI, FRANCO; 2003). Alterações dos receptores de insulina nos adipócitos parecem causar resistência à insulina que tem sido observada em obesos (CHAVES *et al.*, 2002). A resistência à insulina também parece decorrer do aumento da concentração de ácidos graxos livres mediado pelo hipercortisolismo que pode ocorrer na obesidade. Além disso, os ácidos graxos livres também estimulam o sistema nervoso central, principalmente o hipotálamo, regulando a homeostase energética (CHAVES *et al.*, 2002; SOUZA, 2004).

O mecanismo pela qual a distribuição da adiposidade central leva à resistência à insulina já é bem conhecido. Depósitos viscerais de triglicérides possuem turnover mais acelerado que o de outras regiões, aumentando a oferta de ácidos graxos livres ao sistema porta, que estimulam a gliconeogênese e inibem a depuração hepática da insulina, contribuindo para elevar a glicemia, a insulinemia e a resistência insulínica (LERARIO *et al.*, 2002). Na obesidade, as células do pâncreas tornam-se comumente menos responsivas à estimulação do nível elevado de glicose no sangue. Além disso, as células alvo do organismo, incluindo os músculos, sofrem freqüentemente uma redução da quantidade dos receptores de insulina ou uma redução de sua ativação (SOUZA, 2004).

1.2. Regulação da ingestão alimentar e balanço energético

O sistema fisiológico que regula o consumo de alimento para geração de energia e a manutenção do peso corporal foi postulado por Kennedy, em 1953, que propôs a existência de um fator regulador produzido pelo tecido adiposo que atua no hipotálamo (AHIMA, 2005).

Em 1973, Coleman constatou que lesões no núcleo ventromedial resultavam em hiperfagia e obesidade mórbida em camundongos, enquanto lesões presentes na área hipotalâmica lateral promoviam a perda do apetite alimentar levando à morte por inanição (CUMMINGS, SCHWARTZ; 2003). Com base nessas observações, esse autor sugeriu que o sistema de regulação do apetite alimentar é constituído de sinais aferentes e fatores eferentes e, que o hipotálamo tem um importante papel na regulação da homeostase energética. Estudos posteriores comprovaram a função do hipotálamo na regulação da saciedade alimentar, do consumo de energia e da gordura corporal (CUMMINGS, SCHWARTZ; 2003).

O consumo de energia é regulado principalmente pelo hipotálamo através de sinais centrais e periféricos. O hipotálamo é formado por diferentes núcleos que produzem diferentes hormônios e neuropeptídeos envolvidos na regulação da ingestão alimentar e balanço energético (ARORA; 2006). De acordo com a sua função, esses neuropeptídeos são classificados em orexígenos e anorexígenos (ARORA; 2006). Os orexígenos estimulam a ingestão alimentar enquanto que os

anorexígenos inibem a ingestão alimentar. Na figura 1, estão representados os principais neuropeptídeos produzidos pelo hipotálamo envolvidos no controle do balanço energético.

Figura 1. Modelo evidenciando a leptina e alguns neuropeptídeos envolvidos no controle da fome do metabolismo basal (MB). A diminuição da leptina plasmática estimula a produção de neuropeptídeos orexígenos (NY – neuropeptídeo Y e AgRP – peptídeo Agouti-relacionado) e inibe os anorexígenos (POMC – pro-opiomelanocortina, α-MSH – melanocortina α e CART – transcrito regulado por cocaína e anfetamina). Retirado de Ribeiro *et al.*, 2007.

O neuropeptídeo Y (NPY) é um potente orexígeno expresso no núcleo arqueado (ARC) e liberado no núcleo hipotalâmico paraventricular (PVN). É produzido quando ocorre deficiência energética ou aumento da demanda metabólica (INUI, 2000). Acredita-se que seu papel seja restaurar o balanço energético e o armazenamento de tecido adiposo em condições em que há déficit de energia como a queda da produção de insulina (ARORA; 2006).

A proteína Agouti ou peptídeo agouti-relacionado (AgPR) é um orexígeno expresso no ARC e atua como antagonista endógeno do hormônio estimulante de melanócito α (melanocortina α , α -MSH) no receptor da melanocortina (SAHU *et al.*, 2004 ; WYNNE *et al.*, 2005 ; ARORA; 2006).

O hormônio concentrador de melanina (MCH) é um orexígeno produzido a partir da clivagem do seu precursor, precursor do MCH (ppMCH), que é expresso principalmente no núcleo hipotalâmico lateral (LHA) (LIEBERMAN *et al.*, 2006). A sua sinalização ocorre através de dois tipos diferentes de receptores para proteína G, denominados: MCH-1 e MCH-2, ambos estão altamente distribuídos em diferentes áreas cerebrais, especificamente em hipocampo, amígdala e córtex cerebral (RODRIGUEZ *et al.*, 2001). A função do MCH ainda não está bem definida, mas acredita-se que esteja envolvido na regulação do peso corporal (ARORA; 2006).

As orexinas A e B também designadas por hipocreatinas, são peptídeos orexigênicos derivados do mesmo precursor (prepro-orexina) por processamento proteolítico (COWLEY; JOBST; ENRIORI; 2004). São expressas nos neurônios da

LHA e do núcleo hipotalâmico dorsomedial (DMN) (SAKURAI, 2003). As orexinas ligam e ativam dois receptores, OXR1 e OXR2, presentes em vários tipos de neurônios do hipotálamo. As orexinas aumentam a ingestão alimentar retardando o início do processo de saciedade. O sistema das orexinas é seletivamente ativado pelo estado nutricional. Além do controle do apetite, as orexinas atuam no controle da locomoção e do ciclo sono-despertar e da homeostase neuroendócrina (ARORA; 2006).

O α -MSH é um anorexígeno derivado da pró-opiomelanocortina (POMC) por ação do pró-hormônio convertase 1 (PC1). A POMC é expressa em diferentes tecidos incluindo pituitária anterior e intermediária, neurônios hipotalâmicos (principalmente nas células da parte lateral do ARC) e outros tecidos. O α -MSH inibe ingestão alimentar por ligação ao receptor melanocortina-4 (MC4R) que pode levar a hiperfagia (WYNNE *et al.*, 2005 ; ARORA; 2006).

O transcrito regulado por cocaína e anfetamina (CART) é um anorexígeno localizado nos núcleos PVN, DMN, LHA e nas regiões perifornicais, e co-expressado com α -MSH no ARC. Está altamente relacionado com a regulação endócrina, mas seu papel no controle do balanço energético ainda não está bem definido (WYNNE *et al.*, 2005 ; ARORA; 2006).

O hormônio grelina é um fator orexígeno que é expresso principalmente nas células epiteliais do fundo do estômago e pode ser expresso em outras células do trato gastrointestinal, pâncreas, ovários, córtex adrenal (HUBINA *et al.*, 2005). Sua secreção depende do estado nutricional ou da entrada do alimento no estômago. A concentração de grelina plasmática aumenta durante a ingestão de

alimento e diminui no final do período absorptivo. É o primeiro sinal que comunica a ingestão do alimento ao cérebro por estímulo da produção dos orexígenos NPY e AgRP no ARC (ARIYASU *et al.*, 2001; GREENMAN *et al.*, 2004; MEIER; GRESSNER, 2004; KLOK *et al.*, 2006; MURPHY *et al.*, 2006).

A leptina é um hormônio produzido pelos adipócitos (principalmente tecido adiposo branco) que regula a saciedade e o balanço energético por ligação a receptores específicos no hipotálamo (AHIMA, LAZAR, 2008). A leptina é também expressa em outros (BARROSO *et al.*, 2002; AHIMA, OSEI, 2004; ARORA, 2006). A expressão da leptina é regulada pelo jejum, alimentação, insulina, glicocorticóide e outros hormônios (BAILE *et al.*, 2000; BARROSO *et al.*, 2002; FRIEDMAN *et al.*, 2002; CUMMINGS; SCHWARTZ 2003; HEYGI *et al.*, 2003).

Estudos *in vitro* indicaram que a insulina e os glicocorticóides aumentam a expressão gênica e a taxa de secreção da leptina em adipócitos humanos por longos períodos. Portanto, a expressão aumentada da leptina observada na obesidade pode resultar da hiperinsulinemia crônica e recirculação aumentada de cortisol (FRIED *et al.*, 2000). Submetido a essa regulação de longa duração, o estado nutricional pode influenciar na leptina plasmática independentemente da adiposidade.

As concentrações plasmáticas de leptina são proporcionais ao número e ao tamanho das células adiposas e tem correlação direta com o percentual de gordura corporal. A composição da dieta, especialmente de macronutrientes ou micronutrientes, também regula a concentração plasmática de leptina (MANTZOROS, 1999). Estudos mostraram que a diminuição da concentração de

leptina em resposta a privação de alimento é responsável por reprimir o apetite alimentar nos eixos hipotalâmico-pituitária-gonadal assim como o mau funcionamento de vários outros eixos neuroendócrinos (MEIER; GRESSNER, 2004).

A leptina desempenha diferentes funções, porém a mais importante é o controle da homeostase energética, por meio da diminuição da ingestão alimentar e do aumento do gasto energético pela via melanocortina hipotalâmica que controla as reservas de gordura do organismo (SAHU, 2003). A leptina também participa dos processos de reprodução, crescimento, função imune, tonos muscular, etc (SANCHEZ, 2005).

A ação da leptina se dá por interação com o receptor de leptina (LEPR) localizados nos ARC, LH e PVN de forma a inibir a síntese e/ou secreção de neurotransmissores orexígenos (NPY e Agrp) e também estimular a síntese de peptídeos anorexígenos (POMC e α -MSH) (SAHU, 2004; LAVENS *et al.*, 2006; SHIMIZU *et al.*, 2007).

O sinal do complexo formado entre a leptina e o LEPR é transmitido na célula principalmente pela ativação da via Janus tirosina quinase - transdutor de sinal e ativador de transcrição (JAK-STAT). O domínio citoplasmático do LEPR possui regiões de interação e ativação das JAK-1 e JAK-2, denominadas Box-1 e Box-2 (AHIMA *et al.*, 2004; FRUHBECK, 2006). A JAK-2 sofre a fosforização e ativa a transcrição da proteína STAT-3 que se dimeriza e se transloca para o núcleo onde se liga a regiões promotoras de genes orexigênicos e anorexigênicos, inibindo ou ativando a sua transcrição (ZHANG *et al.*, 2006).

A via de sinalização da leptina é inibida pelo supressor da citocinina-3 (SOCS-3) que atua na via JAK-2 impedindo a sua fosforização (HEGYI et al., 2003). A proteína tirosina-fosfatase 1B (PTP-1B) também atua como regulador negativo da via JAK-STAT.

1.3. Polimorfismos do gene da leptina

A leptina é codificada pelo gene *LEP* que está localizado no cromossomo 7 (7q31.3). O *LEP* tem 18 Kb de extensão contem três exons que são transcritos em um mRNA de 3,5 Kb (GONG et al., 1996). O transcrito (éxons 2 e 3) é traduzido em uma pré-proteína (pró-leptina) com 167 aminoácidos. A clivagem do peptídeo sinal (21 aminoácidos) resulta na proteína madura com 146 aminoácidos (**figura 2**). A região promotora do *LEP* tem elementos como TATA Box, C/EBP (região de ligação à proteína), GRE (elemento responsivo a glicocorticóide) e CREB (elemento de ligação à proteínas responsivo ao AMPc)

Figura 2. Gene da leptina. Modelo que representa éxons, mRNA e pró-leptina.

Retirado do artigo de Gong *et al.*, 1996.

Mutações no *LEP* foram associadas a formas monogênicas de obesidade grave (RAU *et al.*, 1999; FAROOQI *et al.*, 2004; PERUSSE *et al.*, 2005). Em três famílias paquistanesas foi detectada uma deleção de guanina no códon 133 que cria um códon de parada (ΔG_{133}) e resulta na síntese de uma proteína truncada (MONTAGUE *et al.*, 1997). Uma mutação missense C/T localizada no códon 105 (Arg/Trp) foi identificada em uma família turca que resulta na produção de uma proteína não secretada (STROBEL *et al.*, 1998). Como consequência, os indivíduos afetados desenvolveram hiperfagia, obesidade mórbida, hiperinsulinemia, imunossupressão e com o passar dos anos alguns desenvolveram hipogonadismo hipogonadotrófico. Duas mutações raras G144A e G328A no gene *LEP* foram identificadas em dois indivíduos obesos com concentrações séricas muito baixas de leptina (KARVOEN *et al.*, 1998).

Estudos utilizando marcadores do tipo microsatélite do *LEP* mostraram ligação e/ou associação entre regiões hipervariáveis (D7S1875, D7S504 e D7S635) e fenótipos de obesidade (ALLISON, HEO; 1998; BRAY *et al.*, 1996; MOFFET *et al.*, 2002; MCGARVEY *et al.*, 2002). Shintani e colaboradores identificaram uma repetição de tetranucleotídeo localizada na região 3'-terminal (3'HVR) do *LEP* que foi associada posteriormente com IMC elevado e obesidade em diferentes populações (SHINTANI *et al.*, 1996). Hinuy e colaboradores observaram que a presença de alelos de classe I do LEP 3'HVR foi associada com valores elevados de IMC e cintura-quadril (HINUY *et al.*, 2006).

Foram também descritos polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) do gene *LEP* associados com a redução do peso ou obesidade. O polimorfismo *LEP* G-2548A localizado na região promotora do gene *LEP* foi associado com a redução dos valores de IMC seguido de uma dieta de baixa caloria em mulheres com sobrepeso e também foi associado com a variação nas concentrações de leptina (MAMMÉS *et al.*, 2000). O SNP G-2548A também foi associado a alterações da concentração de leptina e da massa corporal em garotas obesas (LE STUNFF *et al.*, 2000).

Em outro estudo, Yiannakouris e colaboradores, observaram associação entre o polimorfismo G-2548A e a leptina plasmática e a adiposidade na população grega (YIANNAKOURIS *et al.*, 2003). Nesse estudo, as mulheres portadoras do genótipo AA apresentaram valores elevados de leptina plasmática e IMC quando comparados aos homens. Um estudo multicêntrico também mostrou relação do SNP G-2548A com o aumento do valor de IMC e com predisposição ao

desenvolvimento de doença cardiovascular (JIANG *et al.*, 2004). Por outro lado, na população asiática, o genótipo -2548GG foi associado com obesidade extrema em aborígenes de Taiwan (WANG *et al.*, 2006).

Contraditoriamente, o SNP G-2458A não foi associado com obesidade em mulheres australianas (DE SILVA *et al.*, 2001) e em espanhóis (PORTOLÉS *et al.*, 2006).

Segundo Hoffsted e colaboradores, a presença do polimorfismo G-2548A pode influenciar a expressão do gene da leptina e a sua secreção pelo tecido adiposo (HOFFSTED *et al.*, em 2002).

1.4. Polimorfismos do gene do receptor da leptina

O gene do receptor de leptina (*LEPR*), também denominado *OB-R*, tem tamanho de 70 kb, está localizado no cromossomo 1 (1p31) e contém 20 éxons (THOMPSON *et al.*, 1997). Sua região codificadora se inicia no éxon 3 que contém o códon de iniciação da tradução ATG (**figura 3**). A proteína tem três domínios, sendo que o domínio extracelular é codificado pelos éxons 3 a 17, o domínio transmembrana é codificado pelo éxon 18 e o domínio intracelular pelos éxons 19 e 20.

A estrutura do *LEPR* é similar a dos membros da família dos receptores de citocinas que tem, no domínio extracelular, regiões de interação com ligantes, formados por 4 resíduos de cisteína e WSXWS (Trp-Ser-Xaa-Trp-Ser) contendo

um número diferente de domínios de fibronectina do tipo III (**Figura 3**). No domínio intracelular, estão localizadas as regiões Box1, Box2 e Box3 de interação com a JAK que está envolvida na via de sinalização intracelular mediada por STATs, conforme comentado anteriormente (AHIMA, OSEI; 2004; FRUHBECK, 2006).

O *LEPR* codifica para diferentes isoformas (LEPR-a, LEPR-b, LEPR-c, LEPR-d, LEPR-d, LEPR-e, LEPR-f) que são produzidas por processamento alternativo do mRNA em sítios localizados no éxon 18 e que causa modificação na sequência de aminoácidos do domínio intracelular (carboxi-terminal) (TARTAGLIA, 1997 ; HEGYI *et al.*, 2003; FRUHBECK, 2006). As isoformas do LEPR são classificadas em três classes: curtas (LEPR-a, LEPR-c, LEPR-d e LEPR-f), longa (LEPR-b) e secretada (LEPR-e). A forma longa foi inicialmente considerada o receptor funcional porque o domínio intracelular é formado pelas regiões de interação com proteínas envolvidas na ativação da via de sinalização intracelular (FRUHBECK, 2006). A forma LEPR-e não tem o domínio intracelular e codifica o receptor solúvel, acredita-se que aumenta a meia-vida da leptina.

Mutações funcionais no *LEPR* são raras, mas já foram descritas nos éxons 14, 17 e 18. Foi observada, em uma família francesa, a presença de substituição de guanina para adenina no sítio de doação do éxon 16 (G/A) para processamento do RNAm . Essa mutação resultou na falta dos domínios intracelular e extracelular do LEPR, levando os indivíduos a desenvolverem hiperfagia, obesidade mórbida e problemas na maturação sexual (THOMPSON *et al.*, 1997; AHIMA, OSEI; 2004)

Figura 3. Gene do receptor de leptina. Modelo que representa os éxons, a proteína e seus domínios e os principais polimorfismos. Retirado de MATSUOKA *et al.*, 1997.

Vários polimorfismos foram detectados no *LEPR*, entre os quais podemos citar os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs): A19G, Asp96Asp (A/G), Lys109Arg (A1960G), Gln223Arg (A3468G), Ser343Ser (T/C) Lys656Asn (C9546G), Pro1019Pro (G/A) entre outros (MATSUOKA *et al.*, 1997; YIANNAKOURIS *et al.*, 2001; MAMMES *et al.*, 2001; RANKINEN *et al.*, 2006).

Os SNPs *LEPR* Lys109Arg (éxon 4), Gln223Arg (éxon 6) e Lys656Asn (éxon 14) tem sido os mais estudados por estarem localizados na região extracelular do *LEPR*-b e afetarem os domínios de interação com a leptina (MAMMÉS *et al.*, 2001; YIANNKOURIS *et al.* 2003; JÚNIOR *et al.*, 2004).

Um dos primeiros estudos mostrou que mulheres portadoras do alelo *LEPR* 109Arg (A1960G) apresentaram aumento de peso, na população cacaúsica inglesa (GOTODA *et al.*, 1997). Em outro estudo realizado por Chagnon e colaboradores foi observada a correlação entre o polimorfismo Lys109Arg e o aumento dos valores de IMC e a quantidade de massa livre, em indivíduos caucasianos e negros canadenses (CHAGNON *et al.*, 2000). Em um estudo realizado com jovens gregos, foi demonstrado que o SNP Lys109Arg foi relacionado com valores aumentados de IMC (WANTERS *et al.*, 2001).

O polimorfismo Gln223Arg (A3468G) foi associado com aumento do peso e mudanças no funcionamento normal do LEPR, o que levou a predisposição a resistência a leptina (YIANNAKOURIS *et al.*, 2001). Este SNP foi associado com a adiposidade, aumento do metabolismo energético e aumento do depósito de células adiposas, em Pima Indians (STEPHAN *et al.*, 2002). Foi também associado com IMC aumentado em brasileiros de etnia caucasóide, principalmente em não-fumantes (MATTEVI *et al.*, 2002).

Em estudos recentes, o polimorfismo Gln223Arg foi associado com o desenvolvimento de obesidade, em adolescentes mexicanos e em espanhóis de origem mediterrânea (GUÍZAR-MENDONZA *et al.*, 2005; PORTOLÉS *et al.*, 2006). Em estudo realizado no Brasil com adultos moradores da cidade do Rio de Janeiro, constatou-se que o aumento dos valores de IMC e de cintura-quadril estava relacionado com a presença do polimorfismo Gln223Arg (DUARTE *et al.*, 2006).

O polimorfismo *LEPR* Lys656Asn (C9446G) foi também associado com sobrepeso corporal (WAUTERS *et al.*, 2001) (GOTODA *et al.*, 1997; MAMMES *et al.*, 2001). Um estudo realizado na Espanha constatou que indivíduos com o genótipo 9446GG (656Asn) apresentaram mudanças em sua composição corpórea como: perda de peso, diminuição da medida de cintura-quadril e por consequência o valor de IMC (ROMAN *et al.*, 2006).

Podemos observar que polimorfismos comuns dos genes *LEP* e *LEPR* estão associados com obesidade, aumento de IMC e outras características relacionadas com a obesidade. Entretanto, esses dados nem sempre são encontrados em algumas populações e parecem ser relacionados com a etnia, o gênero e fatores ambientais. Evidencia-se a necessidade de um melhor entendimento do papel desses polimorfismos na variabilidade da leptina no plasma e sua relação com a obesidade.

2. OBJETIVOS

- 2.1. Conhecer a frequência de alelos dos polimorfismos do gene da leptina (G-2548A) e do receptor de leptina (Lys109Arg, Gln223Arg e Lys656Asn) em indivíduos brasileiros e a possível associação destes polimorfismos com a obesidade.
- 2.2. Avaliar a relação entre os polimorfismos dos genes da leptina e do receptor de leptina e parâmetros antropométricos e bioquímicos, em indivíduos da população brasileira.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Casuística

Foram selecionados 238 indivíduos sem vínculo genético, de ambos os gêneros, com idade entre 30 e 80 anos, na Seção de Coronária do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC) de São Paulo e no Serviço de Clínica Medica do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU/USP). Foram excluídos os indivíduos que apresentaram doenças renais e hepáticas graves, doenças da tireóide ou supra-renais, hipogonadismo nos homens e hiperandrogenismo em mulheres e outros tipos de obesidade secundária.

Os indivíduos incluídos foram informados sobre o protocolo do estudo que foi previamente aprovado pelos comitês de ética das instituições envolvidas (IDPC, HU/USP e Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP) e somente participaram os que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1). Nesse momento, foram obtidos os dados de etnia, gênero, idade, peso, altura, circunferência abdominal, relação cintura-quadril (RCQ), menopausa, tabagismo, hipertensão, história familiar de DAC, Comorbidades e medicações em uso (**Apêndice B**).

3.2. Amostras biológicas

Foram coletadas amostras de sangue, após jejum de 12-14 horas, foram obtidos 10 mL de sangue em tubo com EDTA (1 mg/mL de sangue) para extração de DNA genômico e para a determinação de leptina no plasma.

Amostras de sangue periférico foram colhidas sem anticoagulante (10 mL) para obtenção de soro que foi utilizado para a análise do perfil lipídico sérico.

Foram determinadas concentrações séricas de colesterol total e frações, triglicérides, apolipoproteína A1 (apo A1), apolipoproteína B (apo B) que foram utilizadas a fim de avaliar o perfil lipídico dos pacientes e seu comportamento em relação à obesidade.

3.3. Determinação de medidas antropométricas e taxa de gordura corporal

O peso e a altura dos indivíduos participantes foram medidos em uma balança mecânica para pesagem de humanos (Filizola S.A., São Paulo, Brasil). As medidas de circunferência abdominal e de quadril foram obtidas utilizando uma fita métrica flexível comum. Todos os indivíduos tiveram o peso e a altura medidos com o mínimo de roupas possível e descalços, na forma recomendada (MONTEIRO, 1998a; NHLBI, 2000). Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2000) indivíduos com valores de IMC entre 25,0 e 29,9 kg/m² apresentam excesso de massa, os com IMC entre 30,0 e 34,9 kg/m² são classificados em obesidade de classe 1, os com valores de IMC entre 35,0 e 39,9 kg/m² de obesidade de classe 2; e indivíduos com IMC superiores a 40,0 kg/m² em obesidade de classe 3. A circunferência abdominal para ser correta é preciso que o indivíduo permaneça em pé, expire e com o auxílio de uma fita métrica, posicioná-la preferencialmente no umbigo, para que ocorra uma medição precisa. Valores acima de 88 cm para as mulheres e de 104 cm para os homens

caracteriza a obesidade devido ao aumento da circunferência abdominal (ROSMOND et al., 2003). A relação cintura-quadril (*waist-to-hip*: WHR) é a razão entre o comprimento da cintura (menor circunferência entre a cintura e a crista ilíaca) e o comprimento do quadril (maior circunferência entre a cintura e a coxa), para homens os valores superiores a 1,0 e para as mulheres os valores superiores a 0,8 são considerados obesos (WANTERS et al., 2001).

3.4. Determinações dos parâmetros bioquímicos

A concentração de leptina plasmática foi determinada pelo imunoensaio enzimático *Leptin ELISA Kit* (ALEXIS Biochemicals, Axxora, LLC, San Diego, EUA) (CONSIDINE et al., 1996) utilizando os equipamentos *Commander Dynamic Incubator* (Abbott Laboratories, EUA), *Auto Wash II Plus* (ORTHO Diagnostic Systems, Inc., França) e *Auto Reader II* (ORTHO Diagnostic Systems, Inc., Áustria).

As concentrações séricas de colesterol total, HDL-C e triglicerídeos foram determinadas por ensaios enzimático-colorimétricos (ROESCHLAU et al., 1974; SUGIUCHI et al., 1995; WAHLEFELD e BERGMAYER, 1974). As concentrações de colesterol da LDL (LDL-C) e da VLDL (VLDL-C) foram obtidas pela aplicação da fórmula de Friedewald para concentrações de triglicerídeos inferiores a 400 mg/dL (FRIEDEWALD; LEVY; FREDRICKSON, 1972).

As concentrações séricas de ApoA1 e ApoB foram determinadas por métodos imunoturbidimétricos (RIFAI e KING, 1986). Esses ensaios foram realizados no equipamento Roche-Hitachi 912 (Hitachi, Nakakojo, Japão)

empregando-se os conjuntos de reagentes comerciais (Roche, Mannheim, Alemanha).

3.5. Extração e análise de DNA genômico

O DNA genômico foi extraído dos leucócitos do sangue periférico, após lise dos eritrócitos, utilizando o método de precipitação salina desenvolvido em nosso laboratório (SALAZAR *et al.*, 1998). Resumidamente, as amostras de sangue, colhidas com EDTA, foram lisadas com tampão Tris-1 [Tris-HCl a 10mM (pH 8,0), KCl a 10mM; MgCl₂ a 10mM e EDTA a 2mM] adicionado de Triton X-100 a 2,5%. Posteriormente, os núcleos celulares foram lisados com tampão Tris-2 (Tris-HCl a 10mM, pH 8,0, KCl a 10mM, MgCl₂ a 10mM, EDTA a 2mM pH 8,0 e NaCl 0,4M) com dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%. A seguir, foi adicionado NaCl 5 M e a suspensão foi centrifugada durante 5 min a 12000 rpm. Ao sobrenadante, foi adicionado 1 mL de etanol absoluto e o DNA precipitado foi centrifugado durante 5 min a 12000 rpm, lavado com etanol 70% e ressuspendido em tampão TE pH 8,0 [Tris-HCl a 10mM e EDTA 1mM (pH 8,0)]. As amostras de DNA foram armazenadas a -20° C.

A integridade das amostras de DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 0,8% utilizando tampão TBE 0,5X [Tris-HCl a 45mM, ácido bórico a 45 mM e EDTA a 1mM (pH 8,0)] (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). A separação eletroforética foi realizada a 100V, por 30 min, em cuba de eletroforese horizontal (Gibco BRL, Life Technologies Inc. Gaithersburg, MD,

EUA) e fonte modelo EPS 200 (GE Healthcare, Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo, SP). Como referência foi utilizado um marcador de tamanho molecular de DNA de 1000 bp (1Kb) (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA).

As bandas eletroforéticas foram visualizadas sob luz UV, após coloração do gel com brometo de etídio (0,5 mg/mL) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) e fotodocumentadas em sistema de captura de imagem Chemilmager™ 4400 (v5.5) (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, EUA).

A quantificação de DNA foi realizada por espectrofotometria a 260nm utilizando espectrofotômetro Beckman modelo DU 640 (Beckman, Fullerton, CA, EUA) e a pureza do DNA determinada pela relação A_{260nm}/A_{280nm} (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

3.6. Genotipagem por PCR-RFLP

As regiões do DNA que contem os polimorfismos dos genes *LEP* e *LEPR* foram amplificadas por reação em cadeia pela polimerase (PCR) e os genótipos foram identificados por análise de fragmentos de restrição (RFLP).

As seqüências dos iniciadores do SNP *LEP* G-2548A foram modificadas por Hinuy, a partir de seqüências previamente descritas por MAMMÉS e colaboradores (MAMMES *et al.*, 2000; HINUY, 2004). Para a seleção dos iniciadores dos SNPs do *LEPR* foi utilizada a seqüência do gene disponível no

banco de genes do NIH e o programa Primer Premier® v. 5.0 (Premier Biosoft International, EUA). Na Tabela 1, estão descritos os iniciadores utilizados nos ensaios de PCR.

Tabela 1. Iniciadores utilizados nos ensaios de PCR

Polimorfismos	Seqüências dos Iniciadores	Tamanho do produto de PCR
<i>LEP</i> G-2548A	5'-CTTTTGT TTTGTTT GCGACAGGGGTGC-3' 5'-GCTCCCTTTGCCCGACCCCG-3'	427pb
<i>LEPR</i> *		
Lys109Arg	5'-TGCAGACAACATTGAAGGGA-3' 5'-CATACAGGTATCAAAGAATTAAAAAC-3'	128 pb
Gln223Arg	5'-ATGTTGTGAATGTCTTGTGCCGG-3' 5'-CCATATTTATGGGCTGAACTGACATTAG-3'	128 pb
Lys656Asn	5'-ACAACTTGTCATTTTGCAGTTCCTA-3' 5'-CCAAAGTAAAGTGACATTTTTCGC-3'	101 pb

*Fonte : www.ncbi.nlm.nih.gov: Número de Acesso no GenBank: AH003667.

Nos ensaios de PCR, foram utilizados 50 ng de DNA, iniciadores 200 nmol/L (IDT, Coralville, IA, EUA), dNTPs 200 µmol/L (GE Healthcare, Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo, SP), DNA polimerase 1 U (Biotools, Madrid, Espanha), tampão de PCR (Tris-HCl (pH 9,0) 75 mM, KCl 50 mM, (NH₄)₂SO₄ 20 mM, MgCl₂ 2 mmol/L), em um volume total de 50 µL com água deionizada

esterilizada. Os ensaios de PCR foram realizados no termociclador Mastercycler® Gradient (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha).

Para o SNP *LEP* G-2548A foi utilizado o seguinte programa de amplificação: ciclo inicial a 96°C por 3 min; amplificação em 35 ciclos de 96°C por 30 s e 70°C por 1 min e 30 s; e ciclo final a 72°C por 10 min. Para os SNPs *LEPR* foram utilizados os seguintes programas: ciclo inicial a 98°C por 3 min; amplificação em 35 ciclos de 94°C por 1min, 56,6°C (Lys109Arg), 62,5 °C (Gln223Arg) e 55,8 °C (Lys656Asn) por 2 min, 72 °C por um minuto; e ciclo final a 72°C por 10 min.

Os produtos de PCR do polimorfismo do gene *LEP* G-2548A foram digeridos com a enzima de restrição *Alw44* I (Fermentas, Vilnius, Lituânia) por 2h, em banho de água (FANEM Ltda., São Paulo, SP, Brasil) a 37°C, em volume final de reação de 20 µl.

Os produtos PCR do SNP *LEPR* Lys109Arg foram digeridos com 5U da enzima *Mbo* II (New England, BioLabs, EUA), em volume final de 20µl, por 4 horas em banho de água a 37°C. Os produtos do SNP Gln223Arg foram digeridos com 5U da enzima *Msp* I (Fermentas, Vilnius, Lituânia), em volume final de 20µL, por 4 horas em banho de água a 37°C. O SNP Lys656Asn foi digerido com 10U da enzima *BstU* I (Fermentas, Vilnius, Lituânia), em volume final de 20 µL, por 1h em banho de água a 37°C. Na tabela 2, estão descritos as enzimas e os tamanhos de fragmentos gerados.

Tabela 2. Enzimas e tamanhos de fragmentos de restrição dos SNPs estudados

Polimorfismos	Produto de PCR	Enzima de restrição	Genótipos	Produtos de restrição
<i>LEP</i> G-2548A	427 pb	<i>Alw44 I</i>	GG GA AA	95 pb, 332 pb 95 pb, 332 pb, 307 pb, 25 pb 95 pb, 307 pb, 25 pb
<i>LEPR</i> Lys109Arg (A1960G)	128 pb	<i>Mbo II</i>	AA AG GG	28 pb, 100 pb 28 pb, 100 pb, 128 pb 128 pb
Gln223Arg (A3468G)	128 pb	<i>Msp I</i>	AA AG GG	20 pb, 108pb 20 pb, 38 pb, 70 pb, 108 pb 20 pb, 38 pb, 70 pb
Lys656Asn (9446C)	101 pb	<i>BstU I</i>	GG GC CC	101 pb 101 pb, 78 pb, 23 pb 78 pb, 23 pb

Os produtos de restrição de PCR-*LEP* foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TBE 0,5X [Tris-HCl a 45mM, ácido bórico a 45 mM e EDTA a 1mM (pH 8,0)]. Como referência foi utilizado um padrão de tamanho molecular de DNA de 100 bp. A eletroforese foi realizada a 100 V por 1 h e 30 min, em cuba horizontal (Gibco BRL, Life Technologies Inc. Gaithersburg, MD, EUA). Os géis foram corados com brometo de etídio e documentados como descrito no item 3.5.

Na **figura 4**, são mostrados os perfis de restrição e os genótipos do polimorfismo *LEP* G-2548A. Em todos os perfis ocorre o fragmento de 95 pb

que corresponde ao sítio constitutivo da enzima *A/w44* I. O genótipo GG que não tem o sítio polimórfico (fragmento de 332 pb) pode ser observado na trilha 3. O genótipo heterozigoto GA é mostrado nas trilhas 2, 4 e 5 (fragmentos de 332 e 307 pb).

Figura 4. Eletroforese em gel de agarose a 2% de perfil de RFLP (*A/w44*I) do SNP *LEP* G-2458A. Trilha 1: marcador de tamanho molecular de DNA de 100 bp; trilhas 2, 4 e 5: perfil do com genótipo GA; trilha 3: perfil do genótipo GG.

Os produtos de restrição dos SNPs do *LEPR* foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%, em TBE 1X [(Tris-HCl 90 mM, ácido bórico 90 mM e EDTA 2 mM (pH 8,0)] (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Para isso, utilizou-se o sistema de eletroforese vertical Mini v16-2 (Biometra, Göttingen, Alemanha). A eletroforese foi realizada com a fonte modelo EPS 200 (GE Healthcare, Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo, SP) a 16mA por placa, durante 4 horas. Foi utilizado como referência o marcador

de tamanho molecular de 50 bp (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA) para identificar o tamanho dos fragmentos gerados pela restrição enzimática. Os géis de poliacrilamida foram corados com a solução SYBR Gold ® (Molecular Probes, Invitrogen Detection Technologies, Eugene, Oregon, EUA).

Nas figuras 5 a 7, estão representados os perfis RFLP dos SNPs do *LEPR*. Para o SNP Lys109Arg (A1960G), na presença do sítio de restrição de *MbolI* são gerados fragmentos com tamanhos de 28 pb e 100 pb que identificam o genótipo raro 1960AA (109Lys). Na ausência do sítio de restrição se observa o produto de PCR (128 pb) que identifica o genótipo 1960GG (109Arg) (Figura 5).

Figura 5. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% de perfil de RFLP (*MbolI*) do SNP *LEPR* Lys109Arg (A1960G). Trilha 1: marcador de tamanho molecular de DNA de 50 bp trilha 2: perfil genótipo GG; trilhas 3 a 7 e 9,10 : perfil com genótipo AA e trilha 8: perfil genótipo AG .

Para o SNP Gln223Arg, o produto de PCR tem um sítio constitutivo que gera um fragmento de 20 pb e um polimórfico reconhecido pela *Msp* II que gera dois fragmentos de 38 e 70 pb que identificam o genótipo raro 3468GG (223Arg) (Figura 6, trilha 11). Na ausência do sítio de restrição se observa o produto o fragmento de 108 pb que identifica o genótipo 3468AA (223Gln).

Para o SNP Lys656Asn (G9446C), na presença do sítio de restrição de *BsTU* I são gerados fragmentos com tamanhos de 23 pb e 78pb que identificam o genótipo raro 9446CC (656Asn). Na ausência do sítio de restrição se observa o produto de PCR (101 pb) que identifica o genótipo 9446GG (656Lys) (figura 7).

Figura 6. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% de perfil de RFLP (*Msp*II) do SNP *LEPR* Gln223Arg (A3468G). Trilha 1: marcador de tamanho para DNA de 50 pb; trilha 2: produto de PCR; trilhas 3 a 10 e 12 a 17: perfil genético AG ; trilha 11: perfil genético GG.

Figura 7. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% de perfil de RFLP (*BsTU I*) do SNP *LEPR* Lys656Asn (9446G). Trilha 1: marcador de tamanho para DNA de 50 pb; trilhas 2 a 13 e 15 e 15: perfil genético GC; trilha 14: perfil genético CC; trilha 17: perfil genótipo GG e trilha 18: produto de PCR.

Os ensaios de PCR-RFLP foram repetidos aleatoriamente para 30% das amostras testadas. Controles de genótipos foram utilizados em todos os ensaios de PCR-RFLP.

3.7. Análise estatística dos resultados

Os resultados das variáveis contínuas foram apresentados como valor médio e desvio-padrão e comparados pelo teste *t* de Student ou teste de Mann-Whitney (não paramétrico). Os resultados das variáveis classificatórias foram apresentados como frequências e comparados pelo teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher, como para avaliar o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) do

nosso grupo estudo e controle. No caso de análises bioquímicas, envolvendo três ou mais grupos utilizou-se a Análise de Variância Simples (*One-Way* ANOVA) seguida de teste de comparação múltipla de Turkey, quando necessário. Os dados foram analisados utilizando-se o programa SigmaStat para Windows, versão 2.03 (SPSS Inc., Chicago/IL EUA) e o nível de significância utilizado nas análises foi de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Dados dos indivíduos do estudo

Na tabela 3, são apresentados alguns dados biodemográficos e de determinações bioquímicas de 238 indivíduos brancos incluídos no estudo e separados em dois grupos de acordo com valor de IMC superior a 30 Kg/m² (obeso) ou inferior (não-obeso). A proporção de mulheres (71,8%) foi maior que a de homens (28,2%), porém estes valores foram similares entre os grupos de obesos e não-obesos ($p > 0,05$). A média de idade foi maior no grupo de obesos quando comparada à de não obesos ($p < 0,05$). Como esperado, as medidas de IMC, CA e RCQ foram superiores no grupo de obesos em comparação com os não-obesos ($p < 0,001$). As freqüências de hipertensão, DM2 e historia familiar de DAC também foram maiores no grupo obeso em comparação com o grupo não-obeso ($p \leq 0,001$). As freqüências de menopausa e de fumantes foram similares entre os grupos obeso e não-obeso ($p > 0,05$).

Os indivíduos obesos apresentaram concentrações de leptina e glicose plasmáticas maiores que as do grupo não-obeso ($p < 0,001$). Com relação ao perfil lipídico, os obesos mostraram maiores concentrações de lipídeos séricos que os não-obesos ($p < 0,05$), com exceção dos valores de ApoA1 que foram similares entre os grupos e de HDL-C que foram significativamente menores nos indivíduos obesos. Os obesos, portanto, apresentaram perfil lipídico de maior risco para DAC.

Tabela 3. Dados biodemográficos e determinações bioquímicas do grupo de estudo.

Variável	Total (238)	Obesos (114)	Não-obesos (124)	<i>P</i>
Idade, anos	48 ± 14	52 ± 13	45 ± 15	0,001
IMC, kg/m ²	29,3 ± 6,9	35,2 ± 4,6	23,8 ± 3,1	<0,001
CA, cm	96,1 ± 16,0	107,0 ± 13,6	86,2 ± 10,8	<0,001
RCQ	0,89 ± 0,07	0,91 ± 0,06	0,86 ± 0,07	<0,001
Gênero Feminino	71,8 %	74,6 %	68,5 %	0,564
Menopausa	36,1% (86)	43,8% (50)	29,0% (36)	0,502
Hipertensão arterial	34,4% (82)	63,2% (72)	8,1% (10)	<0,001
Diabete tipo 2	4,2% (10)	8,8% (10)	0% (0)	<0,001
Tabagismo	31,9% (76)	37,7% (43)	26,6% (33)	0,070
Historia familiar de DAC	8,8% (21)	14,9% (17)	2,4% (3)	0,001
Leptina, ng/mL*	22,9 ± 20,6	35,0 ± 21,3	12,0 ± 11,9	<0,001
Glicose, mg/dL	102 ± 27	113 ± 34	92 ± 9	<0,001
Colesterol total, mg/dL)	211 ± 43	219 ± 46	203 ± 39	0,005
HDL-C, mg/dL*	55 ± 14	50 ± 12	60 ± 16	<0,001
LDL-C, mg/dL*	127 ± 36	135 ± 38	120 ± 31	0,001
VLDL-C, mg/dL*	28 ± 13	33 ± 12	23 ± 11	<0,001
Triglicérides, mg/dL*	141 ± 70	169 ± 68	116 ± 62	<0,001
ApoAI, mg/dL*	137 ± 28	135 ± 23	138 ± 32	0,517
ApoB, mg/dL*	107 ± 26	116 ± 26	99 ± 23	<0,001

Nota: Número de indivíduos em parênteses. Os indivíduos com IMC ≥ 30kg/m² foram classificados como obesos (OMS, 2000) .

*Variáveis transformadas em logaritmo (log₁₀) para os testes estatísticos. Variáveis contínuas são apresentadas como média ± DP e comparadas por Teste-t de Student^(a). Variáveis categóricas foram comparadas por qui-quadrado^(b).

IMC: índice de massa corporal; DAC: história familiar de doença arterial coronariana; HDL-c: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-c: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-c: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade; ApoAI: Apolipoproteína AI; ApoB: Apolipoproteína B.

4.2. Polimorfismo *LEP* G-2458A

A distribuição dos genótipos do polimorfismo *LEP* G-2548A do grupo estudado encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg (**Tabela 4**). Este resultado indica que o grupo amostral é representativo da nossa população.

Ao avaliar as frequências alélicas do *LEP* G-2548A, observou-se que o alelo -2548G foi discretamente mais frequente nos indivíduos obesos (64,1%) quando comparados com os indivíduos não-obesos (54,8%; $p=0,052$) (**Tabela 4**).

Considerando-se que a proporção de mulheres foi maior que a de homens do estudo, as frequências do polimorfismo *LEP* G-2548A foram comparadas entre os gêneros, mas não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$) (**Tabela 5**).

Para avaliar a relação entre o polimorfismo *LEP* G-2548A e os parâmetros antropométricos e perfil bioquímico, os portadores do genótipo raro AA foram agrupados com os com genótipo heterozigoto GA. No grupo de obesos, as mulheres portadoras do genótipo GA+AA apresentaram maior concentração de ApoA1 sérica que as portadoras do genótipo GG ($p<0,05$) (**Tabela 6**). Os demais parâmetros não diferiram entre os genótipos independentemente do gênero.

No grupo de não-obesos, os homens portadores do genótipo GA+AA tiveram concentrações séricas de HDL-C maior e de triglicérides menor que os portadores do genótipo GG ($p<0,05$) (**Tabela 7**).

Tabela 4. Distribuição de genótipos e frequência de alelos do polimorfismo *LEP* G-2548A em indivíduos obesos e não obesos

Grupos	Distribuição dos genótipos			Frequência de alelos	
	GG	GA	AA	G	A
Obesos	39,5 %	49,1 %	11,4%	64,1 %	35,9 %
(114)	(45)	(56)	(13)		
Não-obesos	27,4 %	54,8 %	17,8 %	54,8 %	45,2 %
(124)	(34)	(68)	(22)		
	$\chi^2 = 4,595$ (2gl, $p=0,101$)			$\chi^2 = 3,789$ (1gl, $p=0,052$)	
Total	33,2 %	52,1 %	14,7 %	59,2 %	40,8 %
(238)	(79)	(124)	(35)		
EHW	$\chi^2=1,489$, $p<0,05$				

Nota: número de indivíduos entre parêntesis. EHW: equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 5. Distribuição de genótipos e frequência de alelos do polimorfismo *LEP* G-2548A, em mulheres e homens

Grupos	Distribuição dos genótipos			Frequência de alelos	
Obesos	GG	GA	AA	G	A
Mulheres	41,9 %	47,6 %	10,5%	65,7 %	34,3 %
(86)	(36)	(41)	(9)		
Homens	32,2 %	53,5 %	14,3%	58,9%	41,1%
(28)	(9)	(15)	(4)		
$\chi^2 = 0,925$ (2gl, $p=0,630$)			$\chi^2 = 0,572$ (1gl, $p=0,449$)		
Não-obesos	GG	GA	AA	G	A
Mulheres	21,2%	58,8%	20,0%	50,6%	49,4%
(85)	(18)	(50)	(17)		
Homens	41,0%	46,2%	12,8%	64,1%	35,9%
(39)	(16)	(18)	(5)		
$\chi^2 = 5,401$ (2gl, $p=0,067$)			$\chi^2 = 3,416$ (1gl, $p=0,065$)		

Nota: número de indivíduos entre parêntesis.

Tabela 6. Relação entre o polimorfismo *LEP* G-2548A e parâmetros antropométricos e perfil bioquímico em indivíduos obesos.

Variável	Total			Homens			Mulheres		
	Genótipos			Genótipos			Genótipos		
	GG (45)	GA+AA (69)	P	GG (9)	GA+AA (19)	P	GG (36)	GA+AA (50)	P
IMC, kg/m ²	34,7 ± 3,6	35,6 ± 5,0	0,703	36,6±4,3	36,3±5,1	0,846	34,2±3,3	35,3±5,0	0,631
CA, cm	106 ± 10	108 ± 17	0,338	117,3±11,0	118,5±12,5	0,967	104,3±8,7	104,0±16,3	0,593
RCQ	0,91 ± 0,05	0,92 ± 0,06	0,998	0,95±0,03	0,98±0,05	0,780	0,90±0,05	0,90±0,04	0,560
Leptina, ng/mL	37,5 ± 18,5	37,1 ± 18,0	0,165	23,6±17,0	15,1±12,1	0,212	40,5±17,3	39,0±21,2	0,580
Glicose, mg/dL	116 ± 39	110 ± 30	0,179	130,7±57,6	107,7±16,2	0,712	113,0±32,0	11,3±34,1	0,155
CT, mg/dL	215 ± 48	221 ± 44	0,645	221,1±54,1	212,0±30,7	0,590	213,5±46,4	224,8±48,1	0,282
HDL-C, mg/dL	49 ± 12	50 ± 11	0,271	41,6±4,8	43,2±5,8	0,499	50,7±13,0	53,0±11,1	0,406
LDL-C, mg/dL	134 ± 42	135 ± 36	0,900	141,4±45,6	133,5±32,0	0,641	132,5±40,4	136,0±37,2	0,651
VLDL-C, mg/dL	33 ± 13	33 ± 12	0,845	38,0±12,5	35,2±14,1	0,631	32,0±12,7	31,7±10,1	0,924
TG, mg/dL	166 ± 65	170 ± 70	0,754	190,2±62,2	176,0±70,7	0,622	160,1±64,2	168,1±69,4	0,592
ApoA1, mg/dL	134,8 ± 25,4	143,6 ± 28,0	0,076	120,8±18,5	123,4±11,8	0,671	137,6±25,6	151,2±28,4	0,027
ApoB, mg/dL	109,1 ± 27,5	114,6 ± 26,5	0,294	119,7±24,6	120,1±21,0	0,972	106,5±27,5	112,5±28,1	0,328

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. Resultados apresentados como média ± desvio-padrão de dados transformados em logaritmo (log₁₀) e comparados por teste-*t* de Student, com exceção da glicose e leptina que foram comparadas por teste de Mann-Whitney. ApoA1: apolipoproteína A1; ApoB: apolipoproteína B; CA: circunferência abdominal; CT: colesterol total; HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; IMC: índice de massa corporal; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; RCQ: razão cintura-quadril; TG: triglicérides; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.

4.3. Polimorfismos *LEPR*

A distribuição dos genótipos dos polimorfismos *LEPR* grupo estudado encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg (**Tabelas 8, 12 e 16**). Estes resultados indicam que a amostra é representativa da nossa população.

Na **tabela 8**, são apresentadas as freqüências de genótipos e alelos do polimorfismo *LEPR* Lys109Arg (A1960G), no grupo estudado. A freqüência do alelo A foi maior em obesos (60,5%) que em não-obesos (48,0%; $p=0,008$). O genótipo AA também foi mais freqüente no grupo de obesos ($p<0,001$). Este resultado é sugestivo de que a variante *LEPR* Lys109Arg está associada com obesidade na nossa população. As freqüências genotípicas e alélicas do polimorfismo *LEPR* Lys109Arg (A1960G) foram similares entre homens e mulheres de ambos os grupos obesos e não-obeso ($p>0,05$) (**Tabela 9**).

Nas **tabelas 10 e 11**, são apresentados os resultados dos parâmetros antropométricos e perfil bioquímico para os grupos de obesos e não-obesos, respectivamente, de acordo com os genótipos do polimorfismo *LEPR* Lys109Arg (A1960G).

A glicemia foi maior nos portadores de genótipo 1960AG+GG que nos com genótipo AA em obesos ($p<0,05$) (**Tabela 10**) e não obesos ($p<0,001$) (**Tabela 11**). Estas diferenças foram independentes do gênero, em ambos os grupos.

Com relação ao perfil lipídico, os portadores do alelo 1960G (genótipos AG+GG) tiveram maiores concentrações séricas de colesterol total, triglicérides e VLDL-C ($p<0,05$) quando comparadas com as dos

portadores do genótipo AA, no grupo de obesos (**Tabela 10**). Estas diferenças foram encontradas em mulheres, mas não em homens, sugerindo que a influencia do polimorfismo *LEPR* Lys109Arg no perfil lipídico é dependente do gênero. Esses resultados são sugestivos de que o polimorfismo Lys109Arg está associado com perfil lipídico de maior risco para DAC em mulheres.

O alelo G (genótipo AG+GG) também foi associado com maior valor de IMC e de concentração sérica de apoB em não-obesos do sexo masculino (**Tabela 11**).

Os dados foram também avaliados em pacientes não-diabéticos, os resultados são apresentados nas **tabelas 12 e 13**. Observou-se que os portadores do alelo 109Arg (genótipos 1960AG+GG) têm maiores concentrações de glicose em obesos e não-obesos independentemente do gênero. No grupo de obesos não-diabéticos, o alelo 109Arg também foi relacionado com maiores concentrações de CT, LDL-C, VLDL-C e TG que os portadores do alelo 109Lys (genótipo AA) (**Tabela 12**). Estas diferenças foram observadas apenas no grupo do gênero feminino.

Tabela 8. Distribuição de genótipos e frequência de alelos do polimorfismo *LEPR* Lys109Arg (A1960G) em indivíduos obesos e não-obesos

Grupos	Distribuição dos genótipos			Frequência de alelos	
	AA	AG	GG	A	G
Obesos (114)	32,4% (37)	56,2% (64)	11,4% (13)	60,5%	39,5%
Não-obesos (124)	27,4% (34)	41,2% (51)	31,4% (39)	48,0%	52,0%
	$\chi^2=14,201$ (2gl, $p<0,001$)			$\chi^2= 7,026$ (1gl, $p=0,008$)	
Total (238)	29,8% (71)	48,4% (115)	21,8% (52)	53,9%	46,1%
EHW	$\chi^2 = 0,182$ $p>0.05$				

Nota: número de indivíduos entre parêntesis. EHW: equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 9. Distribuição de genótipos e freqüência de alelos do polimorfismo *LEPR* Lys109Arg (A1960G) em mulheres e homens

Grupos	Distribuição dos genótipos			Freqüência de alelos	
	AA	AG	GG	A	G
Obesos					
Mulheres	33,8%	54,6%	11,6%	61,0 %	39,0 %
(86)	(29)	(47)	(10)		
Homens	28,6 %	60,7 %	10,7%	58,9%	41,1%
(28)	(8)	(17)	(3)		
	$\chi^2 = 0,326$ (2gl, $p=0,849$)			$\chi^2 = 0,0154$ (1gl, $p=0,901$)	
Não-obesos					
Mulheres	28,3%	40,0%	31,7%	48,2%	51,8%
(85)	(24)	(34)	(27)		
Homens	25,6%	43,6%	30,8%	47,4%	52,6%
(39)	(10)	(17)	(12)		
	$\chi^2 = 0,158$ (2gl, $p=0,924$)			$\chi^2 = 0,0040$ (1gl, $p=0,984$)	

Tabela 10. Relação entre o polimorfismo *LEPR* Lys109Arg (A1960G) e parâmetros antropométricos e perfil bioquímico em indivíduos obesos

Variável	Total			Homens			Mulheres		
	Genótipos			Genótipos			Genótipos		
	AA (37)	AG+GG (77)	P	AA (8)	AG+GG (20)	P	AA (29)	AG+GG (57)	P
IMC (kg/m ²)	35,2 ± 4,3	35,2 ± 4,6	0,786	38,7±6,3	35,3±4,0	0,071	34,3±3,2	35,1±4,9	0,985
CA (cm)	102,2 ±12,3	100,8 ±17,3	0,752	122,3±15,5	115,5±10,2	0,064	100,5±19,3	106,0±9,3	0,860
RCQ	0,90 ± 0,05	0,89 ± 0,06	0,953	0,98±0,04	0,96±0,04	0,879	0,89±0,04	0,91±0,04	0,908
Leptina (ng/ml)	34,7 ±20,2	34,0 ±20,9	0,649	34,8±17,4	35,4±20,6	0,980	36,1±23,3	31,0±19,6	0,241
Glicose (mg/dL)	98,4 ±29,7	119,6 ±34,1	<0,001	93,8±8,0	114,0±23,3	0,008	100,6±33,7	120,8±38,0	<0,001
CT, mg/dL	203,9±433	226,0 ±45,6	0,016	214,7±71,3	214,7±38,2	0,998	203,3±37,6	224,2±45,2	0,041
HDL-C (mg/dL)	49,5 ± 9,8	50,7 ± 12,9	0,851	54,4±18,4	47,7±10,6	0,275	50,0±10,5	49,4±10,0	0,800
LDL-C (mg/dL)	128,1 ± 39,4	137,2 ±38,3	0,250	134,0±60,3	133,4±38,3	0,979	128,7±34,2	135,2±36,4	0,460
VLDL-C (mg/dL)	27,4± 9,7	35,5 ± 12,2	<0,001	36,7±10,6	32,0±9,6	0,279	24,5±7,6	36,0±13,0	<0,001
TG (mg/dL)	136,8±48,7	183,9 ±70,6	<0,001	182,6±53,4	160,2±48,1	0,309	122,5±37,8	186,4±77,6	<0,001
ApoA1, mg/dL	137,2±24,9	137,3±29,1	0,995	150,2±31,3	137,0±26,6	0,283	135,8±26,3	137,9±43,4	0,764
ApoB, mg/dL	106,3±22,6	115,7±28,0	0,082	104,3±27,3	115,1±22,8	0,316	105,6±22,3	112,4±30,3	0,303

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. Resultados apresentados como média ± desvio-padrão de dados transformados em logaritmo (log₁₀) e comparados por teste-t de Student com exceção da glicose e leptina que foram comparadas por teste de Mann-Whitney. ApoA1: apolipoproteína A1; ApoB: apolipoproteína B; CA: circunferência abdominal; CT: colesterol total; HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; IMC: índice de massa corporal; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; RCQ: razão cintura-quadril; TG: triglicérides; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.

Tabela 11. Relação entre o polimorfismo *LEPR* Lys109Arg (A1960G) e parâmetros antropométricos e perfil bioquímico em indivíduos não-obesos

Variável	Total			Homens			Mulheres		
	Genótipos			Genótipos			Genótipos		
	AA (34)	AG+GG (90)	P	AA (10)	AG+GG (29)	P	AA (24)	AG+GG (61)	P
IMC (kg/m ²)	24,5 ± 3,0	24,1 ± 3,0	0,109	23,2±3,1	25,5±2,6	<0,001	23,1±3,1	23,5±3,0	0,711
CA (cm)	88,2 ± 10,8	90,7 ± 14,6	0,077	88,0±9,6	93,1±8,2	0,082	83,2±9,6	84,1±10,8	0,488
RCQ	0,88 ± 0,06	0,91 ± 0,07	0,330	0,88±0,03	0,91±0,05	0,378	0,84±0,06	0,85±0,07	0,134
Leptina (ng/ml)	12,3 ± 12,5	12,6 ± 13,1	0,963	13,6±14,6	17,7±16,2	0,364	12,9±12,6	10,0±9,7	0,452
Glicose (mg/dL)	92,8 ± 8,6	94,7 ± 9,1	<0,001	87,0±3,1	97,1±9,3	0,001	84,1±6,1	94,1±9,0	<0,001
CT, mg/dL	203,1 ± 40,1	201,3 ± 40,3	0,537	207,4±38,2	219,7±46,0	0,463	194,2±37,6	195,3±38,0	0,902
HDL-C (mg/dL)	57,3 ± 19,0	57,3 ± 14,1	0,165	62,2±14,5	60,4±16,0	0,769	59,6±18,1	55,8±13,0	0,286
LDL-C (mg/dL)	120,5 ± 32,1	119,2 ± 33,4	0,433	123,4±33,8	129,5±33,1	0,623	113,2±25,7	117,2±34,5	0,681
VLDL-C (mg/dL)	26,7 ± 11,6	25,1 ± 11,5	0,275	25,0±13,0	26,3±15,6	0,789	23,0±9,1	25,3±9,6	0,344
TG, mg/dL	125,5 ± 58,7	117,0 ± 63,8	0,519	109,0±65,7	141,2±93,0	0,412	111,4±49,7	109,7±44,5	0,891
ApoA1, mg/dL	134,3 ± 36,1	134,5 ± 31,1	0,136	144,1±20,7	141,9±27,7	0,815	143,0±30,7	129,2±29,6	0,063
ApoB, mg/dL	93,1 ± 28,1	106,7 ± 24,0	0,159	90,6±23,1	100,3±23,6	0,037	92,4±21,0	94,0±26,7	0,745

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. Resultados apresentados como média ± desvio-padrão de dados transformados em logaritmo (log₁₀) e comparados por teste-t de Student com exceção da glicose e leptina que foram comparadas por teste de Mann-Whitney. ApoA1: apolipoproteína A1; ApoB: apolipoproteína B; CA: circunferência abdominal; CT: colesterol total; HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; IMC: índice de massa corporal; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; RCQ: razão cintura-quadril; TG: triglicérides; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.

Tabela 12. Relação entre o polimorfismo *EPR* Lys109Arg (A1960G) e parâmetros antropométricos e perfil bioquímico em indivíduos obesos não-diabéticos.

Variável	Total		Homens		Mulheres				
	Genótipos		Genótipos		Genótipos				
	AA (18)	AG+GG (42)	P	AA (8)	AG+GG (10)	P	AA (20)	AG+GG (22)	P
IMC (kg/m²)	35,2 ± 4,2	35,0 ± 4,7	0,738	38,7±5,7	35,7±4,6	0,071	34,4±3,2	34,6±4,6	0,985
CA (cm)	102,8 ±14,1	99,4±19,4	0,757	126,0±16,6	116,9±10,4	0,064	100,2±19,9	106,2±10,3	0,860
RCQ	0,91 ± 0,06	0,88 ± 0,06	0,191	0,98±0,04	0,97±0,06	0,879	0,89±0,04	0,92±0,05	0,908
Leptina (ng/ml)	33,2 ±22,7	36,3±22,7	0,815	31,3±12,0	37,5±23,4	0,980	34,3±21,6	36,4±21,4	0,241
Glicose (mg/dL)	91,5 ±7,2	101,1 ±8,8	<0,001	93,0±6,3	104,0±6,4	0,008	91,2±9,4	96,7±8,9	<0,001
CT, mg/dL	200,5±30,1	231,7±45,4	0,011	209,2±72,4	222,7±45,3	0,998	205,8±36,9	235,8±47,5	0,041
HDL-C (mg/dL)	50,9 ± 8,6	51,5 ± 14,6	0,482	45,6±1,2	52,0±17,0	0,275	51,1±10,6	51,0±10,6	0,800
LDL-C (mg/dL)	121,5± 35,0	142,0 ±36,2	0,037	142,0±81,7	140,1±32,8	0,979	130,0±33,2	142,9±36,0	0,460
VLDL-C (mg/dL)	26,2±8,0	33,3 ± 11,2	0,038	42,6±6,8	30,5±8,3	0,279	24,7±7,6	33,6±12,0	<0,001
TG (mg/dL)	130,7±39,6	178,0 ±74,8	0,016	212,0±34,3	152,7±41,5	0,309	112,0±36,4	184,2±89,2	<0,001
ApoA1, mg/dL	139,4±16,7	134,9±29,0	0,142	146,0±15,7	132,1±29,7	0,283	140,4±29,1	138,6±38,0	0,764
ApoB, mg/dL	103,7±16,1	115,4±30,4	0,080	97,6±28,8	120,8±22,0	0,316	107,6±20,4	109,4±34,1	0,223

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. Resultados apresentados como média $\pm$ desvio-padrão de dados transformados em logaritmo ($\log_{10}$) e comparados por teste-*t* de Student com exceção da glicose e leptina que foram comparadas por teste de Mann-Whitney. ApoA1: apolipoproteína A1; ApoB: apolipoproteína B; CA: circunferência abdominal; CT: colesterol total; HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; IMC: índice de massa corporal; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; RCQ: razão cintura-quadril; TG: triglicérides; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.

Tabela 13. Relação entre o polimorfismo *LEPR* Lys109Arg (A1960G) e parâmetros antropométricos e perfil bioquímico em indivíduos não-obesos não-diabéticos.

Variável	Total			Homens			Mulheres		
	Genótipos			Genótipos			Genótipos		
	AA (34)	AG+GG (80)	P	AA (10)	AG+GG (24)	P	AA (24)	AG+GG (56)	P
IMC (kg/m ²)	24,5 ± 3,0	23,9 ± 3,0	0,100	23,2±3,1	25,5±2,6	<0,001	22,9±3,3	23,5±3,0	0,711
CA (cm)	88,2 ± 10,8	90,0 ± 14,1	0,076	88,0±9,6	90,1±8,2	0,082	84,2±9,9	83,6±10,8	0,488
RCQ	0,88 ± 0,06	0,88 ± 0,07	0,068	0,88±0,03	0,90±0,04	0,378	0,84±0,06	0,85±0,07	0,134
Leptina (ng/ml)	12,3 ± 11,0	13,7 ± 12,5	<0,001	13,6±14,6	13,8±12,0	0,364	13,4±12,6	10,3±9,7	0,452
Glicose (mg/dL)	84,7 ± 5,2	93,6 ± 7,7	<0,001	87,0±3,1	95,1±8,5	0,001	84,1±6,1	93,0±7,3	<0,001
CT, mg/dL	203,1 ± 40,1	201,2 ± 41,0	0,281	207,4±38,2	200,7±47,6	0,463	194,2±37,6	195,3±38,0	0,902
HDL-C (mg/dL)	57,3 ± 19,0	57,3 ± 14,3	0,288	62,2±14,5	59,5±16,0	0,769	56,9±18,1	55,8±13,0	0,286
LDL-C (mg/dL)	120,5 ± 32,1	119,0 ± 34,1	0,313	123,4±33,8	129,5±33,1	0,623	113,2±25,7	117,2±34,5	0,681
VLDL-C (mg/dL)	26,7 ± 11,6	25,4 ± 11,6	0,174	24,6±13,0	26,3±15,6	0,789	23,0±9,1	25,3±9,6	0,344
TG, mg/dL	125,5 ± 58,7	117,9 ± 64,8	0,152	109,0±65,7	141,2±93,0	0,412	111,4±49,7	109,7±44,5	0,891
ApoA1, mg/dL	134,3 ± 36,1	134,4 ± 31,6	0,260	144,1±20,7	141,9±27,7	0,815	143,0±30,7	129,2±29,6	0,063
ApoB, mg/dL	94,6 ± 25,6	100,9 ± 24,9	0,019	93,1±28,1	100,7±24,0	0,159	92,4±21,0	94,0±26,7	0,790

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. Resultados apresentados como média ± desvio-padrão de dados transformados em logaritmo (log₁₀) e comparados por teste-*t* de Student com exceção da glicose e leptina que foram comparadas por teste de Mann-Whitney. ApoA1: apolipoproteína A1; ApoB: apolipoproteína B; CA: circunferência abdominal; CT: colesterol total; HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; IMC: índice de massa corporal; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; RCQ: razão cintura-quadril; TG: triglicérides; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.

Na **tabela 14**, são apresentadas as freqüências de genótipos e alelos do polimorfismo *LEPR* Gln223Arg (A3468G), no grupo estudado. A freqüência do alelo G no polimorfismo Gln223Arg (A3468G) foi maior em obesos (41,6%) que em não-obesos (31,9%; $p=0,034$). O genótipo GG foi mais freqüente no grupo obeso (20,1%) que no não-obeso (8,8%, $p=0,040$) (**tabela 14**). Estes dados são sugestivos que de o polimorfismo Gln223Arg também está associado com obesidade.

Considerando-se que a proporção de mulheres foi maior que a de homens do estudo, as freqüências do polimorfismo *LEPR* Gln223Arg (A3468G) foram comparadas entre os gêneros, mas não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$) (**Tabela 15**).

Nas **tabelas 16 e 17**, são mostrados os dados antropométricos e perfil bioquímico dos portadores dos genótipos do polimorfismo *LEPR* Gln223Arg (A3468G) dos grupos obesos e não-obesos, respectivamente. Os portadores do alelo 3468G (genótipo AG+GG) tiveram maiores valores de IMC, CA e leptina que os portadores do genótipo AA ($p<0,05$) e estas diferenças foram independentes do gênero (**Tabela 16**).

No grupo de não-obesos, o alelo G (genótipo AG/GG) também foi relacionado com maiores valores de IMC e CA independentemente do gênero ($p<0,05$) (**Tabela 17**). A média de RCQ também foi maior nos portadores de alelo G no grupo total, entretanto, não foram observadas diferenças nos grupos de homens e de mulheres. Foi também observado que o alelo G está associado com maior concentração de leptina ($p=0,009$), em homens mas não em mulheres (**Tabela 17**).

O alelo 3468G foi relacionado com maiores concentrações séricas de glicose, LDL-C e menores concentrações de ApoA1 em comparação com o genotipo AA ($p < 0,05$). Estas diferenças foram encontradas somente no grupo de mulheres não-obesas (**Tabela 17**).

Tabela 14. Distribuição de genótipos e freqüência de alelos do polimorfismo *LEPR* Gln223Arg (A3468G) em indivíduos obesos e não-obesos

Grupos	Distribuição dos genótipos			Freqüência de alelos	
	AA	AG	GG	A	G
Obesos (114)	36,9% (42)	43,0% (49)	20,1% (23)	58,4%	41,6%
Não-obesos (124)	45,2% (56)	46,0% (57)	8,8% (11)	68,1%	31,9%
	$\chi^2 = 6,430$ (2gl, $p = 0,040$)			$\chi^2 = 4,571$ (1gl, $p = 0,034$)	
Total (238)	41,2% (98)	44,5% (106)	14,3% (34)	63,4%	36,6%
EHW	$\chi^2 = 0,387$		$p < 0,05$		

Nota : número de indivíduos entre parêntesis. EHW: equilíbrio de Hardy-Weinberg

Tabela 15. Distribuição de genótipos e frequência de alelos do polimorfismo *LEPR* Gln223Arg (A3468G) em mulheres e homens

Grupos	Distribuição dos genótipos			Frequência de alelos	
Obesos	AA	AG	GG	A	G
Mulheres	34,9%	45,3%	19,8%	57,6 %	42,4 %
(86)	(30)	(39)	(17)		
Homens	42,8 %	35,8%	21,4%	60,7%	39,3%
(28)	(12)	(10)	(6)		
	$\chi^2 = 0,850$ (2gl, $p=0,654$)			$\chi^2 = 0,076$ (1gl, $p=0,795$)	
Não-obesos	AA	AG	GG	A	G
Mulheres	45,9%	43,5%	10,5%	67,6%	32,4%
(85)	(39)	(37)	(9)		
Homens	43,6%	51,3%	5,1%	69,2%	30,8%
(39)	(17)	(20)	(2)		
	$\chi^2 = 1,279$ (2gl, $p=0,528$)			$\chi^2 = 0,0104$ (1gl, $p=0,919$)	

Nota : número de indivíduos entre parêntesis.

Tabela 16. Relação entre o polimorfismo *LEPR* Gln223Arg (A3468G) e parâmetros antropométricos e perfil bioquímico em indivíduos obesos

Variável	Total		Homens		Mulheres	
	Genótipos		Genótipos		Genótipos	
	AA (42)	AG+GG (72)	P	AA (12)	AG+GG (16)	P
IMC (kg/m ²)	32,1±1,6	37,0±4,7	0,022	32,4±2,1	39,4±4,2	<0,001
CA (cm)	102,9±7,0	110,2±17,0	<0,001	107,8±4,7	126,5±9,4	<0,001
RCQ	0,92±0,05	0,91±0,06	0,900	0,94±0,03	1,00±0,03	0,479
Leptina (ng/ml)	23,9±14,9	40,3±21,4	0,022	10,6±6,1	23,3±16,3	0,040
Glicose (mg/dL)	106,5±22,3	116,4±39,1	0,196	107,0±18,3	121,5±42,2	0,458
CT, mg/dL	221,0±52,1	217,5±42,0	0,694	217,9±32,6	212,7±44,6	0,744
HDL-C (mg/dL)	51,3±10,5	48,7±11,8	0,195	44,7±5,0	41,3±5,5	0,125
LDL-C (mg/dL)	135,3±39,8	134,7±37,4	0,936	141,9±24,2	131,6±43,8	0,489
VLDL-C (mg/dL)	31,8±13,6	33,5±11,2	0,479	31,3±14,1	39,6±12,2	0,119
TG, mg/dL	170,6±84,6	167,4±56,0	0,810	157,2±70,8	198,0±61,0	0,128
ApoA1, mg/dL	135,6±21,0	138,8±31,6	0,569	121,3±10,0	123,6±16,8	0,690
ApoB, mg/dL	116,1±27,5	110,3±26,7	0,199	122,5±18,0	118,0±24,7	0,610
						0,390

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. Resultados apresentados como média ± desvio-padrão de dados transformados em logaritmo (log₁₀) e comparados por teste-*t* de Student com exceção da glicose e leptina que foram comparadas por teste de Mann-Whitney. ApoA1: apolipoproteína A1; ApoB: apolipoproteína B; CA: circunferência abdominal; CT: colesterol total; HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; IMC: índice de massa corporal; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; RCQ: razão cintura-quadril; TG: triglicérides; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.

Tabela 17. Relação entre o polimorfismo *LEPR* Gln223Arg (A3468G) e parâmetros antropométricos e perfil bioquímico em indivíduos não-obesos

Variável	Total		P	Homens		P	Mulheres		P
	AA (56)	AG+GG (68)		AA (17)	AG+GG (22)		AA (39)	AG+GG (46)	
IMC (kg/m²)	22,1±2,5	25,2±2,8	<0,001	23,0±2,7	26,4±2,1	<0,001	21,8±2,3	24,7±2,9	<0,001
CA (cm)	81,3±8,7	90,5±10,3	<0,001	87,0±7,5	95,5±8,0	0,002	78,9±8,1	88,1±10,4	<0,001
RCQ	0,84±0,05	0,88±0,06	0,064	0,87±0,03	0,92±0,04	0,423	0,83±0,05	0,86±0,07	0,094
Leptina (ng/ml)	8,6±7,1	14,7±13,8	0,062	3,6±3,4	5,3±2,8	0,009	10,8±7,2	19,2±14,7	0,228
Glicose (mg/dL)	88,7±7,8	94,6±9,6	<0,001	90,1±10,0	95,3±10,5	0,138	88,1±6,5	94,3±9,2	<0,001
CT, mg/dL	194,6±33,7	204,3±43,9	0,181	191,5±29,7	199,0±43,0	0,526	196,1±35,2	206,8±44,1	0,233
HDL-C (mg/dL)	61,1±15,1	56,3±14,8	0,078	50,1±10,4	47,9±8,0	0,478	66,0±14,3	60,3±15,7	0,092
LDL-C (mg/dL)	111,4±26,2	123,2±36,1	0,045	117,9±25,7	124,5±42,7	0,587	108,5±25,9	122,5±32,3	0,035
VLDL-C (mg/dL)	22,8±11,3	25,8±10,9	0,057	24,7±9,1	26,7±11,1	0,570	22,6±12,1	25,4±10,7	0,068
TG, mg/dL	109,6±57,8	118,4±63,8	0,431	120,6±52,3	128,6±53,4	0,625	104,8±59,2	113,5±67,6	0,628
ApoA1, mg/dL	145,7±31,0	130,0±28,2	0,004	121,0±17,0	121,3±14,6	0,953	156,5±29,5	134,1±32,0	0,001
ApoB, mg/dL	91,4±20,9	97,7±27,5	0,166	93,3±20,4	103,8±26,8	0,202	90,6±21,1	94,8±27,3	0,442

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. Resultados apresentados como média $\pm$ desvio-padrão de dados transformados em logaritmo ($\log_{10}$) e comparados por teste-*t* de Student com exceção da glicose e leptina que foram comparadas por teste de Mann-Whitney. ApoA1: apolipoproteína A1; ApoB: apolipoproteína B; CA: circunferência abdominal; CT: colesterol total; HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; IMC: índice de massa corporal; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; RCQ: razão cintura-quadril; TG: triglicérides; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.

Para o polimorfismo *LEPR* Lys656Asn (G9546C), a frequência do alelo 9456C foi similar entre obesos (33,9%) e não-obesos (28,6%, $p=0,363$) (**Tabela 18**). Também não foram observadas diferenças nas distribuições de genótipos deste polimorfismo entre obesos e não-obesos ($p=0,253$), mesmo quando foram comparadas as frequências entre homens e mulheres ($p>0,05$) (**Tabela 19**).

Os dados antropométricos e perfil bioquímico dos portadores dos genótipos do polimorfismo Lys656Asn (G9546C) nos indivíduos obesos e não-obesos são apresentados nas **tabelas 20 e 21**, respectivamente. No grupo obeso, foi observado que os valores de IMC e CA foram maiores em homens portadores do genótipo 9546GG em comparação com os portadores do alelo C (genótipos GC+CC) ($p<0,05$) (**Tabela 20**). O genótipo 9546GG também foi associado com maiores concentrações de LDL-C em mulheres obesas (**Tabela 20**). No grupo não-obeso, o polimorfismo *LEPR* Lys656Asn não foi relacionado com as variáveis estudadas (**Tabela 21**).

Tabela 18. Distribuição de genótipos e freqüência de alelos do polimorfismo *LEPR* Lys656Asn (G9546C) em indivíduos obesos e não-obesos

Grupos	Distribuição dos genótipos			Freqüência de alelos	
	GG	GC	CC	G	C
Obesos	44,7%	44,7%	10,6%	67,1%	32,9%
(114)	(51)	(51)	(12)		
Não-obesos	47,6%	47,5%	4,8%	71,4%	28,6%
(124)	(59)	(59)	(6)		
	$\chi^2=2,748$ (2gl, $p=0,253$)			$\chi^2=0,826$ (1gl, $p=0,363$)	
Total	46,2%	46,2%	7,6%	69,3%	30,7%
(238)	(110)	(110)	(18)		
EHW	$\chi^2=1,783$		$p<0,05$		

Nota : número de indivíduos entre parêntesis. EHW: equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 19. Distribuição de genótipos e freqüência de alelos do polimorfismo *LEPR* Lys656Asn (G9546C) em mulheres e homens

Grupos	Distribuição dos genótipos			Freqüência de alelos	
	GG	GC	CC	G	C
Obesos					
Mulheres	44,2%	46,5%	9,3%	67,4 %	32,6 %
(86)	(38)	(40)	(8)		
Homens	46,5 %	39,2 %	14,3%	66,0%	34,0%
(28)	(13)	(11)	(4)		
	$\chi^2=0,769$ (2gl, $p=0,681$)			$\chi^2=0,007$ (1gl, $p=0,979$)	
Não-obesos					
Mulheres	49,4%	44,7%	5,9%	71,8%	28,2%
(85)	(42)	(38)	(5)		
Homens	43,6%	53,8%	2,6%	70,5%	29,5%
(39)	(17)	(21)	(1)		
	$\chi^2=1,628$ (2gl, $p=0,530$)			$\chi^2=0,003$ (1gl, $p=0,959$)	

Nota : número de indivíduos entre parêntesis.

Tabela 20. Relação entre o polimorfismo *LEPR* Lys656Asn (G9546C) e parâmetros antropométricos e perfil bioquímico em indivíduos obesos

Variável	Total		Homens			Mulheres			
	Genótipos		Genótipos		P	Genótipos			
	GG (51)	GC+CC (63)	P	GG (17)		GC+CC (22)	GG (39)	GC+CC (46)	P
IMC (kg/m²)	36,4±5,1	34,3±3,7	0,075	38,8±5,3	34,3±3,4	0,016	35,5±4,9	34,3±3,8	0,507
CA (cm)	109,4±18,8	105,9±9,3	0,060	125,3±11,4	111,5±8,2	0,007	104,0±17,8	104,2±9,0	0,590
RCQ	0,92±0,06	0,92±0,05	0,680	1,00±0,04	0,96±0,04	0,370	0,89±0,04	0,90±0,05	0,458
Leptina (ng/ml)	38,3±22,0	31,0±19,1	0,069	24,0±16,7	12,5±9,2	0,082	43,3±21,5	36,7±17,1	0,159
Glicose (mg/dL)	111,1±35,9	114,1±32,7	0,236	104,7±17,5	124,1±45,8	0,222	113,2±40,1	111,0±26,6	0,578
CT, mg/dL	226,0±50,9	213,0±40,7	0,135	212,8±49,1	216,7±29,7	0,807	230,5±50,7	211,8±43,5	0,073
HDL-C (mg/dL)	48,7±11,0	50,1±11,7	0,505	41,3±5,0	43,9±5,8	0,245	51,3±11,4	52,6±12,3	0,629
LDL-C (mg/dL)	141,6±41,3	129,4±34,6	0,151	132,7±44,4	138,9±29,0	0,675	144,7±39,7	126,3±35,7	0,031
VLDL-C (mg/dL)	33,7±11,4	32,2±12,6	0,526	38,6±12,9	33,8±14,0	0,372	32,0±10,4	31,7±12,0	0,922
TG, mg/dL	172,7±65,8	165,3±69,5	0,568	192,7±64,7	170,0±70,0	0,397	165,9±64,8	163,9±69,4	0,894
ApoA1, mg/dL	136,0±29,6	138,9±26,9	0,558	125,8±16,6	119,8±11,3	0,290	143,1±25,7	139,5±32,1	0,409
ApoB, mg/dL	114,0±27,5	111,1±26,6	0,575	114,1±20,0	125,0±22,8	0,209	118,7±28,2	114,0±29,7	0,242

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. Resultados apresentados como média ± desvio-padrão de dados transformados em logaritmo (log₁₀) e comparados por teste-*t* de Student com exceção da glicose e leptina que foram comparadas por teste de Mann-Whitney. ApoAI: apolipoproteína AI; ApoB: apolipoproteína B; CA: circunferência abdominal; CT: colesterol total; HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; IMC: índice de massa corporal; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; RCQ: razão cintura-quadril; TG: triglicéides; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.

Tabela 21. Relação entre o polimorfismo *LEPR* Lys656Asn (G9546C) e parâmetros antropométricos e perfil bioquímico em indivíduos não-obesos

Variável	Total			Homens			Mulheres		
	Genótipos			Genótipos			Genótipos		
	GG (59)	GC+CC (65)	P	GG (17)	GC+CC (22)	P	GG (39)	GC+CC (46)	P
IMC (kg/m ²)	24,0±3,0	23,7±3,1	0,749	25,4±2,9	24,5±2,9	0,372	23,4±2,9	23,3±3,1	0,909
CA (cm)	86,3±10,8	86,4±10,5	0,881	91,9±9,5	91,7±8,4	0,832	84,0±10,5	83,7±10,4	0,840
RCQ	0,87±0,07	0,86±0,06	0,201	0,90±0,05	0,90±0,04	0,898	0,85±0,07	0,84±0,06	0,130
Leptina (ng/ml)	12±10,4	11,9±112,8	0,326	4,8±3,0	4,3±3,6	0,434	14,9±11,0	15,8±14,0	0,658
Glicose (mg/dL)	92,6±9,2	91,4±9,4	0,458	94,4±11,4	92,0±9,8	0,512	91,9±8,0	91,0±9,2	0,635
CT, mg/dL	194,9±41,6	204,4±37,7	0,189	186,8±36,9	203,2±37,4	0,216	198,2±42,9	205,5±37,9	0,415
HDL-C (mg/dL)	56,8±13,9	60,0±16,0	0,238	49,7±8,8	48,2±9,3	0,615	59,6±14,5	66,1±15,4	0,054
LDL-C (mg/dL)	113,4±32,9	121,7±31,6	0,163	111,4±37,1	129,5±33,9	0,132	114,3±30,9	117,7±29,6	0,610
VLDL-C (mg/dL)	23,9±11,9	24,9±10,4	0,364	27,3±9,6	24,7±10,7	0,466	22,5±12,5	25,1±10,3	0,126
TG, mg/dL	117,2±71,6	112,0±50,0	0,804	133,3±56,1	118,8±49,8	0,411	110,6±76,1	108,5±49,7	0,538
ApoA1, mg/dL	136,6±31,5	137,8±23,2	0,796	124,1±15,3	118,6±15,7	0,318	141,3±34,8	147,4±30,5	0,395
ApoB, mg/dL	92,4±26,5	97,1±23,2	0,296	94,0±28,5	103,2±20,5	0,263	91,7±25,6	94,0±24,0	0,676

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. Resultados apresentados como média ± desvio-padrão de dados transformados em logaritmo (log₁₀) e comparados por teste-*t* de Student com exceção da glicose e leptina que foram comparadas por teste de Mann-Whitney. ApoA1: apolipoproteína A1; ApoB: apolipoproteína B; CA: circunferência abdominal; CT: colesterol total; HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; IMC: índice de massa corporal; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; RCQ: razão cintura-quadril; TG: triglicérides; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.

4.4 Análise de haplótipos

A análise dos dados utilizando-se o programa *Estimating Haplotype* (EH), disponível na página da Internet <http://linkage.rockefeller.edu>, confirmou a existência de associação (desequilíbrio de ligação) entre os alelos dos polimorfismos *LEP* G-2548A e *LEPR* Gln233Arg (A3468G) no grupo obeso ($\chi^2 = 14,457$; $p=0,006$) e no grupo não-obeso encontramos associação entre os polimorfismos *LEPR* Lys109Arg e Gln223Arg ($\chi^2 = 20,025$; $p<0,001$) (**Tabelas 22 e 23**).

Foram encontrados 9 haplótipos entre os polimorfismos *LEP* G-2548A e *LEPR* Gln223Arg e 9 haplótipos entre os polimorfismos *LEPR* Lys109Arg (A1960G) e Gln223Arg (3468G). A distribuição de haplotipos *LEP/LEPR* foi diferente entre obesos e não obesos ($\chi^2=17,214$; $p=0,016$) (**Tabela 22**). Também se observou diferença na distribuição de haplotipos *LEPR* Lys109Arg/Gln223Arg entre estes dois grupos ($\chi^2=26,029$; $p<0,001$).

Para comparar os dados antropométricos e de perfil bioquímico entre haplotipos *LEP* G-2548A e *LEPR* A3468G foram formados quatro grupos de haplótipos: GG/AA (-2548GG/3468AA); GG+GA/AG+AA (-2548GG/3468AG + -2548GA/3468AG + -2548GA/3468AA); GA+AA/AG+GG (-2548GA/3468GG + -2548AA/3468AG + -2548AA/3468GG) e outros (-2548GG/3468GG + -2548AA/3468AA).

Ao comparar os parâmetros antropométricos e bioquímicos entre os haplotipos *LEP/LEPR*, verificamos que os portadores de haplotipos GG/AA e GA+AA/AG/GG tiveram maiores valores de IMC que os portadores dos demais haplotipos ($p=0,001$) no grupo obeso (**Tabela 24**). No grupo de não obesos, observou-se que os portadores de haplotipos GG/AA e GG+GA/GG+AA tiveram os maiores valores de IMC ($p=0,023$) (**Tabela 25**).

Foram também constituídos quatro grupos de haplotipos *LEPR* Lys109Arg/Gln223Arg (A1960G/A3468G): AA/AA (1960AA/3468AA); AA+AG/AG+AA (1960AA/3468AG + 1960AG/3468AG + 1960AG/3468AA); AG+AA/AG+GG (1960AG/3468GG + 1960GG/3468AG + 1960GG/3468GG) e outros (1960AA/3468GG + 1960GG/3468AA).

No grupo obeso, os portadores de haplotipo *LEPR* 1960AA+AG/3468AG+AA tiveram o menor valor de ICM ($p<0,001$) CA ($p=0,002$) e glicemia ($p<0,001$) quando comparado com os respectivos valores nos portadores dos demais haplotipos (**Tabela 26**). No grupo de não-obesos, também não se observou diferença para as variáveis estudadas entre os portadores de diferentes haplotipos (**Tabela 27**).

Tabela 22. Associação de genótipos dos polimorfismos *LEP* G-2548A e *LEPR* Gln223Arg (A3468G) no grupo estudado

Haplotipos	Total		Obesos		Não-obesos	
	n	%	n	%	n	%
G-2458A/A3468G						
GG/AA	32	13,5	20	17,5	12	9,7
GG/AG	35	14,7	15	13,2	20	16,1
GG/GG	12	5,1	10	8,8	2	1,6
GA/AA	42	17,6	13	11,4	29	23,4
GA/AG	61	25,6	31	27,2	30	24,2
GA/GG	21	8,8	12	10,5	9	7,3
AA/AA	24	10,1	9	7,9	15	12,1
AA/AG	10	4,2	3	2,6	7	5,6
AA/GG	1	0,4	1	0,9	0	0

Desequilíbrio de ligação $\chi^2=14,457$; 4gl;p=0,006

Nota: Número de indivíduos em parênteses.

Tabela 23. Associação de genótipos dos polimorfismos *LEPR* Lys109Arg (A1960G) e Gln223Arg (A3468G) no grupo estudado

Haplotipos	Total		Obesos		Não-obesos	
A1960G/A3468G	n	%	n	%	n	%
AA/AA	42	17,7	17	14,9	25	20,2
AA/AG	32	13,4	13	11,4	7	5,6
AA/GG	24	10,1	7	6,2	2	1,6
AG/AA	20	8,4	20	17,5	12	9,7
AG/AG	66	27,7	31	27,1	35	28,2
AG/GG	20	8,4	13	11,4	4	3,2
GG/AA	9	3,8	5	4,4	19	15,4
GG/AG	17	7,2	5	4,4	15	12,0
GG/GG	8	3,3	3	2,7	5	4,1
Desequilíbrio de ligação	$\chi^2=20,025$; 4gl;p<0,001					

Nota: Número de indivíduos em parênteses.

Tabela 24. Relação entre os haplótipos *LEPG-2458A/LEPRGln223Arg* (A3468G) e parâmetros antropométricos e perfil bioquímico no grupo obeso

Variável	Haplótipos				P
	GG/AA (5)	GA+AA/AG+GG (33)	GG/AG+GG (45)	GG+AA/GG+AA (36)	
IMC (Kg/m ²)	35,2±4,5 ^a	32,8±2,6 ^a	35,2±3,0 ^b	33,2±3,6 ^b	<0,001
CA (cm)	107,5±14,5	98,3±18,3	102,2±9,1	104,0±8,4	0,063
RCQ	0,91±0,09	0,91±0,10	0,91±0,11	0,92±0,04	0,746
Leptina(ng/mL)	34,3±20,0	30,1±18,3	34,3±20,7	29,3±16,4	0,372
Glicose (mg/dL)	112,8±34,2	112,1±34,7	112,1±34,8	107,8±40,3	0,456
CT (mg/dL)	218,8±46,0	217,3±48,3	217,4±48,7	217,9±34,6	0,602
HDL-c (mg/dL)	49,3±11,9	45,9±11,7	46,0±9,4	50,9±9,1	0,949
LDL-c (mg/dL)	13409±39,0	129,1±37,6	124,0±40,0	132,9±24,0	0,560
VLDL-c (mg/dL)	32,7±12,1	32,8±12,5	33,0±14,8	33,1±14,1	0,857
TG (mg/dL)	168,6±68,0	176,7±80,0	188,6±92,9	164,4±46,1	0,866
ApoA1 (mg/dL)	134,2±25,3	124,4±26,0	135,4±31,0	144,0±12,0	0,340
ApoB (mg/dL)	115,2±27,3	112,4±27,5	113,8±27,8	124,2±17,0	0,313

Nota: Valores são apresentados como média ± DP. Variáveis transformadas em logaritmo (log₁₀) e comparadas por One-Way ANOVA e comparações múltiplas por teste de Tukey. Diferentes subscritos indicam diferenças significativas (p<0,05). ApoA1: apolipoproteína A1; ApoB: apolipoproteína B; CA: circunferência abdominal; CT: colesterol total; HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; IMC: índice de massa corporal; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; RCQ: razão cintura-quadril; TG: triglicérides; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.

Tabela 25. Relação entre os haplótipos *LEPG-2458A/LEPRGln223Arg* (A3468G) e parâmetros antropométricos e perfil bioquímico no grupo não-obeso

Variável	Haplótipos				P
	GG/AA (12)	GA+AA/AG+GG (21)	GG/AG+GG (19)	GG+AA/GG+AA (38)	
IMC (Kg/m ²)	23,8±3,1 ^a	20,1±5,9 ^b	20,4±5,4 ^b	23,7±3,5 ^a	0,023
CA (cm)	92,9±8,9	77,0±7,0	78,1,0±4,9	91,6±13,4	0,092
RCQ	0,90±0,06	0,81±0,06	0,91±0,11	0,88±0,11	0,122
Leptina(ng/mL)	12,0±11,7	9,3±8,2	14,1±11,0	12,2±11,6	0,257
Glicose (mg/dL)	92,0±9,3	87,5±6,6	90,0±7,0	91,3±11,8	0,183
CT (mg/dL)	199,9±39,9	189,9±29,5	189,0±36,0	198,6±42,0	0,936
HDL-c (mg/dL)	58,5±15,1	63,9±14,9	59,2±9,4	58,1±15,5	0,776
LDL-c (mg/dL)	119,3±34,3	106,1±23,8	120,1±40,0	115,6±37,1	0,958
VLDL-c (mg/dL)	27,8±11,1	24,2±8,7	25,0±12,5	27,1±11,1	0,896
TG (mg/dL)	114,4±61,3	94,5±32,2	98,2±33,3	114,0±61,0	0,448
ApoA1 (mg/dL)	137,1±30,5	149,7±34,7	135,4±31,0	136,2±31,7	0,650
ApoB (mg/dL)	94,8±25,0	83,9±20,7	90,3±27,8	94,3±25,5	0,948

Nota: Valores são apresentados como média ± DP. Variáveis transformadas em logaritmo (log₁₀) e comparadas por *One-Way ANOVA* e comparações múltiplas por teste de Tukey. Diferentes subscritos indicam diferenças significativas (p<0,05). ApoA1: apolipoproteína A1; ApoB: apolipoproteína B; CA: circunferência abdominal; CT: colesterol total; HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; IMC: índice de massa corporal; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; RCQ: razão cintura-quadril; TG: triglicérides; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.

Tabela 26. Relação entre os haplótipos *LEPR* Lys109Arg(A1960G)/Gln223Arg(A3468G) e parâmetros antropométricos e perfil bioquímico no grupo obeso

Variável	Haplótipos				P
	AA/AA (17)	AG+GG/AG+GG (36)	AG+GG/AA (30)	AA+AG/AG+AA (33)	
IMC (Kg/m ²)	35,2±4,5 ^a	35,6±5,3 ^a	35,0±5,4 ^a	34,9±5,4 ^b	<0,001
CA (cm)	126,5±9,5 ^b	118,2±31,4 ^a	118,3±31,3 ^a	106,8±17,2 ^c	0,002
RCQ	0,93±0,07	0,87±0,02	0,87±0,04	0,91±0,09	0,978
Leptina(ng/mL)	43,7±22,0	43,3±21,8	43,3±21,9	33,9±21,0	0,713
Glicose (mg/dL)	112,8±34,2 ^a	112,1±29,8 ^a	112,0±33,9 ^a	110,8±34,7 ^b	<0,001
CT (mg/dL)	218,8±46,0	217,3±48,3	217,4±48,4	217,3±49,0	0,054
HDL-c (mg/dL)	49,6±12,2	49,0±12,8	49,1±13,0	49,4±12,0	0,697
LDL-c (mg/dL)	132,0±28,4	130,5±38,3	130,6±38,4	134,0±39,0	0,405
VLDL-c (mg/dL)	33,2±12,3 ^a	30,9±10,8 ^b	33,0±12,5 ^a	30,5±9,7 ^b	0,007
TG (mg/dL)	168,5±68,0 ^a	167,0±68,8 ^b	168,0±68,0 ^a	167,8±68,0 ^b	0,004
ApoA1 (mg/dL)	137,8±28,3	136,8±29,9	136,9±30,1	136,8±30,0	0,839
ApoB (mg/dL)	112,6±26,8	111,9±27,7	112,0±28,0	111,9±21,0	0,314

Nota: Valores são apresentados como média ± DP. Variáveis transformadas em logaritmo (log₁₀) para os testes estatísticos e comparadas por One-Way ANOVA e comparações múltiplas por teste de Tukey. Diferentes subscritos indicam diferenças significativas (p<0,05). ApoA1: apolipoproteína A1; ApoB: apolipoproteína B; CA: circunferência abdominal; CT: colesterol total; HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; IMC: índice de massa corporal; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; RCQ: razão cintura-quadril; TG: triglicérides; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.

Tabela 27. Relação entre os haplótipos *LEPR* Lys109Arg(A1960G)/Gln223Arg(A3468G) e parâmetros antropométricos e perfil bioquímico no grupo não-obeso

Variável	Haplótipos				P
	AA/AA (25)	AG+GG/AG+GG (35)	AG+GG/AA (12)	AA+AG/AG+AA (7)	
IMC (Kg/m	20,0±5,6 ^a	20,4±5,2 ^a	19,0±4,1 ^b	19,2±4,4 ^b	<0,001
CA (cm)	76,0±6,8 ^a	77,7±7,3 ^b	76,3±9,0 ^a	77,1±8,0 ^b	<0,001
RCQ	0,86±0,06	0,86±0,09	0,86±0,10	0,92±0,04	0,115
Leptina(ng/mL)	11,8±11,9	12,4±12,0	12,4±12,1	9,9±6,6	0,258
Glicose (mg/dL)	87,7±6,9 ^a	86,8±6,0 ^a	86,9±4,9 ^a	85,8±3,3 ^b	<0,001
CT (mg/dL)	199,9±39,9	198,6±42,0	198,6±43	174,1±21,0	0,843
HDL-c (mg/dL)	58,5±15,1	58,1±15,5	58,2±15,6	65,6±10,7	0,360
LDL-c (mg/dL)	117,8±32,5	117,1±33,1	117,2±33,2	86,1±14,3	0,333
VLDL-c (mg/dL)	27,8±11,1	27,1±11,1	27,1±11,2	23,0±10,3	0,369
TG (mg/dL)	97,8±33,7	96,4±33,2	97,0±37,3	93,8±44,5	0,694
ApoA1 (mg/dL)	137,1±30,5	136,2±31,7	136,3±31,8	161,3±35,9	0,063
ApoB (mg/dL)	94,8±25,0	94,3±25,5	94,3±25,6	74,4±22,5	0,554

Nota: Valores são apresentados como média ± DP. Variáveis transformadas em logaritmo (log₁₀) para os testes estatísticos e comparadas por One-Way ANOVA e comparações múltiplas por teste de Tukey. Diferentes subscritos indicam diferenças significativas (p<0,05). ApoA1: apolipoproteína A1; ApoB: apolipoproteína B; CA: circunferência abdominal; CT: colesterol total; HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; IMC: índice de massa corporal; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; RCQ: razão cintura-quadril; TG: triglicérides; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.

Tabela 28. Relação entre os haplótipos *LEPR* Lys109Arg(A1960G)/Gln223Arg(A3468G) e parâmetros antropométricos e perfil bioquímico em mulheres não-obesas

Variável	Haplótipos				P
	AA/AA (25)	AG+GG/AG+GG (8)	AG+GG/AA (29)	AA+AG/AG+AA (19)	
IMC (Kg/m ²)	23,8±3,1 ^a	19,9±5,6 ^b	19,8±5,4 ^b	19,2±4,4 ^b	0,005
CA (cm)	92,9±8,9 ^a	74,4±7,0 ^b	76,5±8,0 ^b	75,3±8,3 ^b	0,018
RCQ	0,90±0,06	0,82±0,06	0,90±0,10	0,82±0,08	0,415
Leptina(ng/mL)	9,2±6,9 ^a	9,2±6,1 ^a	9,9±6,6 ^b	9,5±4,3 ^b	0,003
Glicose (mg/dL)	91,3±11,8 ^a	87,6±6,7 ^b	87,2±6,5 ^b	85,8±3,3 ^c	<0,001
CT (mg/dL)	198,6±42,0	198,6±42,1	199,9±40,0	174,1±21,0	0,682
HDL-c (mg/dL)	58,1±15,5	58,1±15,6	58,5±15,1	65,6±10,7	0,108
LDL-c (mg/dL)	115,6±37,1	115,9±37,1	119,3±34,3	86,1±14,3	0,416
VLDL-c (mg/dL)	27,8±11,1 ^a	23,4±8,4 ^b	23,1±8,0 ^b	25,8±11,1 ^b	0,003
TG (mg/dL)	110,1±36,6	96,1±33,0	93,8±61,3	100,9±39,7	0,077
ApoA1 (mg/dL)	136,2±31,7 ^a	151,9±33,6 ^b	155,6±34,0 ^b	168,7±37,5 ^b	0,030
ApoB (mg/dL)	94,3±25,5	94,4±25,5	94,8±25,0	74,4±22,5	0,954

Nota: Valores são apresentados como média ± DP. Variáveis transformadas em logaritmo (log₁₀) para os testes estatísticos e comparadas por One-Way ANOVA e comparações múltiplas por teste de Tukey. Diferentes subscritos indicam diferenças significativas (p<0,05). ApoA1: apolipoproteína A1; ApoB: apolipoproteína B; CA: circunferência abdominal; CT: colesterol total; HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; IMC: índice de massa corporal; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; RCQ: razão cintura-quadril; TG: triglicérides; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade

Tabela 29. Relação entre os haplótipos *LEPR* Lys109Arg(A1960G)/Gln223Arg (A3468G) e parâmetros antropométricos e perfil bioquímico em homens não-obesos

Variável	Haplotipos			P
	AA/AA (25)	AG+GG/AG+GG (8)	AG+GG/AA (29)	AA+AG/AG+AA (19)
IMC (Kg/m ²)	19,3±5,2 ^a	18,9±4,3 ^b	19,0±4,2 ^a	18,7±2,2 ^b
CA (cm)	75,6±8,0 ^b	76,3±9,0 ^a	76,6±8,7 ^a	75,0±6,9 ^b
RCQ	0,88±0,11	0,86±0,09	0,88±0,12	0,82±0,08
Leptina(ng/mL)	10,5±6,3 ^a	10,1±5,9 ^a	9,1±5,9 ^b	9,1±5,1 ^b
Glicose (mg/dL)	86,2±4,3 ^a	87,3±6,9 ^b	86,6±3,2 ^a	87,8±5,2 ^b
CT (mg/dL)	198,7±42,0	198,6±42,0	198,6±43	174,1±21,0
HDL-c (mg/dL)	58,5±15,5	58,1±15,6	58,2±16,0	65,6±10,7
LDL-c (mg/dL)	115,6±37,0	115,6±37,1	115,6±37,2	86,1±14,3
VLDL-c (mg/dL)	27,1±11,7	27,2±11,6	27,2±11,2	21,7±11,1
TG (mg/dL)	114,0±61,0	114,1±61,1	114,1±61,2	93,8±44,5
ApoA1 (mg/dL)	136,2±31,7	136,2±31,8	136,1±31,8	168,7±37,5
ApoB (mg/dL)	94,3±25,5	94,3±26,0	94,3±25,6	74,4±22,5

Nota: Valores são apresentados como média ± DP. Variáveis transformadas em logaritmo (log₁₀) para os testes estatísticos e comparadas por One-Way ANOVA e comparações múltiplas por teste de Tukey. Diferentes subscritos indicam diferenças significativas (p<0,05). ApoA1: apolipoproteína A1; ApoB: apolipoproteína B; CA: circunferência abdominal; CT: colesterol total; HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; IMC: índice de massa corporal; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; RCQ: razão cintura-quadril; TG: triglicérides; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade.

5. DISCUSSÃO

Neste estudo, a idade média dos indivíduos obesos foi maior dos que não-obesos. A associação entre a idade avançada e a obesidade já foi mencionada em um estudo realizado com americanos brancos, negros e mexicanos-americanos (FLEGAL *et al.*, 2002).

No nosso estudo o número de mulheres foi maior do que o número de homens em ambos os grupos seguindo uma tendência devido às mudanças hormonais principalmente após os 45 anos de idade (BALTHASAR, 2006).

A hipertensão também foi relacionada com a obesidade, possivelmente resultado da atividade do sistema nervoso simpático, devido ao aumento da leptina circulante (ROSMOND *et al.*, 2000). Estudos demonstram que a leptina pode modular a pressão sanguínea através de ações vasculares, renais e simpáticas (CORREIA; RAHMOUNI, 2006). O desenvolvimento da hipertensão tem sido correlacionado com o aumento de IMC e ganho de peso. Estudos também demonstram que o acúmulo de gordura visceral é o principal fator para o desenvolvimento da hipertensão em indivíduos obesos, sendo sua prevalência de 50 a 300% maior em obesos quando comparados com indivíduos normais (HALPERN, MANCINI, 2000; RAHMOUNI *et al.*, 2004; 2005). Um estudo recente realizado com mulheres brasileiras observou que 61,9% das mulheres hipertensas desenvolvem obesidade ou apresentam sobrepeso (FEITOSA *et al.*, 2007).

No nosso estudo, foi também observada associação da obesidade com hiperleptinemia, hiperglicemia e DAC. A obesidade está associada com o aumento do risco do desenvolvimento de resistência á insulina e DM2. Em indivíduos obesos o tecido adiposo aumenta a secreção de algumas

substâncias como: ácido graxos não-esterificado, glicerol, citocinas pró-inflamatórias e outros fatores que estão envolvidos com a resistência a insulina. Um estudo recente mostrou que na obesidade ocorre um defeito na liberação da insulina pelas células- β que por consequência leva falha na regulação da glicose sanguínea devido à perda da capacidade de supressão da produção de glicose hepática e na redução da eficiência de entrada de glicose nos tecidos insulino-resistentes (KAHN et al., 2006). A diminuição da oferta de glicose nos adipócitos acarreta diminuição da lipólise e aumento de ácidos graxos não-esterificados que resultam no desenvolvimento de diabetes tipo II (KAHN et al., 2006).

O mecanismo pelo qual a distribuição da adiposidade central leva à resistência à insulina já é bem conhecido. Depósitos viscerais de triglicérides possuem *turnover* mais acelerado que o de outras regiões, aumentando a oferta de ácidos graxos livres ao sistema porta, que estimulam a gliconeogênese e inibem a depuração hepática da insulina, contribuindo para elevar a glicemia, a insulinemia e a resistência insulínica (LERARIO et al., 2002). Na obesidade, as células do pâncreas tornam-se menos responsivas à estimulação da concentração elevada de glicose no sangue. Além disso, as células alvo do organismo, incluindo os músculos, sofrem frequentemente uma redução da quantidade dos receptores de insulina ou uma redução de sua ativação (SOUZA, 2004).

A hiperglicemia em indivíduos obesos pode estar associada com aumento de triglicérides no plasma. Estudos revelam que indivíduos obesos têm três vezes mais chances de apresentarem valores elevados de triglicérides quando comparados com indivíduos não-obesos (KAHN et al., 2006).

No nosso estudo, também observamos que os triglicérides e colesterol plasmáticos estavam aumentados nos indivíduos obesos, o que sugere que esses indivíduos possuem perfil lipídico de maior risco para DAC. Recorrente a obesidade central que é uma importante causa da dislipidemia secundária, representada pela hipertrigliceremia, redução do HDL-c e elevação do LDL-c o que pode favorecer na formação do processo aterogênico e consequentemente nas manifestações cardiovasculares (RODRIGUEZ, TRINDADE, 2006). Além disso, a hipertensão e a hiperglicemia também são fatores de risco para o desenvolvimento de DAC (SOWERS, 2003).

O papel da obesidade no desenvolvimento de doenças coronarianas ainda é bem controverso, mas acredita-se que esteja relacionado com o acúmulo de gordura na região abdominal ou central, mesmo na ausência de obesidade generalizada ou devido à presença do receptor de leptina no coração, sugerindo que a leptina também possa modular diretamente a função cardíaca (RAHMOUNI, HANYES; 2004).

O acúmulo de gordura abdominal tem sido descrito como o tipo de obesidade que oferece maior risco para saúde e está associado com o risco do indivíduo obeso futuramente desenvolver acidente vascular, infarto do miocárdio e morte prematura (PITANGA et al., 2005).

A hiperleptinemia também foi observada nos indivíduos obesos, sendo atribuído a alterações no receptor de leptina ou na deficiência em seu sistema de transporte na barreira hemato-encefálica, fenômeno denominado resistência à leptina sendo um fator de risco ainda maior para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e hipertensão (IHARA et al., 2006; ROMERO, ZANESCO; 2006).

Com relação ao polimorfismo *LEP* G-2548A, a frequência do alelo -2548G nos indivíduos obesos (64,1%) foi similar a de mulheres americanas obesas (65%) e em indivíduos franceses com sobrepeso (64%) (LI et al., 1999; MAMMÉS et al, 2000). Observamos que esse polimorfismo está associado com a obesidade em nossa população, como foi também observado em outros estudos em diferentes populações (LI et al., 1999; LE STUNFF et al., 2000; MAMMÉS et al., 2000; WANG et al., 2007).

Ao comparar as frequências alélicas do polimorfismo *LEP* G-2548A do gene em mulheres americanas, Li e colaboradores observaram maior frequência do genótipo -2548GG em mulheres com o valor de IMC superior a 40 kg/m² quando comparadas com as mulheres que apresentavam valores de IMC inferiores a 27 kg/m² (LI et al., 1999). No estudo de Mammés e colaboradores, foi encontrada frequência maior do genótipo GG nos indivíduos com o valor de IMC superior a 27 kg/m² quando comparada com a dos indivíduos com o valor de IMC inferior a 27 kg/m² (MAMMES et al.; 2000).

No presente estudo, não foi possível observar relação do polimorfismo *LEP* G-2548A com concentração de leptina, glicose ou perfil lipídico em obesos e não-obesos. Em outros estudos, foi evidenciado que esse polimorfismo está associado com aumento de leptina livre e de IMC em mulheres obesas (YIANNAKOURIS et al., 2003).

O gênero parece influenciar a relação entre o polimorfismo *LEP* G-2548A e o perfil lipídico. Observou-se, neste estudo, que a presença do alelo A está relacionada com maior concentração de apoA1 em mulheres obesas e de HDL-C e menor de triglicérides séricos em homens não-obesos.

Valores aumentados de apoA1 e o HDL-C são considerados fatores metabólicos de baixo risco de doença cardiovascular, enquanto que os triglicérides aumentados são indicadores de alto risco cardiovascular (LIMA *et al.*, 2004). Portanto, o polimorfismo *LEP* G-2548A parece estar relacionado com perfil lipídico de menor risco cardiovascular. Entretanto, estudos com amostragem maior são necessários para confirmar os resultados obtidos neste estudo.

Neste estudo, foram analisadas as frequências alélicas do polimorfismo *LEPR* Lys109Arg (A1960G) e foi observado que a frequência do alelo 1960A é maior em obesos (60,5%) que em não-obesos (48,0%). Este resultado é sugestivo de que esta variante está associada com obesidade em nossa população. Em outros estudos realizados com populações caucasianas foi observado que o alelo 1960G está associado com valores de IMC elevados (CHAGNON *et al.*, 2000; LIU *et al.*, 2004). Em coreanos também foi observada uma fraca associação deste polimorfismo com IMC (PARK *et al.*, 2006).

Neste estudo, SNP *LEPR* Lys109Arg foi relacionado com valores mais altos de glicemia independente do gênero e da presença de obesidade. Este resultado parece indicar que este polimorfismo está associado com a predisposição a DM2. Entretanto, Park e colaboradores, não encontraram relação deste polimorfismo com DM2 na população coreana (PARK *et al.*, 2006). Portanto, mais estudos se fazem necessários para confirmar os resultados deste trabalho.

Também observamos que o SNP Lys109Arg está associado com concentrações maiores de colesterol total, triglicérides e VLDL-C em mulheres obesas. Estes resultados são sugestivos que este polimorfismo pode contribuir

para a relação entre obesidade e doença cardiovascular em mulheres. Entretanto, Rosmond e colaboradores observaram que obesos portadores do genótipo homozigoto *LEPR* Arg109Arg (1960GG) tinham concentrações de HDL-C maiores que os portadores dos demais genótipos, na população suíça (ROSMOND *et al.*, 2001).

A apo B sérica foi o único marcador do perfil lipídico associado com este polimorfismo no grupo de não-obesos. Este achado não se reproduziu ao avaliar homens e mulheres separadamente. Este resultado precisa confirmado utilizando-se uma amostra maior, pois pode ter sido um fenômeno esporádico.

No grupo de não-obesos, verificou-se relação do polimorfismo *LEPR* Lys109Arg com maiores valores de IMC. Outros pesquisadores, encontraram uma fraca associação entre este polimorfismo e os valores de IMC em homens ingleses (GOTADA *et al.*, 1997) e em homens caucasianos (CHAGNON *et al.*, 2000).

A frequência maior do alelo 3468G do SNP *LEPR* Gln223Arg (A3468G) em obesos (58,4%) do que em não-obesos (31,9%) é indicativa de que este SNP está associado com obesidade na nossa população. Frequências similares foram observadas nas populações inglesas (56%) (GOTADA *et al.*, 1997) e grega (52%) (YIANNAKOURIS *et al.*, 2001).

A associação do SNP *LEPR* Gln223Arg com obesidade foi confirmada pelos valores mais altos de IMC, CA e leptina plasmática encontrados em obesos portadores do alelo 223Arg (3468G). No grupo de não-obesos também se observou relação deste polimorfismo com valores mais altos de IMC e CA. Na população grega, também foi observado que este polimorfismo está associado com obesidade e prediz uma pequena porcentagem de variação no

peso e na composição corporal (YIANNAKOURIS *et al.*, 2001). Em dois estudos realizados na população brasileira, um encontrou associação deste polimorfismo com obesidade (DUARTE *et al.*, 2006) enquanto o outro não encontrou esta relação (SANTOS, 2005).

O SNP *LEPR* Gln223Arg também foi relacionado com IMC aumentado em homens caucasianos (CHAGNON *et al.*, 2000) e em mulheres caucasianas em pós-menopausa da região do mediterrâneo (QUINTON *et al.*, 2001).

O gênero não influenciou nos resultados encontrados neste estudo, sugerindo que a relação entre o SNP *LEPR* Gln223Arg e características fenotípicas de obesidade é independente do gênero.

Notou-se também que o SNP *LEPR* Gln223Arg está relacionado com concentrações mais elevadas de glicose, LDL-C e menores de apoA-I em mulheres não-obesas. Este resultado é sugestivo de que este polimorfismo pode ter um papel na predisposição ao risco cardiovascular, mas ainda precisa ser melhor investigado, pois nas mulheres obesas, não foi encontrada relação deste polimorfismo com o perfil lipídico. Por outro lado, o genótipo *LEPR* Gln223Gln foi relacionado com maiores concentrações de triglicérides e menores de HDL-C em indivíduos obesos da população suíça (ROSMOND *et al.*, 2000).

Para o polimorfismo *LEPR* Lys656Asn, a frequência do alelo 9546C em obesos (32,9%) foi similar a de não-obesos (28,6%). Estas frequências foram similares às descritas por Gotoda e colaboradores em homens britânicos (38%) (GOTODA *et al.*, 1997).

Neste trabalho, não foi encontrada relação entre o polimorfismo Lys656Asn e os parâmetros antropométricos e a leptina plasmática,

diferentemente do que foi observado em mulheres obesas (YANNAKOURIS et al., 2001). Entretanto, observamos que os homens obesos portadores do genótipo 9546G tem maiores valores de IMC e CA. Este resultado indica que o SNP Lys656Asn está relacionado com característica fenotípica de obesidade, mas esta relação é dependente do gênero.

Embora, outro trabalho não tenha encontrado relação do SNP Lys656Asn e o perfil lipídico (ROSMOND et al., 2000), nós observamos que em mulheres obesas, o alelo comum deste polimorfismo foi relacionado com maior concentração de LDL-c.

As análises de desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos estudados revelaram forte associação entre os SNPs *LEP* G-2548A e *LEPR* Gln223Arg (A3468G) e entre os SNPs *LEPR* Lys109Arg (A1960G) e Gln223Arg (A3468G).

A associação entre os SNPs *LEPR* Lys109Arg/Gln223Arg foi observada anteriormente em outras populações (GOTODA et al., 1997; VAN ROSSUM et al., 2003).

O desequilíbrio de ligação entre os SNPs *LEP* G-2548A/*LEPR* Gln223Arg (A3468G) foi observado previamente em um estudo realizado com indivíduos da cidade do Rio de Janeiro (DUARTE et al., 2007).

Em nosso estudo, os haplótipos GG/AA e GA+AA/AG+GG foram associados com maiores valores de IMC em obesos. Em outro estudo realizado no Brasil, foi observado que o haplótipo *LEP/LEPR* G/G foi associado com 58% maior risco de obesidade ($p=0,032$) (DUARTE et al., 2007). Os autores sugeriram que esta interação entre os polimorfismos está associada com a regulação do peso corporal.

Neste estudo, os haplótipos *LEPR* foram relacionados com variações de IMC e CA. A associação entre estes haplótipos e o risco de obesidade foi observada em outras populações (GOTODA *et al.*, 1997; VAN ROSSUM *et al.*, 2003).

Demonstramos pela primeira vez que os haplótipos *LEPR* estão relacionados com variações nas concentrações plasmáticas de leptina e glicose de indivíduos não obesos. Também foi observado que estes haplótipos influenciam o perfil lipídico sérico em mulheres não obesas, o que pode representar um risco cardiovascular adicional em não-obesos. Entretanto, estes resultados precisam ser confirmados em grupos amostrais maiores.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados deste estudo é possível concluir que os polimorfismos *LEPR* Lys109Arg (A1960G) e Gln223Arg (A3468G) estão relacionados com a obesidade ou características fenotípicas de obesidade, como IMC, CA e leptina plasmática aumentados.

Os polimorfismos *LEPR* Lys109Arg (A1960G) e Gln223Arg (A3468G) estão associados com hiperglicemia de jejum elevada.

O perfil lipídico sérico também foi influenciado pelo polimorfismo *LEPR* Lys109Arg (A1960G), sugerindo que é um fator que predispõem ao risco de dislipidemia.

O gênero parece exercer influencia na relação entre os polimorfismos *LEPR* Lys109Arg (A1960G) e Gln223Arg (A3468G) e alterações do perfil bioquímico.

Os haplótipos dos genes da leptina e do receptor de leptina estão associados com diferenças no IMC, CA e alterações no perfil bioquímico e na concentração de leptina.

BIBLIOGRAFIA

AHIMA, R.S.; OSEI, S.Y. Leptin signaling. **Pyhsiol Behav**, v.81, n. 2, p. 233-241, 2004.

AHIMA, R.S. Central actions of adipocyte hormones. **Trends Endocrinol Metab**, n.16, v.7, p.307-13, 2005.

AHIMA, R.S; LAZAR, M.A. Adipokines and the Peripheral and Neural Control of Energy Balance. **Mol Endocrinol**, v. 22, n. 5, p.2-30, 2008.

ALLISON, D.B, HEO, M. Meta-analysis of linkage data under worst-case conditions: a demonstration using the human OB region. **Genetics**. v.2, n.148, p.859-6, 1998.

ARIYASU, H; TAKAYA , K; TAGAMI, T; OGAWA, Y; HOSODA, K; AKAMIZU, T; SUDA, M; KOH, T; NATSUI, K; TOYOOKA, S; SHIRAKAMI, G; USUI, T; SHIMATSU, A; DOI, K; HOSODA, H; KOJIMA, M; KANGAWA, K; NAKAO, K. plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. **J Clin Endocrinol Metab**; v.86, n.10, p.4753-8, 2001.

ARORA, S.A. Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity-A review. **Neuropeptides**, v.40, n.6, p.375-401, 2006.

Asia Pacific Cohort Studies Collaboration. The burden of overweight and obesity in the Asia-Pacific region. **Obes Rev**, v.8, n.3, p.191-6, 2007.

BAILE CA, DELLA-FERA MA, MARTIN RJ. Regulation of metabolism and body fat mass by leptin. **Annu Rev Nutr**, v.20, p.105-27, 2000.

BALTHASAR, N. Genetic dissection of neuronal pathways controlling energy homeostasis. **Obesity** , 2006 Aug;14 Suppl 5:222S-227S.

BARROSO, S.G; ABREU, V.G; FRANCISCETTI, E.A. The adipose tissue in the genesis of hypertension and atherosclerotic cardiovascular disease. An emerging concept. **Arq Bras Cardiol**, v.78, n.6, p.618-30, 2002.

BRAY, G.A. Coherent, preventive and management strategies for obesity. **Cida Found Symph**, v.201, n. 5, p.228-246, 1996.

BRAY, G.A. Obesity: The Disease. **J. Med. Chem**, v.49, n. 14, p.4001-4007, 2006.

CAIRES, N.F.R. **Sobrepeso e obesidade entre os funcionários da Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia**.2004.Tese (Mestrado em Saúde Coletiva)- Departamento de Saúde Pública- Universidade Estadual de Feira de Santana- Bahia.

CHAGNON, Y.C; WILMORE, J.H; BORECKI, I.B; GAGNON, J; PÉRUSSE, L; CHAGNON, M; COLLIER, G.R; LEON, A.S; SKINNER, J.S; RAO, D.C; BOUCHARD, C. Associations between the Leptin Receptor Gene and Adiposity in Middle-Aged Caucasian Males from the HERITAGE Family Study. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 1, n. 85, p. 29-34; 2000.

CHAVES, F.R; ROMALDINI, J.H. *Diabetes Mellitus* tipo II. **Revista Brasileira de Medicina**, v.59, edição especial, p.83-91, 2002.

CONSIDINE, R.V; SINHA, M.K; HEIMAN, M.L; KRIAUCIUNAS, A; STEPHENS, T.W; NYCE, M.R; OHANNESIAN, J.P; MARCO, C.C; MCKEE, L.J; BAUER, T.L. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. **N Engl J Med**, v. 334, n. 5, p.292-5, 1996.

CORREIA, M.L, RAHMOUNI, K. Role of leptin in the cardiovascular and endocrine complications of metabolic syndrome. **Diabetes Obes Metab.**, n.8,v. 6, p. 603-10, 2006.

COWLEY, M.A; JOBST, E.E; ENRIORI, P.J. The electrophysiology of feeding circuits. **Trends Endocrinol. Metab**, v.15, n.10, p.488-99, 2004.

CUMMINGS, D.E; SCHWARTZ, M.W. Genetics and Pathophysiology of Human Obesity. **Annu Rev Med**, v.54, n. 1, p.453-71, 2003.

DE SILVA, A.M; WALDER, K.R; BOYKO, E.J; WHITECROSS, K.F; NICHOLSON, G; KOTOWICZ, M; PASCO, J; COLLIER, G.R. Genetic variation and obesity in Australian women: a prospective study. **Obes Res**, n. 9, p. 733-40, 2000.

DUARTE, S.F; FRANCISCHETTI, E.A; GENELHU-ABREU, V; BARROSO, S.G; BRAGA, J.U; CABELLO, P.H; PIMENTEL, M.M. p.Q223R leptin receptor polymorphism associated with obesity in Brazilian multiethnic subjects. **Am J Hum Biol**. v.18, n.4, p.448-53, 2006.

DUARTE, S.F; FRANCISCETTI, E.A; GENELHU, V.A; CABELLO, P.H; PIMENTEL, M.M. LEPR p.Q223R, beta3-AR p.W64R and LEP c.-2548G>A gene variants in obese Brazilian subjects. **Genet Mol Res**, v. 5; n 4, p. 1035-43, 2007.

DUBERN, B. ; CLÉMENT, K. ; PELLOUX, V. ; FROGUEL, P ; GIRARDET, J.P ; GRAND, B.G ; TOUNIAN , P . Mutational analysis of melanocortin-4 receptor, agouti-related protein; and α -melanocyte-stimulating hormone genes in severely obese children. **J Pediatr**, n.139, v. 2, p. 204-209, 2001.

FAROOQI, I.S; RAHILLY, S.O. Monogenic Human Obesity Syndromes. **The Endocrine Society**, p.409-424, 2004.

FEITOSA, A.C; MANCINI, M.C; CERCATO, C; VILLARES, S.M; HALPERN A. Metabolic profile according to leptin levels in obese patients. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v.51, n1, p.59-64, 2004.

FLEGAL, K.M; CARROLL, M.D; OGDEN, C.L; JOHNSON, C.L. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2000. **JAMA**, v.288, n.14, p. 1723-7, 2002.

FERREIRA, V.R; MAGALHÃES, R. Obesidade no Brasil: tendências atuais. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v.24, n.2, p.71-81, 2006.

FRIED, S.K; RICCI, M.R; RUSSEL, C.D; LAFERRÉRE, B. Regulation of Leptin Production in Humans. **American Society for Nutritional Sciences**, p.3127-3130, 2000.

FRIEDEWALD, W.T.; LEVY, R.I.; FREDRICKSON, D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin. Chem.**, Washington/DC, EUA, v.18, n. 6, p. 499-502, 1972.

FRIEDMAN, J. M. The function of leptin in nutrition, weight, and physiology. **Nutr. Rev**; n.60, p. S1-S14, 2002.

FRIEDMAN, J.M. Modern science versus the stigma of obesity. **Nat Med**, v. 10, n.6, p.563-9, 2004.

FRUHBECK, G. Intracellular signaling pathways activated by leptin. **Biochem J**, p.393: 7-20, 2006.

GONG, D.W; BI, S; PRATLEY, R.E; WEINTKAUB, B.D. Genomic structure and promoter analysis of the human obese gene. **J.Biol Chem**, v.271, n. 8, p.3971-3974, 1996.

GOTODA, T ; MANNING, B.S GOLDSTONE, A.P ; IMRIE, H ; EVANS, A.L; STROSBURG, A.D ; Mc KEIGUE, P.M ; SCOTT, J ; AILTMAN, T.J. Leptin receptor gene variation and obesity: lack association in white British male population. **Hum Mol Genet.** v.6, n.6, p.869-876, 1997.

GREENBERG, A.S; OBIN, M.S. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. **Am J Clin Nutr**, v.83, n.2, p. 416-465, 2006.

GREENMAN, Y; GOLANI, N; GILAD, S; YARON, M; LIMOR, R; STERN, N. Ghrelin secretion is modulated in a nutrient- and gender-specific manner. **Clin Endocrinol.** v.60, n.3, p.382-8, 2004.

GORTMAKER S.L; MUST, A; PERRIN, J.M; SOBOL, A.M; DIETZ, W.H. Social and economic consequences of overweight in adolescence and young adulthood. **N Engl J Med**, v.329, n.14, p. 1008-12, 1993.

GUIZAR-MENDOZA JM, AMADOR-LICONA N, FLORES-MARTINEZ SE, LOPEZ-CARDONA MG, AHUATZIN-TREMERY R, SANCHEZ-CORONA J. Association analysis of the Gln223Arg polymorphism in the human leptin receptor gene, and traits related to obesity in Mexican adolescents. **J Hum Hypertens**, v.19, n.5, p. 341-6, 2005.

HALPERN, A; MANCINI, M.C. O tratamento da obesidade no paciente portador de hipertensão arterial. **Rev Bras Hipertens**, v.2, n. 5, p. 166-71, 2000.

HEGYI, K.; FÜLÖP, K.; KOVÁCS, K. TÓTH, S.; FAULUS, A. Leptin-induced signal transduction pathways. **Cell Biol Int**, v.28, n. 5, p.159-169, 2003.

HINUY, H.M. **Avaliação de regiões hipervariáveis de genes que predisõem á obesidade.** 2004. Tese (Mestrado em Análises Clínicas)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

HINUY, H.M; HIRATA, M.H; SAMPAIO, M.F; ARMAGANIJAN,D; SALAZAR, L.A; HIRATA, R.D. LEP 3'HVR is associated with obesity and leptin levels in Brazilian individuals. **Mol Genet Metab.** v.89, n.4, p.374-80, 2006.

HOFFSTEDT, J; ERIKSSON, P; MOTTAGUI-TABAR, S; ARNER, P. A polymorphism in the leptin promoter region (-2548 G/A) influences gene expression and adipose tissue secretion of leptin. **Horm Metab Res.** v.7, n.34, p.355, 2002.

HUBINA, E; GOTH, M; KORBONITS, M. Ghrelin- a hormone with multiple functions. **Orv.Hetil**, v.25, n.146, p.1345-1351, 2005.

IHARA, S; SHIMAMOTO, K; WATANABE, H; SAKAI, R; KAWANA, M. An alpha1-receptor blocker reduces plasma leptin levels in hypertensive patients with obesity and hyperleptinemia. **Hypertens Res**, v.29, n.10, p. 805-11, 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Excesso de peso atinge 38,8 milhões de brasileiros adultos. In: **Pesquisa de Orçamentos Familiares**, 2004.

INUI, A. Transgenic study of energy homeostasis equation: implications and confounding influences. **FASEB J**, v.14, n.14, p. 2158-70, 2000.

HOFFSTEDT, J; ERIKSSON, P; BORECKI, I; WILLIAMSON, S; DESTEFANO, A.L; XU, G ; LIU, J; ELLISON, R.C; PROVINCE, M; MYERS, R.H.. Common variants in the 5' region of the leptin gene are associated with body mass index in men from the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study. **Am J Hum Genet**. v.75, n. 12, p.220-30, 2004.

JÚNIOR, J.D; PEDROSA, R.G; TIRAPGUI, J. Aspectos atuais da regulação do peso corporal: ação da leptina no desequilíbrio energético. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, n.40, v. 3, 2004.

KANH, S.E; HULL, R.L; UTZSCHNEIDER, K.M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v. 444, n.14, 2006.

KARVONEN, M.K; PESONEN, U; HEINONEN. P; LAAKSO, M; RISSANEN, A; NAUKKARINEN, H; VALVE, R; UUSITUPA, M.J; KOULU, M. Identification of New Sequence Variants in the Leptin Gene. **J Clin Endocrinol Metab**. v.83, n.9, p.3239-3242, 1998.

LAVENS, D; PIESSEVAUX, J; TAVERNIER, J. Review: negative regulation of leptin receptor signaling. **Eur Cytokine Netw**, v.17, n.3, p.211-219, 2006.

LERARIO, D.D.G; GIMENO, S.G; FRANCO, L.J; LUNES, N; FERREIRA, S.R.G. Excesso de peso e gordura abdominal para a síndrome metabólica em nipo-brasileiros. **Revista de Saúde Pública**, v.36, n.1, p.4-11, 2002.

LE STUNFF, C; LE BIHAN, C; SCHORK, N.J; BOUGNERES, P. A common promoter variant of the leptin gene is associated with changes in the relationship between serum leptin and fat mass in obese girls. **Diabetes**. v.49, n.12, p.2196-200, 2000.

LÉVY, E. ; LÉVY, P. ; LePEN, C. ; BASDEVANT, A. The economic cost of obesity: the FRENCH situation. **Internacional Journal of obesity and Related Metabolic Disorders**, v.19, p. 788-792, 1995.

LIEBERMAN, G.S; RUBINFELD, H; GLICK, M; SCHOR, N.K; SHIMON, I. Melanin-concentrating hormone stimulates human growth hormone secretion: a novel effect of MCH on the hypothalamic- pituitary axis. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.290, p. E982-E988, 2006

LI, W.D; REED, D.R; LEE, J.H; XU, W; KILKER, R.L; SODAM, B.R; PRICE, R.A. Sequence variants in the 5' flanking region of the leptin gene are associated with obesity in women. **Ann Hum Genet**, v.63, n. 3, p.227-34, 1999.

LIMA, R.M. Obesidade: o mal do século. Perspectivas, Campo dos Goytacazes; v.4; n. 8; p. 86-99, 2005.

LIMA, S.C.V.C; ARRAIS, R.F; ALMEIDA, M.G; SOUZA, Z.M; PEDROSA, L.F.C. Perfil lipídico e peroxidação de lipídeos no plasma em crianças e adolescentes com sobrepeso e obesidade. **J Pediatr**, v. 80, n.5, p.23-8, 2004.

LIU, Y.J; ROCHA-SANCHEZ, S.M; LIU, P.Y; LONG, J.R; LU, Y; RECKER, R.R; DENG, H.W. Test of linkage and/or association of the LEPR gene polymorphisms with obesity phenotypes in Caucasian nuclear families. **Physiol Genomics**, v.17, n. 2, p. 101-106, 2004.

MAMMÈS, O.; AUBERT, R. ; BETOULLE, D. ; PÈAN, F.; HERBERT, B. ; VISVIKIS, S. ; SIEST, G. ; FUMERON, F. LEPR gene polymorphism: association with overweight, fat mass and response to diet in women. **Eur J Clin Invest**. v.31, n.5, p.398-404, 2001.

MAMMÈS, O.; BETOULLE, D.; AUBERT, R.; HERBETH, B.; SIEST, G.; FUMERON, F. Association of the G-2548A polymorphism in the 5' region of the *LEP* gene with overweight. **Ann Hum Genet**. v.64, n.5, p.391-394, 2000.

MANTZOROS, C. S. The role of Leptin in Humans obesity and Disease: A Review of Current Evidence. **American College of Physicians- American Society of Internal Medicine**, v.130, p.671-680, 1999.

MARQUES-LOPES, I; IVARTI, A; MORENO-ALIAGA, M.J; MARTINEZ, A. Aspectos genéticos da obesidade. **Rev Nutr**, v. 17, n.3, p. 327-337, 2004.

MATTEVI, V.S; ZEMBRUSKI, V.M; HUTZ, M.H. Association analysis of genes involved in the leptin-signaling pathways with obesity in Brazil. **Int J Relat Metab Disord**, v.26, n.9, p.1179-85, 2002.

MCGARVEY S.T; FORREST W; WEEKS D.E; SUN, G; SMELSER, D; TUFA, J; VIALI, S; DEKA, R. Human leptin locus (LEP) alleles and BMI in Samoans. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v.26, n. 6, p.783-788, 2002.

MEIER, U.; GRESSNER, A. M. Endocrine Regulation of Energy Metabolism: Review of Pathobiochemical and Clinical Chemical Aspects of Leptin, Ghrelin, Adiponectin, and Resistin. **Clinical Chemistry**. v.50, n.9, p.1511-1525, 2004.

MOFFET, S; MARTINSON, J; SHRIVER, M.D; DEKA, R; McGARVEY, S.T; BARRANTES, R; FERREL, R.E. Genetic diversity and evolution of the human leptin locus tetranucleotide repeat. **Hum Genet**, v. 110, p. 412-417, 2000.

MONTAGUE, C.T; FAROOQI, I.S; WHITEHEAD, J.P; SOOS, M.A; RAU, H; WAREHAM, N.J; SEWTER, C.P; DIGBY, J.E; MOHAMMED, S.N; HURTS, J.A; CHEETHAN, C.H; EARLEY, A.R; PRINS, J.B; O'RAHILLY, S. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. **Nature**, v. 387,n. 6636, p. 903-908, 1997.

MONTEIRO, C.A. Obesidade: diagnóstico, métodos e fundamentos. In: HALPERN, A.; MATOS, A.F.G.; SUPLCY, H.L.; MANCINI, M.C.; ZANELLA, M.T .**Obesidade**. São Paulo/SP, Brasil : Lemos Editorial, 1998, p. 31-54.

MONTEIRO, C.A.; MOURA, E.C. ; CONDE, W.L.; POPKIN, B.M. Socioeconomic status and obesity in adult populations of developing countries: a review. **Bulletin of the World Health Organization**, v.82, n.12, p. 940-946, 2004.

MONTEIRO, C.A.; CONDE, W.L.; POPKIN, B.M. Income-specific trends in obesity in Brazil: 1975-2003. **Am J Public Health**, v.97, n.10, p.1808-12, 2007.

MURPHY, K.G; DHILLO, W.S; BLOOM, S.R. Gut peptides in the regulation of food intake and energy homeostasis. **Endocr Rev**. v.27, n.7, p.719-27; 2006.

MUTCH, D.V; CLÉMENT, K. Unraveling the Genetic of Humans Obesity. **PLoS Genetics**, v. 2, p. 1956-1963, 2006.

NHLBI: National Heart, Lung and Blood Institute - Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation and Treatment of Overweight and Obesity in Adults, 80; 2000.

OGDEN, C.L; CARROL, M.D; CURTIN, L.R; McDOWELL, M.A; TABAK, C.J; FLEGAL, K.M. Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999-2004. **JAMA**; v. 295, n. 13, p. 1549-55, 2006.

OMS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. **World Health Organ Tech Rep Ser**, v. 894, p. 1-253, 2000.

PARK, K.S; SHIN, H.D; PARK, B.L; CHEONG, H.S; CHO, Y.M; LEE, J.Y; LEE, J.K; OH, B; KIMM, K. Polymorphism in the leptin receptor(LEPR)- putative association with obesity and TDM2. **J Hum Genet**, v. 51, n. 2, p. 85-91, 2006.

PERUSSE L, RANKINEN T, ZUBERI A, CHAGNON YC, WEISNAGEL SJ, ARGYROPOULOS G, WALTZ B, SNYDER EE, BOUCHARD C. The human obesity gene map: the 2004 update. **Obes Res**. v.13, n.3, p.381-490, 2005.

PITANGA, F.J; LESSA, I. Indicadores Antropométricos de Obesidade como Instrumento de Triagem para risco Coronariano Elevado em Adultos na Cidade de Salvador. **Arq Bras Cardiol**, v. 85, n. 1, p. 26-31, 2005.

PORTOLÉS, O ; SORLÍ, J.V ; FRANCÉS , F ; COLTELL , O ; GONZÁLEZ , J.I ; SÁIZ, C ; CORELLA, D . Effect of genetic variation in the leptin promoter and leptin receptor gene on obesity risk in a population – based case-control study in Spain. **Eur J Epidemiol**. v.21, n.8, p.605-612, 2006.

QUINTON, N.D; LEE, A.J; ROSS R.J; EASTELL, R; BLAKEMORE, A.I. A single nucleotide polymorphism (SNP) in the leptin receptor is associated with BMI, fat mass and leptin levels in postmenopausal Caucasian women. **J Hum Genet**, n. 108, v. 3, p. 233-6, 2001.

RAHMOUNI, K; CORREIA, M.L; HAYNES, W.G; MARK, A.L. Obesity-associated hypertension: new insights into mechanisms. **Hypertension**, v. 45, n. 1, p. 9-14, 2005.

RAHMOUNI, K; HAYNES, W.G. Endothelial effects of leptin: implications in health and diseases. **Curr Diab Rep**. v.5, n. 4, p. 260-6, 2004.

RANKINEN, T; ZUBERI, A; CHAGNON, Y.C; WEISNAGEL, S.J; ARGYROPOULOS, G; WALTZ, B; PERUSSE, L; BOUCHARD, C. The human obesity gene map: the 2005 update. **Obesity**. v.14, n.4, p.529-644, 2006.

RAU, H; REAVES, B.J; O' RAHILLY, S ; WHITEHEAD, J.P. Truncated human leptin (delta 133) associated with extreme obesity undergoes proteasomal degradation after defective intracellular transport. **Endocrinology**. v.140, p.1718-23, 1999.

RGUIBI, M; BELAHSEN, R. Prevalence of obesity in Morocco. **Obes Rev**, v.8, n.1, p.11-3, 2007.

RIBEIRO, S.M.L; SANTOS, Z.A; SILVA, R.J; LOUZADA, E; JUNIOR, J.D; TIRAPAGUI, J. Leptina : Aspectos sobre o Balanço energético, Exercício Físico e Amenorréia do esforço. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.51, n.1, p.11-24, 2007.

RIFAI, N.; KING, M.E. Immunoturbidimetric assays of apolipoproteins A, AI, AII, and B in serum. **Clin Chem**, Washington/DC, EUA, 32, 6: 957-961, 1986.

RODRIGUEZ, A.S.R; TRNDADE, E.B.S.M. Mecanismos neuroendócrinos no desenvolvimento da síndrome metabólica. **Rev Bras Nutri Clin**, v. 21, n. 4, p. 320-5, 2006.

RODRIGUEZ, M; BEAUVERGER, P; NAIME, I; RIQUE, H; OUVRY, C; SOUCHAUD, S; DROMAINT, S; NAGEL, N; SUPPLY, T; AUDINOT, V; BOUITN, J.A; GALIZZI, J.P. Cloning and molecular characterization of novel human melanin-concentrating hormone receptor MCH2. **Mol.Pharmacol**, v.60, n. 4, p.632-639, 2001.

ROESCHLAU, P; BERNT, E ; GRUBER, W. Enzymatic determination of total cholesterol in serum. **Z Klin Chem Klin Biochem**, Berlin, Alemanha, 12, 5:226; 1974.

ROMAN, D.L; La FUENTE, R.A; , SAGRADO, M.G; IZAOLA, O; VICENTE, R.C. Leptin Receptor Lys656Asn Polymorphism Is Associated with Decreased Leptin Response and Weight Loss Secondary to a Lifestyle Modification in Obese Patients. **Arc Med Res**, v.37, p.854-859, 2006.

ROMERO, C.E.M; ZANESCO, A. O papel dos hormônios leptina e grelina na gênese da obesidade. **Rev Nut**, v. 19, n. 1, p. 85-91, 2006.

ROSMOND, R. Association studies of genetic polymorphisms in central obesity: a critical review. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v.27, n.10, p. 1141-51, 2003.

ROSMOND, R; CHAGNON, M; BOUCHARD, C; BJÖRNTORP, P. A polymorphism in the regulatory region of the corticotropin-releasing hormone gene in relation to cortisol secretion, obesity, and gene-gene interaction. **Metabolism**, v. 50, n. 9, p. 1059-62, 2001.

ROSMOND, R; CHAGNON, Y.C; HOLM, G; CHAGNON, M; PÉRUSSE, L; LINDELL, K; CARLSSON, B; BOUCHARD, C; BJÖRNTORP, P. Hypertension in obesity and the leptin receptor gene locus. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 85, n. 9, p. 3126-31, 2000.

SAHU, A. A Hypothalamic Role in Energy Balance with Special Emphasis on Leptin. **Endocrinology**, v.24, n.6 , p.2-26, 2004.

SAHU, A. Leptin signaling in the hypothalamus : emphasis on energy homeostasis and leptin resistance. **Front Neuroendocrinol**, v.24, n.3, p.225-253, 2003.

SAKURAI, T. Role of orexin in regulation of energy homeostasis. **Curr.Med.Chem- Central nervous System Agents**, v.3, n.3, p.229-241, 2003.

SALAZAR, L.A.; HIRATA, M.H.; CAVALLI, S.A.; MACHADO, M.O.; HIRATA, R.D.C. Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. **Clinical Chemistry**, v.44, n.8, pt.1, p.1748-1750, 1998.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. Protocol 1. Agarose Gel Electrophoresis. *in* **Molecular Cloning: A laboratory manual**. 3rd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, 2001c, cap.5, p.5.4-5.13.

SÁNCHEZ, J.C. Papel Fisiológico de la Leptina. **Colomb Med**, v.36, p.50-59, 2005.

SANTOS, A.F.R. **O Polimorfismo Gln223Arg do gene do receptor da leptina e a sua associação com fatores de risco cardiovascular**. 2005.Tese. (Mestrado- Ciências da Saúde).- Faculdade de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Rio Grande Sul.

SARTORELL, D.S; FRANCO, J.F. Tendências do diabetes mellitus no Brasil: o papel da transição nutricional. **Cad. Saúde Pública**, 19 (Sup.1), p. S29-S36, 2003.

SCHWARTZ, G.J. Biology of Eating Behavior in Obesity, **Obes Res**, v. 12, p. 102-106, 2004.

SHIMIZU, H; INOUE, K; MORI, M. The leptin-dependent and -independent melanocortin signaling system:regulation of feeding and energy expenditure. **J Endocrinol**,v. 193, n.1, p.1–9, 2007.

SHINTANI, M ; IKEGAMI, H ; YAMATO, E ; KAWAGUCHI, Y ; FUJISAWA, T ; NAKAGAWA, Y ; VEDA, H ; MIKI, T ; OGIHARA, T. A novel microsatellite polymorphism in human OE gene: a highly polymorphism marker for linkage analysis. **Diabetologia**. v.39 n. 11, p.1398-1401, 1996.

SOUZA, D.P; SILVA, G.S; OLIVEIRA, A.M; SHINOHARA, N.K.S. Etiologia da obesidade em crianças e adolescentes. **Rev Bras Nutr Clin**, v.22, n.1, p.72-6, 2007.

SOUZA, J.C. **Correlações entre diabetes tipo II e obesidade**. 2004. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso)- Faculdade de Ciências Biológicas, Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos, São João da Boa Vista, São Paulo.

SOWERS, J.R. Obesity as a cardiovascular risk factor. **Am J Med**, v.8, n. 115. p. 37-41, 2003.

SPEAKMAN, J.R. Obesity: The Integrated Roles of Environment and Genetics. **American Society for Nutritional Sciences**, p. 2091-2105, 2004.

STEFAN, N; VOZAROVA, B; DEL PARIGI, A; OSSOWSKI, V; THOMPSON, D.B; HANSON, R.L; RAVUSSIN, E; TATARANNI, P.A. The Gln223Arg polymorphism of the leptin receptor in Pima Indians: influence on energy expenditure, physical activity and lipid metabolism. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v.26, n.12, p.1629-32, 2002.

STROBEL, A; ISSAD, T; CAMOIN, L; OZATA, M ; STROSBERG, A.D . A leptin missense mutation associated with hipgonadism and morbid obesity. **Nat Genet**, v.18, n. 3, p.213-225, 1998.

SUGIUCHI, H.; UJI, Y.; OKABE, H.; IRIE, T.; UEKAMA, K.; KAYAHARA, N.; MIYAUCHI, K. Direct Measurement of High-Density Lipoprotein Cholesterol in Serum with Polyethylene Glycol-Modified Enzymes and Sulfated/Cyclo-dextrin. **Clin Chem**, Washington/DC, EUA, v. 41, n. 5, p. 717–723, 1995.

TARDIO, A.P; FALCÃO, M.C. O impacto da modernização na transcrição nutricional e obesidade. **Rev Bras Nutr Clin**, v.21, n.2, p.117-24, 2006.

TARTAGLIA, L. A. The Leptin Receptor. **J Biol Chem**. v.272, n.10, p.6093-6096, 1997.

THOMPSON, D.B ; RAVUSSIN, E ; BENNETT, P.H ; BOGARDUS, C. Structure and sequence variation at the human leptin receptor gene in lean and obese Pima Indians. **Hum Mol Genet**. v.6, n.5 , p.675-679, 1997.

VAN DER MERWE, M.T; PEPPER, M.S. Obesity in South Africa. **Obes Rev**, v. 7, n. 4, p. 315-22, 2006.

VAN ROSSUM, C.T; HOEBEE, B; VAN BAAK, M.A; MARS, M; SARIS, W.H; SEIDELL, J.C. Genetic variation in the leptin receptor gene, leptin, and weight gain in young Dutch adults. **Obes Res**, v.11, n. 3, p. 377-86, 2003.

WAHLEFELD, A.W.; BERGMAYER, H.U. (eds.) **Methods of Enzymatic Analysis**. 2nd English ed. New York, NY: Academic Press Inc, 1974, p1831.

WAJCHENBERG, B.L. Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue: Their Relation to the Metabolic Syndrome. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. 6, p. 697-738, 2000.

WANG J, THORNTON JC, KOLESNIK S, PIERSON RN JR. Anthropometry in body composition. An overview. **Ann N Y Acad Sci**, v. 904, p. 317-326, 2000.

WANG, T.N; HUANG, M.C; CHANG, W.T; KO, A.M; TSAI, E.M; LIU, C.S; LEE, C.H; KO, Y.C. G-2548A polymorphism of the leptin gene is correlated with extreme obesity in Taiwanese aborigines. **Obesity. Silver Spring**. v.14, n.2, p.183-7, 2006 .

WANG, Y; BEYDOUN, M.A. The Obesity Epidemic in the United States-- Gender, Age, Socioeconomic, Racial/Ethnic, and Geographic Characteristics: A Systematic Review and Meta-Regression Analysis. **Epidemiol Rev**, v. 29, p. 6-28, 2007.

WANTERS, M.; MENTEUS, I. ; RANKINEN, T. ; CHAGNON, M. ; BOUCHARD, C. ; VAN GAAL, L. Leptin Receptor Gene Polymorphisms Are Associated with Insulin in Obese Women with Impaired Glucose Tolerance. **J Clin Endocrinol Metab**, v.86, n.7, p.4434-4439, 2001.

WHO: World Health Organization – Obesity- European Region **World Health Organization** , Istanbul, 2006.

WHO: World Health Organization – Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. Technical reports series: 894. **World Health Organization**, Singapore, 2000.

WYNNE, K; STANLEY, S; McGOWAN, B; BLOOM, S. Appetite control. **Journal of Endocrinology**, v.18 n. 2, p.291-318, 2005.

YIANNAKOURIS, N; MELISTAS, L; YANNAKOULIA, M; MUNGAL, K; MANTZOROS, C.S. The-2548G/A polymorphism in the human leptin gene promoter region is associated with plasma free leptin levels; interaction with adiposity and gender in healthy subjects. **Hormones**, v.2,n.4, p.229-36, 2003.

YIANNAKOURIS N, YANNAKOULIA M, MELISTAS L, CHAN JL, KLIMIS-ZACAS D, MANTZOROS CS. The Q223R polymorphism of the leptin receptor gene is significantly associated with obesity and predicts a small percentage of body weight and body composition variability. **J Clin Endocrinol Metab**, v.86, n.9, p.4434-9, 2001.

ZHANG, Y; SCARPACE, P.J. The role of leptin resistance and obesity. **Physiol Behav**. v.88, n. 3, p.249-256; 2006.

APENDICES

APÊNDICE A- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: "Estudo da variante da leptina e do receptor de leptina : impacto sobre as características relacionadas com a obesidade"

Dados de identificação do voluntário da pesquisa

Nome do voluntário: _____
Documento de identidade Nº: _____ Sexo: M F
Data de nascimento: ____/____/____
Endereço: _____ no. _____ apto: _____
Bairro: _____ Cidade: _____
CEP: _____ Telefone: _____

Prezado Paciente,

Meu nome é Rosario D.C. Hirata, sou professora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP) e estou convidando você para participar do projeto de pesquisa que estou desenvolvendo com a equipe de médicos da Divisão de Clínica Médica que estão fazendo seu atendimento no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU/USP). A pesquisa está sendo realizada em colaboração com pesquisadores da Divisão de Enfermagem, da Divisão de Nutrição e do Serviço de Laboratório Clínico HU/USP e da FCF/USP.

Nesta pesquisa, vamos medir lipídeos (gordura), glicose, hormônios e outros parâmetros no sangue. Também vamos medir a sua altura e peso, além da sua composição corporal (gordura corporal), antes e depois que você fizer uma dieta para ajudar na perda de peso. Faremos também testes genéticos (DNA) para estudar a relação das características genéticas com a sua resposta a dieta.

Se aceitar participar desta pesquisa, vamos colher uma amostra de sangue (10 mL) em jejum para os exames de lipídeos (triglicerídeos e colesterol e suas frações); apolipoproteínas A1 e B (proteínas relacionadas com os lipídeos); glicose, hemoglobina glicada e insulina (para avaliar a diabetes);

leptina e o receptor solúvel de leptina, adiponectina (para avaliar a relação com a diabetes). Também será coletada amostra de sangue (10 mL cada) para os testes de DNA. Nesse material, serão estudados polimorfismos (alterações no DNA) de vários genes (informações do DNA) que estão relacionados com a obesidade e a diabetes. A sua amostra de DNA será guardada no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico (LBMAD) da FCF/USP, sob minha responsabilidade, e poderá ser utilizada para pesquisas futuras relacionadas com obesidade e diabetes. Se isso ocorrer, você será consultado a respeito.

Além de você, outros noventa e nove pacientes também participarão da pesquisa. Precisaréi, ainda, que você responda algumas perguntas sobre sua condição médica, doenças existentes nos seus familiares, medicamentos que está tomando e outras informações relacionadas com o estudo. Também precisaremos informação sobre a sua alimentação diária que será relacionada com os outros parâmetros que estamos estudando.

O risco a sua saúde será mínimo e não depende da coleta de sangue que poderá formar uma mancha roxa (hematoma) no local da picada da agulha.

Os dados e os resultados obtidos durante a pesquisa serão confidenciais e somente serão revelados a terceiros se você autorizar previamente. Sua identidade será mantida em segredo, quando os resultados deste estudo forem publicados em artigos de revistas científicas ou forem apresentados em temas de aulas e debates.

Você e seu médico terão acesso aos resultados dos exames de laboratório necessários, sem qualquer custo. Caso você se interesse, também terá acesso aos resultados dos testes genéticos no final da pesquisa que vai durar três anos. Suas informações serão mantidas em sigilo e somente serão disponibilizadas com seu consentimento.

Sua participação neste estudo é voluntária. Você pode desistir de participar da pesquisa a qualquer momento do estudo, sem penalidade ou perda dos benefícios a que você tem direito e seu tratamento médico no HU/USP não será afetado. Caso você desista de participar da pesquisa, poderá solicitar a retirada de seus dados genéticos do banco de dados do LBMAD da FCF/USP, onde serão guardados.

Por quaisquer motivos adequados, independentes de seu consentimento, os membros da equipe de pesquisa podem encerrar sua participação no estudo. O motivo lhe será explicado e poderá ser devido ao fato de você não ter cumprido as orientações dadas ou pelo cancelamento da pesquisa por falta de recurso financeiro, por falta de voluntários para a pesquisa ou por outro tipo de problema. A pesquisa também será encerrada se houver algum risco adicional para você que não foi previsto.

Caso tenha alguma dúvida em relação a esta pesquisa, você poderá entrar em contato comigo ou com a pesquisadora Raquel de Oliveira nos telefones 3091-3660 e 3091-3634. Também poderá contatar o Dr. Egidio L. Dorea da Divisão de Clínica Médica do HU/USP (tel.: 3039-9433 e 3039-9275), ou o Comitê de Ética do HU/USP (Av. Prof. Lineu Prestes, 2565, Cidade Universitária, CEP: 05508-900, São Paulo, SP - Telefones: 3039-9457 ou 3039-9479 - E-mail: cep@hu.usp.br) a qualquer hora do dia.

Eu, _____ declaro que, após bem esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, aceito, voluntariamente, em participar desta Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de 200__.

--

Assinatura do voluntário da pesquisa

Assinatura do pesquisador

(carimbo ou nome legível)

Assinatura da Testemunha

APÊNDICE A – Ficha para coleta de dados individuais do paciente

Nome: _____		Paciente n.º _____
Data do convite: ____/____/____		Registro n.º _____
Data de nascimento: ____/____/____		
Sexo: ☐ Masculino ☐ Feminino	Menopausa: ☐ Pré ☐ Pós	
Etnia: ☐ Branca ☐ Parda ☐ Negra ☐ Amarela		
Hábito de fumar: ☐ Nunca fumou ☐ Parou de fumar ☐ Há quanto tempo? _____ ☐ Fuma n.º de cigarros/dia _____		
Consome bebida alcoólica? ☐ Sim ☐ Não ☐ Até 7 doses/sem. ☐ Mais de 7 doses/sem.		
Possui algum tipo de doença? ☐ Sim ☐ Não Qual(is)? _____		
☐ Diabetes Mellitus		
Já teve infarto? ☐ Sim ☐ Não Há quanto tempo? _____		
É hipertenso? ☐ Sim ☐ Não Medida de Pressão arterial: _____ (mmHg)		
É obeso? ☐ Sim ☐ Não Peso (Kg) _____ Altura (cm) _____ IMC: _____		
Toma medicamentos? ☐ Sim ☐ Não Qual(is)? Em que dosagem? _____		
Profissão: _____ Há exigência de esforço físico? ☐ Sim ☐ Não		
Pratica exercício físico? ☐ Sim ☐ Não		
Parentes obesos ?		
Doenças relacionadas com obesidade secundária:		
HISTÓRICO FAMILIAR		
Possui algum parente (pai, mãe ou irmão) com:		
☐ Diabete Mellitus ☐ Obesidade ☐ Hipertensão		
☐ Doenças cardiovasculares Quem? _____		
☐ Hipercolesterolemia Quem? _____		
☐ Não tem ☐ Não sabe		
DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS		
Data:	Data:	Data:
GLI	Peso:	Pressão arterial diastólica:
CT	Altura:	Pressão arterial sistólica:
TG	IMC:	
HDL-C	Cintura:	
LDL-C	Quadril	
VLDL-C	Bioimpedância	

CT: colesterol total/ GLI: glicemia/ TG: triglicerídeos

ANEXOS

ANEXO A

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 18 de março de 2005.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP

ANEXO B – Cópia da aprovação pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)

São Paulo, 04 de abril de 2006.

Ilustríssimo Senhor
 Prof. Dr. William Saad Hosane
 Coordenador do CONEP
 Conselho Nacional de Saúde
 Ministério da Saúde – Brasília – DF

Digníssimo Coordenador do CONEP

Encaminhamos documentos relativo ao protocolo de pesquisa intitulado "Estudo das Variantes de Leptina e do Receptor de Leptina: Impacto sobre as Características Relacionadas com a Obesidade", figurando como pesquisadora principal Rosário Domínguez Crespo Hirata, a ser desenvolvido no Instituto "Dante Pazzanese" de Cardiologia, devidamente registrado, analisado e aprovado junto ao Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto "Dante Pazzanese" de Cardiologia.

Face ao exposto solicitamos seus préstimos para análise, parecer e eventual endosso pelo CONEP.

Informamos outrossim, que o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto "Dante Pazzanese" de Cardiologia está devidamente registrado nesta CONEP. Agradecemos a atenção dispensada e colocamo-nos à disposição para quaisquer esclarecimentos.

 Pedro Silvio Farsley
 Coordenador CEP
 CRM 55073

ANEXO C – Cópia da aprovação pelo CEP-HU/USP

São Paulo, 21 de julho de 2006.

Ilustrar Sr(a)

Profa. Dra. Rosário Dominguez Crespo Hirata

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas - Bloco 17

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Referente: Projeto de Pesquisa "Estudo das variantes de *Leptina* e do receptor de *Leptina*: impacto sobre as características relacionadas com a obesidade" - Co-autores: *Marjo Hiroyuki Hirata, Raquel de Oliveira, Márcia Martins Silveira Bernik, Egidio Lima Donca, Marcelo Ferraz Sampaio.* Registro CEP: 652/06 - Área temática especial: Grupo II - Genética Humana

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em reunião realizada no dia 21 de julho de 2006, analisou o projeto de pesquisa acima citado, considerando-o como **APROVADO**, bem como, seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Informamos que o projeto estará sendo encaminhado à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Ministério da Saúde (CONEP/MS), para acompanhamento.

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios semestrais (e relatório final ao término do trabalho), de acordo com a Resolução do Conselho Nacional de Saúde 251/97, item V.1.e. O primeiro relatório está previsto para 21 de fevereiro de 2007.

Atenciosamente,

Dr. Mauricio Seckler
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital Universitário da USP

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA USP
Av. Prof. Lineu Prestes, 2865 - Cidade Universitária - CEP: 05508-900 - São Paulo - SP
Tele: (011) 3039-9457 ou 9479 - Fax: (11) 3039-9452 - E-mail: cep@hospusp.br

ANEXO D – Cópia da aprovação pelo CEP-HU/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº 47/2006

São Paulo, 25 de abril de 2006

Ilmo(a). Sr(a).
Prof. Dr. Rosário Domínguez Crespo Hirala
FBC

Prezado(a) Senhor(a)

Vimos informar que em face da delegação atribuída pelo Inciso VI.5 da Resolução 340 de 9/7/04 o Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 24 de abril de 2006, **APROVOU** o projeto "Estudo das variantes de leptina e do receptor de leptina, impacto sobre as características relacionadas com a obesidade" (Protocolo CEP nº 369) apresentado por vossa senhoria e, conforme o mesmo dispositivo encaminhamos a CONEP a Folha de Rosto e o Parecer Consubstanciado.

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF/USP/07.

Atenciosamente,

Prof.ª Dra. Valentina Porta
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa da FCF/USP