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

Polimorfismos dos genes CD40, ICAM-1, VCAM, E-selectina,
LIGHT, RAGE e CX3CR1 relacionados com inflamação e sua
associação à obesidade

AÉCIO ASSUNÇÃO BRAGA

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:

Prof. Tit. Mario Hiroyuki Hirata

São Paulo

2014

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

Polimorfismos dos genes CD40, ICAM-1, VCAM, E-selectina,
LIGHT, RAGE e CX3CR1 relacionados com inflamação e sua
associação à obesidade

AÉCIO ASSUNÇÃO BRAGA

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Tit. Mario Hiroyuki Hirata

São Paulo

2014

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

B813p	<p data-bbox="343 1146 1350 1187">Braga, Aécio Assunção</p> <p data-bbox="343 1187 1350 1332">Polimorfismos dos genes CD40, ICAM-1, VCAM, E-selectina, LIGHT, RAGE e CX3CR1 relacionados com inflamação e sua associação à obesidade / Aécio Assunção Braga. -- São Paulo, 2014.</p> <p data-bbox="343 1332 1350 1377">106p.</p> <p data-bbox="343 1400 1350 1512">Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.</p> <p data-bbox="343 1512 1350 1556">Orientador: Hirata, Mario Hiroyuki</p> <p data-bbox="343 1612 1350 1736">1. Inflamação : Medicina 2. DNA : Polimorfismo genético 3. Obesidade 4. Expressão gênica I. T. II. Hirata, Mario Hiroyuki, orientador.</p> <p data-bbox="981 1758 1350 1798">616.0473 CDD</p>
-------	---

Aécio Assunção Braga

Polimorfismos dos genes CD40, ICAM-1, VCAM, E-selectina,
LIGHT, RAGE e CX3CR1 relacionados com inflamação e sua
associação à obesidade

Comissão Julgadora

da

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Tit. Mario Hiroyuki Hirata

Orientador/Presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais:

José Antonio Fortes Braga e Rosania Maranhão Assunção Braga

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Tit. Mario Hiroyuki Hirata, por seus ensinamentos, por suas colocações, paciência, puxões de orelha, conselhos, preocupações e confiança.

A Prof^a. Tit. Rosário Dominguez Crespo Hirata, pelo incentivo, apoio e sugestões no desenvolvimento deste trabalho e demais atividades acadêmicas.

Cristina Moreno Fajardo, mais que técnica do laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico da FCF/USP, sempre muito prestativa e paciente com todos os alunos do laboratório.

Jéssica Cassilla dos Santos e Juliana de Freitas Germano que são amigas que fiz em São Paulo e no trabalho, que ajudou tanto no desenvolvimento dessa pesquisa na parte técnica e teórica, mas também com sua compreensão e paciência.

Ao grande amigo Miguel Elias Farah Filho que apesar de morar na minha cidade natal, até hoje mantém esse companheirismo de um amigo.

Ao amigo e Prof. Raimundo Antonio Gomes Oliveira por ter plantado essa semente da pesquisa na minha pessoa e hoje estou conseguindo realizar meu primeiro sonho de muitos que tenho nesse ramo.

A amiga e Prof^a. Elvira Maria Guerra Shinohara pelos conselhos, carinho e ajuda com suas palavras de apoio.

A minha namorada Maylla Rodrigues Lucena e sua família por estar sempre ao meu lado nos momentos difíceis e sempre incentivando para eu nunca desistir dos meus objetivos.

Aos meus irmãos Silvana Jozie e José Antonio Filho pela sua compreensão e companheirismo.

Aos alunos do LABMAD como: Juliana de Freitas Germano, Vivian Bonezi, Tamiris Invencioni Moraes, Marcela C. Sousa, Alvaro Cerda Maureira,

Gisele Medeiros Bastos, Juliana Gonçalves dos Santos, Gabriela Guimarães Sousa Leite, Joás Lucas da Silva, Raquel de Oliveira e Débora Cavichioli.

Aos colegas de trabalho e amigos do LIMC como: Matheus Costa Almeida, Jéssica Cassilla dos Santos, Paula Helena Lima, Hui Tzu Lin Wang, Adriana R. Garófalo, Elisa Ruriko e Thiago Dominguez Crespo Hirata.

As amigas Paula Helena Lima, Hui Tzu Lin Wang, Fabiana, Joice Takinami e Patricia Salgado pelo apoio, dedicação, conselhos e ajuda.

A Maria de Jesus e Raimundo que foram pessoas que conviveram desde criança e ajudaram na minha criação.

Ao Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, em nome de sua diretora, Dra. Amanda G. M. R. Souza, pelo acesso ao hospital e confiança.

Aos médicos e colaboradores do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, Dr. André Arpad Faludi, Dr. Marcelo Chiara Bertolami, Dr. Marcelo Sampaio, Dra. Adriana Bertolami e Cristiane Kovacs pela sua dedicação na seleção de pacientes e cuidados a eles prestados.

Aos indivíduos que concordaram que concordaram em participar deste estudo o meu muito obrigado!!! Sem vocês este trabalho não poderia ser realizado.

Aos meus pais José Antonio e Rosania por estarem sempre ao meu lado, sempre incentivando a não desistir dos meus sonhos e ajudar os meus sonhos se tornarem realidades.

A deus por me proteger, dar saúde e força, para trabalhar e lutar por mais essa conquista e por colocar no meu caminho pessoas que me ajudaram a crescer pessoalmente e profissionalmente.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela bolsa concedida.

Há todos muito obrigado!!!!!!!

Resumo

Braga, A. A. **Polimorfismos dos genes CD40, ICAM-1, VCAM, E-selectina, LIGHT, RAGE e CX3CR1 relacionados com inflamação e sua associação à obesidade.** 2014. 106 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

INTRODUÇÃO: A obesidade é um grave problema de saúde pública, sendo definida como o acúmulo excessivo de gordura, possivelmente decorrente do desequilíbrio, por um longo período, entre a quantidade de energia ingerida e o gasto energético.

OBJETIVO: Investigar a contribuição dos polimorfismos dos genes *CD40*, *ICAM-1*, *VCAM*, *E-selectina*, *LIGHT*, *RAGE* e *CX3CR1* na associação com a obesidade.

CASUÍSTICA E MÉTODOS: O estudo foi realizado no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC) e no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU/USP), com 199 indivíduos (40 com peso normal, 55 com sobrepeso e 104 obesos) brasileiros, sem vínculo genético, de etnias branca, parda, negra e amarela, de ambos os sexos (55 homens e 144 mulheres), com idade entre 30 e 68 anos. Foi realizado o estudo dos polimorfismos dos genes *CD40* (rs1883832) C>T, *CX3CR1* (rs3732379) C>T, *CX3CR1* (rs3732378) G>A, *E-selectina* (rs5368) C>T, *ICAM-1* (rs1799969) G>A, *ICAM-1* (rs281432) C>G, *LIGHT* (rs344560) G>A, *LIGHT* (rs2291668) C>T, *RAGE* (rs2070600) G>A, *RAGE* (rs2236493) C>T e *VCAM* (rs3176878) C>T, por pirosequenciamento, a análise da expressão dos genes *LIGHT*, *CX3CR1*, *RAGE* e *ICAM-1*, pela PCR em tempo real, e as dosagens das formas solúveis de *PAI-1*, *IL-6*, *TNF- α* , resistina, adiponectina e leptina, utilizando o sistema LUMINEX.

RESULTADOS: As frequências alélica e genotípica dos polimorfismos estudados *CD40* (rs1883832) C>T, *CX3CR1* (rs3732379) C>T, *CX3CR1* (rs3732378) G>A, *E-selectina* (rs5368) C>T, *ICAM-1* (rs1799969) G>A, *ICAM-1* (rs281432) C>G, *LIGHT* (rs344560) G>A, *LIGHT* (rs2291668) C>T, *RAGE* (rs2070600) G>A, *RAGE* (rs2236493) C>T e *VCAM* (rs3176878) C>T não apresentaram associação significativa com a obesidade. Foi encontrada associação na análise da expressão do *CX3CR1* com a obesidade e também foi encontrada associação do polimorfismo *ICAM-1* (rs281432) G>C com a expressão do gene *RAGE* em indivíduos com peso normal.

CONCLUSÕES: Não houve associação dos polimorfismos *CD40* (rs1883832) C>T, *CX3CR1* (rs3732379) C>T, *CX3CR1* (rs3732378) G>A, *E-selectina* (rs5368) C>T, *ICAM-1* (rs1799969) G>A, *ICAM-1* (rs281432) C>G, *LIGHT* (rs344560) G>A, *LIGHT* (rs2291668) C>T, *RAGE* (rs2070600) G>A, *RAGE* (rs2236493) C>T e *VCAM* (rs3176878) C>T com a obesidade, mas houve associação da expressão do gene *CX3CR1* com a obesidade. Houve, também, associação do polimorfismo *ICAM-1* (rs281432) G>C com a expressão do gene *RAGE* em indivíduos de peso normal.

Palavras-chave: polimorfismos, obesidade, expressão gênica, citocinas, inflamação.

Abstract

Braga, A. A. **Polymorphisms of CD40, ICAM-1, VCAM, E-selectin, LIGHT, RAGE and CX3CR1 polymorphisms genes related to inflammation and its association with obesity.** 2014. 106 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Background: Obesity is a serious health problem and it is defined as an excessive fat accumulation which is caused by an imbalance between the amount of energy intake and energy expenditure over a long period. **Objective:** The main objective of this study was to investigate the contribution of CD40, ICAM-1, VCAM, E-selectin, LIGHT, RAGE e CX3CR1 gene polymorphisms and its association with obesity. **Material and Methods:** The study was realized at Dante Pazzanese Institute of Cardiology and University Hospital of São Paulo University. There were included 199 individuals (40 normal weight, 55 overweight and 104 obese), all Brazilian, with no genetic link, from all ethnics in both genders (55 men and 144 women), aged between 30 and 68 years. The study of *CD40* (rs1883832) C>T, *CX3CR1* (rs3732379) C>T, *CX3CR1* (rs3732378) G>A, *E-selectin* (rs5368) C>T, *ICAM-1* (rs1799969) G>A, *ICAM-1* (rs281432) C>G, *LIGHT* (rs344560) G>A, *LIGHT* (rs2291668) C>T, *RAGE* (rs2070600) G>A, *RAGE* (rs2236493) C>T and *VCAM* (rs3176878) C>T were conducted by pyrosequencing. The analysis of *LIGHT*, *CX3CR1*, *RAGE* and *ICAM-1* gene expression were performed by real-time PCR and the measurements of PAI-1, IL-6, TNF- α , resistin, leptin and adiponectin soluble forms using LUMINEX system. **Results:** The allele and genotype frequency of *CD40* (rs1883832) C>T, *CX3CR1* (rs3732379) C>T, *CX3CR1* (rs3732378) G>A, *E-selectin* (rs5368) C>T, *ICAM-1* (rs1799969) G>A, *ICAM-1* (rs281432) C>G, *LIGHT* (rs344560) G>A, *LIGHT* (rs2291668) C>T, *RAGE* (rs2070600) G>A, *RAGE* (rs2236493) C>T and *VCAM* (rs3176878) C>T gene polymorphisms showed no significant association with obesity. There was found association in the analysis of *CX3CR1* expression with obesity and it was found association of *ICAM-1* gene polymorphism (rs281432) G>C with *RAGE* gene expression in the normal weight group.

Conclusion: There was no association of *CD40* (rs1883832) C>T, *CX3CR1* (rs3732379) C>T, *CX3CR1* (rs3732378) G>A, *E-selectin* (rs5368) C>T, *ICAM-1* (rs1799969) G>A, *ICAM-1* (rs281432) C>G, *LIGHT* (rs344560) G>A, *LIGHT* (rs2291668) C>T, *RAGE* (rs2070600) G>A, *RAGE* (rs2236493) C>T and *VCAM* (rs3176878) C>T gene polymorphisms with obesity. However, it was found association of *CX3CR1* gene expression with obesity and an association of *ICAM-1* (rs281432) G>C gene polymorphism with *RAGE* gene expression in normal weight individuals.

Key Words: polymorphisms, obesity, gene expression, cytokines, inflammation.

LISTA DE TABELAS

PÁGINA

Tabela 1 – Classificação de peso pelo IMC _____	36
Tabela 2 – Associação da circunferência abdominal e risco de complicações metabólicas associadas com obesidade _____	37
Tabela 3 – Condições de amplificação pela PCR para os polimorfismos dos genes CD40, CX3CR1, E-SELECTINA, ICAM-1, LIGHT, RAGE e VCAM _____	43
Tabela 4 – Valores de inclinação da curva e eficiência dos ensaios de RT-PCR em tempo real _____	49
Tabela 5 – Características sociodemográficas da população estudada _____	51
Tabela 6 – Dados do perfil bioquímico e antropométrico de indivíduos classificados como peso normal, sobrepeso e obeso _____	53
Tabela 7 – Frequências dos polimorfismos CD40, CX3CR1, E-selectina, ICAM-1, LIGHT, RAGE e VCAM em indivíduos classificados como peso normal, sobrepeso e obesos _____	54
Tabela 8 – Análise utilizando modelos de regressão logística univariada para a variável dependente ter obesidade, de acordo com a distribuição dos genótipos de SNPs investigados como variável independente _____	57
Tabela 9 – Análise de Regressão Logística multinomial (modelo enter) para as variáveis dependentes “peso normal” (modelo 1) e “sobrepeso” (modelo 2) em relação aos polimorfismo _____	59
Tabela 10 – Expressão relativa dos genes LIGHT, CX3CR1, RAGE e ICAM-1 em células do sangue periférico dos indivíduos com peso normal, com sobrepeso e obesos _____	60
Tabela 11 – Análise por Regressão Logística univariada para as variáveis dependentes “sobrepeso” (modelo 1) e “obeso” (modelo 2) em relação à expressão gênica _____	62
Tabela 12 – Regressão logística multinomial (modelo enter) para as variáveis dependentes “peso normal” (modelo 1) e “sobrepeso” (modelo 2) em relação à expressão gênica _____	63
Tabela 13 – Análise de associação entre o polimorfismo ICAM-1 (rs281432) G>C, expressão dos genes LIGHT, CX3CR1, RAGE e ICAM-1 em indivíduos classificados como peso normal, sobrepeso e obesos _____	64

LISTA DE FIGURAS

PÁGINA

Figura 1 – Circuito de retroalimentação entre a concentração sérica de leptina e a regulação do estímulo para a ingestão de alimentos e do gasto energético. A – Mostra que, quando a ingestão de alimentos excede o gasto energético, a concentração de leptina aumenta, levando à diminuição da síntese de NPY e AgRP e ao aumento de POMC e CART no núcleo arqueado (hipotálamo), cuja consequência é a diminuição da ingestão de alimentos e o aumento do gasto de energia, a fim de reduzir o balanço energético positivo e, assim, manter o peso estável. B – Ilustra situação oposta à anterior, quando a ingestão de energia não consegue suprir a necessidade do gasto de energia, o que implica em aumento do estímulo para a ingestão de alimentos e redução do gasto energético. Nota-se que as consequências fisiológicas ilustradas no quadro B são muito maiores que as da situação A, ou seja, as repercussões no organismo, quando o balanço energético está negativo, não são apenas o inverso que no quadro A, mas, também, implicam estímulos muito mais intensos. Abreviaturas: NPY – neuropeptídeo Y; AgRP – proteína relacionada a agouti; POMC – pró-opiomelanocortina; CART – transcrito regulado por cocaína e anfetamina. Adaptado de Donato Júnior, Pedrosa e Tirapegui (2004) _____

25

Figura 2 – Anormalidades dos adipócitos na obesidade e papel pró-aterogênico da adiposidade. O ganho de peso progressivo leva à hipertrofia dos adipócitos e ao estado pró-inflamatório, com aumento da ativação dos macrófagos, secreção de quimiocinas e citocinas e dano endotelial. RE – retículo endoplasmático; IKK – I κ B quinase; IL – interleucina; JNK – c-Jun N-terminal quinase; MCP – proteína de quimioatração de monócitos; SAA – amiloide sérica; TLR – receptor toll-like; TNF – fator de necrose tumoral. Adaptado de Sanz, Moreno e Fuster (2008) _____

28

Figura 3 – Demonstração da relação dos genes, doenças e biomarcadores utilizando o IPA _____

40

Figura 4 – Fotografia do gel de agarose a 1% do produto da PCR com gradiente de temperatura de hibridização (TH) dos genes LIGHT e ICAM-1. M: marcador de tamanho molecular de DNA de 100 pares de bases (pb). 1: produto da PCR com TH do LIGHT de 60°C. 2: produto da PCR com TH do LIGHT de 62°C. 3: produto da PCR com TH do LIGHT de 64°C. 4: produto da PCR com TH do ICAM-1 de 60°C. 5: produto da PCR com TH do ICAM-1 de 62°C. 6: produto da PCR com TH do ICAM-1 de 64°C _____

42

Figura 5 – Fundamento de método do pirosequenciamento, segundo manual do equipamento Q24 da QIAGEN (www.qiagen.com) _____

45

Figura 6 – Representação gráfica por dispersão da expressão relativa do mRNA dos genes LIGHT, CX3CR1, RAGE e ICAM-1 em células do sangue periférico dos grupos peso normal, sobrepeso e obeso. NOTA: Variáveis contínuas foram comparadas utilizando o teste de Kruskal-Wallis para os 3 grupos _____

61

Figura 7 – Representação gráfica da diferença de expressão do mRNA dos genes LIGHT, CX3CR1, RAGE e ICAM-1, tendo como referência a expressão gênica do grupo peso normal _____

62

Figura 8 – Representação gráfica das associações dos polimorfismos com a expressão dos genes LGALS2, NFKB, ICAM1, LTA, LIGHT, VCAM1 e MMP9 e nos indivíduos dos grupos peso normal, sobrepeso e obeso _____

65

LISTA DE QUADROS

PÁGINA

Quadro 1 – <i>Iniciadores utilizados na reação de pirosequenciamento</i> _____	41
Quadro 2 – <i>Número de catálogo dos ensaios utilizados (iniciadores + sondas)</i> _____	47

ABREVIATURAS

aa – Aminoácidos

AFIP – Associação Fundo de Incentivo à Pesquisa

AGEs – Produto de Glicação Avançada

AgRP – Proteína Relacionada a Agouti

ALT – Alanina Aminotransferase

AMA – Associação Médica Americana

Apo A – Apolipoproteína A

Apo B – Apolipoproteína B

APS – Substratos Adenosina 5-fosfosulfato

ARC – Núcleo Arqueado

AST – Aspartato Aminotransferase

ATP – Adenosina Trifosfato

B2M – Beta 2-microglobulina

CA – Circunferência Abdominal

CART – Transcrito Relacionado à Cocaína e Anfetamina

cDNA – Ácido Desoxirribonucleico complementar

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CHNS – *China Health and Nutrition Survey*

Ct – *Cycle Threshold*

CX3CL1 – Fractalcina

CX3CR1 – Receptor da Fractalcina

DAC – Doença Arterial Coronariana

DCV – Doença Cardiovascular

DM2 – Diabetes Mellito Tipo 2

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

dNTP – Deoxirribonucleotídeo Trifosfato

dNTP α S – Deoxiadenosina alfa tio trifosfato

DP – Desvio Padrão

EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético

EHW – Equilíbrio de Hardy-Weinberg

FAM – Frequência do Alelo Menor

FCF – Faculdade de Ciências Farmacêuticas

GAPDH – Gliceraldeído 3-fosfato Desidrogenase

gl – Grau de Liberdade

HDL – Lipoproteína de Alta Densidade

HMBS – Hidroximetilbilane Sintase

HOMA-IR – Modelo de Avaliação da Homeostase – Insulina Resistente

HOMA- β – Modelo de Avaliação da Homeostase – células β

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

HPRT1 – Hipoxantina Fosforobosiltransferase 1

HU – Hospital Universitário

HVEM – Receptor do Fator de Necrose Tumoral 14

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICAM – Molécula de Adesão Intercelular

IDPC – Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia

IGF-1 – Fator 1 de Crescimento Insulina-símile

IKK β – IkappaB Quinase

IL – Interleucina

IL-1 β – Interleucina 1 β

IL-6 – Interleucina 6

IMC – Índice de Massa Corporal

IPA – *Ingenuity Pathway Analysis*

JNK – c-Jun N-terminal Quinase

KNHANES – *Korea National Health and Nutrition Examination Surveys*

LDL – Lipoproteína de Baixa Densidade

LEP – Leptina

LEPR – Receptor da Leptina

LIGHT – Fator de Necrose Tumoral 14

LIMC – Laboratório de Investigação Molecular em Cardiologia

MCP – Proteína de Quimioatração de Monócitos

MCP-1 – Proteína Quimiotática de Monócitos-1

MESA – Estudo Multiétnico da Aterosclerose

MMPs – Metaloproteinases

mRNA – Ácido Ribonucleico mensageiro

NCBI – Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia

NCHS – *National Center for Health Statistical*

NHANES – *National Health and Nutrition Examination Statistics*

NPY – Neuropeptídeo Y

OMS – Organização Mundial da Saúde

OR – Odds Ratio

PAI-1 – Inibidor do Ativador do Plasminogênio -1

pb – Pares de Base

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PCRus – Proteína C Reativa Ultrassensível

POF – Pesquisa de Orçamento Familiar

POMC – Pro-opiomelanocortina

PPi – Pirofosfato

RAGE – Receptor do Produto de Glicação Avançada

RCQ – Relação Cintura/Quadril

RE – Retículo Endoplasmático

RNA – Ácido Ribonucleico

RT-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

RT-qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real Quantitativo

SAA – Amiloide Sérica

SCA – Síndrome Coronária Aguda

SDHA – Complexo da Succinato Desidrogenase, Subunidade A, Flavoproteína

sICAM-1 – Molécula de Adesão Intercelular Solúvel

SNPs – Polimorfismos de um Único Nucleotídeo

SuRFNCD – Vigilância de Fatores de Risco de Doenças Não-Transmissíveis

T₄ livre – Fração Livre da Tiroxina

TG – Triglicérides

TH – Temperatura de Hibridização

TLR – Receptor toll-like

T_m – Temperatura de Melting

TNF – Fator de Necrose Tumoral

TNFSF14 – Fator de Necrose Tumoral 14

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral- α

TSH – Hormônio Tiroestimulante

UBC – Ubiquitina C

USP – Universidade de São Paulo

UTR – Região Não Traduzida

UV – Ultravioleta

VCAM1 – Molécula de Adesão do Sistema Vascular

VLDL – Lipoproteína de Muito Baixa Densidade

X² – Qhi-quadrado

SUMÁRIO

PÁGINA

1. INTRODUÇÃO	20
1.1 Etiologia e epidemiologia da obesidade	20
1.2 Fisiopatologia da obesidade	23
1.3 Alterações genéticas que podem estar associadas à obesidade	29
1.3.1 Gene CD40	30
1.3.2 Genes ICAM-1, VCAM e E-selectina	31
1.3.3 Gene LIGHT ou TNFSF14	32
1.3.4 Gene RAGE	33
1.3.5 Gene CX3CR1	33
2. OBJETIVOS	34
2.1 Objetivo Principal	34
2.2 Objetivos Secundários	34
3. MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Casuística	35
3.2 Critérios de exclusão	35
3.3 Material biológico	36
3.4 Métodos	36
3.4.1 Determinação das medidas antropométricas	36
3.4.2 Determinação dos parâmetros bioquímicos	38
3.5 Determinação dos genótipos	39
3.5.1 Seleção dos SNPs	39
3.5.2 Extração do DNA genômico	40
3.5.3 Análise dos polimorfismos genéticos	40
3.6 Determinação da expressão gênica	46
3.6.1 Extração do RNA total	46
3.6.2 Análise da expressão do mRNA pela RT seguida da PCR em tempo real	46
3.7 Análise das citocinas	49
3.7.1 Dosagem das proteínas séricas no soro	49
3.8 Análise estatística dos dados	50
4. RESULTADOS	51
4.1 Características da população estudada	51
4.2 Frequências alélica e genotípica dos polimorfismos	53

4.2.1	Análise utilizando o modelo de regressão logística univariada para as variáveis dependentes “ter peso normal” e “ter obesidade”	57
4.2.2	Análise utilizando o modelo de regressão logística multinomial para as variáveis dependentes “ter peso normal” e “ter sobrepeso corporal”	58
4.3	Análise da expressão gênica	60
4.3.1	Análise utilizando o modelo de regressão logística univariada para as variáveis dependentes “ter sobrepeso corporal” e “ter obesidade”	62
4.3.2	Análise utilizando o modelo de regressão logística multinomial para as variáveis dependentes “ter peso normal” e “ter sobrepeso corporal”	63
4.3.3	Efeito dos polimorfismos na expressão gênica	64
5.	DISCUSSÃO	66
5.1	Fatores biodemográficos e análise laboratorial	66
5.2	Polimorfismos e expressão gênica	71
6.	LIMITAÇÕES DO ESTUDO	75
7.	CONCLUSÕES	76
	BIBLIOGRAFIA	77
	APÊNDICES	93
	ANEXOS	98

1. INTRODUÇÃO

1.1 Etiologia e epidemiologia da obesidade

A obesidade é um grave problema de saúde, sendo definida como o acúmulo excessivo de gordura, que, potencialmente, é decorrente do desequilíbrio entre a quantidade de energia ingerida e o gasto energético, por um longo período (Constantin *et al.*, 2010). Obesidade é caracterizada como uma doença multifatorial, ou seja, resultado de uma complexa interação entre fatores comportamentais, culturais, genéticos, fisiológicos e psicológicos (Romero e Zanesco, 2006).

O aumento da prevalência da obesidade representa grande ameaça para a saúde pública no mundo, por causa das comorbidades (diabetes melito tipo 2, doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer), as quais elevam as despesas e os gastos com a manutenção da saúde dos pacientes (James, 2008; Farooqi, 2011). A distribuição e o acúmulo de gordura corporal podem ser medidos por vários parâmetros, entre eles, o índice de massa corporal (IMC), a circunferência abdominal e a relação cintura/quadril (RCQ) (Flaso, 1998).

O IMC é relação entre a medida de massa corporal total, em quilogramas, dividida pelo quadrado da medida da altura, em metros. O IMC é o parâmetro mais utilizado nos estudos de obesidade (Pi-Sunyer *et al.*, 1998; WHO, 2000), por ser, dentre todas as formas de medida da gordura corporal, o de mais fácil aplicação e execução, representando um parâmetro aceitável para avaliação e acompanhamento de alterações da massa corporal (Pi-Sunyer *et al.*, 1998).

A classificação de variações de massa do *National Center for Health Statistical* (NCHS) empregava os valores de IMC superiores a $27,3\text{kg/m}^2$, para mulheres, e $27,8\text{kg/m}^2$, para homens, admitindo-se o sobrepeso como a obesidade em menor grau, para classificar indivíduos obesos (Monteiro, 1998). Atualmente, a Organização Mundial de Saúde (OMS) adota os valores de IMC entre 25,0 e $29,9\text{kg/m}^2$, para indicar sobrepeso, e acima de $30,0\text{kg/m}^2$, para indivíduos considerados obesos (WHO, 2000).

Segundo dados da OMS, em 2008, 1,4 bilhão de adultos estavam acima do peso, sendo que aproximadamente 200 milhões de homens e 300 milhões de mulheres estavam obesos ($\text{IMC} \geq 30\text{kg/m}^2$). Além disso, cerca de 40 milhões de

crianças menores de cinco anos apresentavam estar acima do peso (Consultation e WHO, 2012).

Nos Estados Unidos, em estudo realizado pelo *National Health and Nutrition Examination Statistics* (NHANES), foi constatado que mais de um terço (34,9%) da população adulta do país é obesa, sendo que afeta 56,6% das mulheres e 37,1% dos homens (Ogden *et al.*, 2014). Esse estudo também revelou que a prevalência da obesidade foi maior entre os negros não hispânicos (47,8%) e hispânicos (42,5%) (Ogden *et al.*, 2014).

Um estudo realizado na população adulta, no continente europeu, mostrou que houve aumento de indivíduos obesos. Nos homens, a prevalência da obesidade, entre 1990 e 2008, passou de 4,0% para 28,3% e, nas mulheres, de 6,2% para 36,5%. Esse aumento foi mais significativo acima de 25,0% e foi encontrado na Itália e na Espanha, em ambos os sexos, enquanto que em Portugal, na República Tcheca e na Albânia, ocorreu, principalmente, nas mulheres. Os países do leste europeu e os mediterrâneos mostram maior prevalência de obesidade quando comparados aos países do oeste e do norte europeu (Berghoefer *et al.*, 2008).

Pesquisas nacionais realizadas em dois grandes países asiáticos, como Coreia (*Korea National Health and Nutrition Examination Surveys* – KNHANES) e China (*China Health and Nutrition Survey* – CHNS), mostraram que a obesidade pode estar afetando cerca 32,0% e 21,1%, respectivamente, da população desses países. Além disso, houve aumento de casos em ambos os países: tanto na Coreia como na China, o número de obesos quase dobrou nos últimos 10 anos (Du *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2014).

No continente africano, a obesidade também está presente. Observou-se que a prevalência de sobrepeso é maior nas áreas urbanas do que nas rurais e está correlacionada positivamente com a idade e o nível educacional. Estudo realizado na África do Sul mostrou que obesidade e sobrepeso ocorriam em todos os grupos étnicos da população adulta (Van Der Merwe e Pepper, 2006).

No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, o levantamento feito em 2011, sobre a prevalência da população com sobrepeso e obesidade, revelou que 48,5% da população brasileira encontravam-se com excesso de peso e 15,8% apresentavam-se no estado de obesidade (VIGITEL, 2012). A Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF), realizada pelo IBGE no período de 2008 a 2009,

mostrou que o excesso de peso afetava 50,1% dos homens e 48% das mulheres, sendo que, desses grupos, a obesidade atingiu 12,4% dos homens e 16,9% das mulheres adultas na população brasileira (IBGE, 2011).

Em um estudo realizado no nordeste e no sudeste do Brasil, concluiu-se que a prevalência conjunta de sobrepeso e obesidade na população adulta é maior no sexo feminino, atingindo mais da metade das mulheres dessas regiões, com idade entre 40 e 79 anos (Abrantes, Lamounier e Colosimo, 2003).

O excesso de gordura, principalmente abdominal, é responsável pelo desenvolvimento de diabetes, tolerância diminuída à glicose e outras doenças crônicas. O ganho de peso na vida adulta (na faixa de 5% do peso) também está relacionado com a ocorrência de hipertensão, dislipidemia e hiperinsulinemia (Sartorelli e Franco, 2003). Dados indicam que a obesidade é mais associada à morbidade do que tabagismo, alcoolismo e pobreza (Lavie, Milani e Ventura, 2009).

Nesse sentido, o diabetes melito tipo 2 (DM2) é uma das comorbidades mais associada à obesidade e estima-se que sua prevalência aumente de 2,8% para mais de 4,4% até 2030 (Steemburgo, De Azevedo e Alfredo Martinez, 2009). Diversos estudos já relataram que o excesso de peso é um fator de risco estabelecido para DM2 (Pinkney, 2002; Daousi *et al.*, 2006; Gregg *et al.*, 2007).

O mecanismo que explica a relação entre obesidade e DM2 ampara-se no fato de os adipócitos de indivíduos obesos apresentarem perfil de secreção e função endócrina alterados, resultando no aumento da liberação de adipocinas e moléculas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6) (Sell, Dietze-Schroeder e Eckel, 2006), fazendo com que haja disfunção nas células- β , causando uma falha na liberação da insulina e aumento nas concentrações sanguíneas de glicose (Kahn, Hull e Utzschneider, 2006). Essa disfunção das células β representa uma possível ligação entre obesidade e DM2 (Eckel *et al.*, 2011).

O desequilíbrio entre a ingestão e o gasto de energia, além de estar relacionado com obesidade, também pode ser responsável pelo aparecimento da hipertensão, sendo estas duas doenças componentes importantes na síndrome metabólica (incluindo DM2 e dislipidemia) e tendo papel determinante para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV) (Kang, 2013).

Em pesquisa realizada nos Estados Unidos pelo MESA (*Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis*), constatou-se que o estado de obesidade e inflamação

está fortemente associado ao risco de hipertensão (Lakoski *et al.*, 2011). Essa associação entre obesidade e hipertensão ocorre por 3 motivos: disfunção do tecido adiposo, ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona e disfunção endotelial (Rahmouni *et al.*, 2005).

No estudo *Fels Longitudinal Study*, 414 voluntários foram examinados, a partir dos 18 anos de idade, por, no mínimo, 2 vezes durante o estudo, tendo 4 anos como menor intervalo entre os exames. Observou-se que indivíduos com sobrepeso apresentaram aumento na pressão arterial e nas concentrações de lipídios e lipoproteínas, que foi associado a alto risco de DCV (Siervogel *et al.*, 2000).

A dislipidemia é outra comorbidade relacionada à obesidade, causando aumento no risco de DCV. O indivíduo dislipidêmico, que é comumente associado à obesidade, caracteriza-se por ter concentrações séricas aumentadas de triglicérides (TG), por ter diminuição da lipoproteína de alta densidade (HDL) e por ter mudança nas lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (Franssen *et al.*, 2011).

Em dados divulgados do *Surveillance of Risk Factors of Non-Communicable Diseases* (SuRFNCD), 37,6% dos adolescentes e 36,4% dos adultos iranianos apresentaram hipertrigliceridemia. Com relação à dosagem de colesterol total, 45,4% das mulheres e 40,4% dos homens demonstraram estar com hipercolesterolemia, sugerindo que metade das mulheres iranianas sofre dessa condição (Esteghamati *et al.*, 2009).

Devido a grande prevalência de indivíduos com sobrepeso e obesidade nas populações, há necessidade de se realizar o diagnóstico precoce, evitando os fatores de riscos associados e estabelecendo-se um tratamento preventivo, principalmente na infância e na adolescência, procurando, assim, minimizar o alto impacto econômico do tratamento da obesidade e de suas comorbidades.

1.2 Fisiopatologia da obesidade

A obesidade resulta de alteração do metabolismo energético, no qual há armazenamento excessivo de energia sob a forma de triglicérides no tecido adiposo (Korner *et al.*, 2009). O hipotálamo tem participação essencial na homeostase energética, pois produz vários neuropeptídeos em resposta a diversos estímulos que regulam a saciedade e o consumo energético (Korner *et al.*, 2009).

No hipotálamo funciona a regulação central de quanto é consumido de energia e do que é gasto pelo organismo, recebendo informações a respeito do balanço energético, através de sinais neuronais e hormonais que partem de diferentes regiões (núcleos) dentro do próprio hipotálamo, particularmente dos núcleos ventromedial, paraventricular e arqueado, e da área hipotalâmica lateral (Xu *et al.*, 2003).

Esses neuropeptídios podem estimular (orexígenos) ou inibir (anorexígenos) a ingestão de alimentos e atuam por mediação de receptores específicos localizados no hipotálamo. A pro-opiomelanocortina (POMC) e o transcrito regulado por anfetamina e cocaína (CART) são anorexígenos (Arora e Anubhuti, 2006; Korner *et al.*, 2009), enquanto que o neuropeptídeo Y (NPY), o peptídeo *agouti-relacionado* (AgRP) e as orexinas são importantes orexígenos (Arora e Anubhuti, 2006).

Figura 1 – Circuito de retroalimentação entre a concentração sérica de leptina e a regulação do estímulo para a ingestão de alimentos e do gasto energético. A – Mostra que, quando a ingestão de alimentos excede o gasto energético, a concentração de leptina aumenta, levando à diminuição da síntese de NPY e AgRP e ao aumento de POMC e CART no núcleo arqueado (hipotálamo), cuja consequência é a diminuição da ingestão de alimentos e o aumento do gasto de energia, a fim de reduzir o balanço energético positivo e, assim, manter o peso estável. B – Ilustra situação oposta à anterior, quando a ingestão de energia não consegue suprir a necessidade do gasto de energia, o que implica em aumento do estímulo para a ingestão de alimentos e redução do gasto energético. Nota-se que as consequências fisiológicas ilustradas no quadro B são muito maiores que as da situação A, ou seja, as repercussões no organismo, quando o balanço energético está negativo, não são apenas o inverso que no quadro A, mas, também, implicam estímulos muito mais intensos. Abreviaturas: NPY – neuropeptídeo Y; AgRP – proteína relacionada a agouti; POMC – pró-opiomelanocortina; CART – transcrito regulado por cocaína e anfetamina. Adaptado de Donato Júnior, Pedrosa e Tirapegui (2004)

O tecido adiposo é considerado um órgão endócrino que secreta vários peptídeos bioativos (Flier *et al.*, 1987). Essas proteínas compartilham propriedades estruturais, como as citocinas, sendo a maioria delas produzida e secretada pelo tecido adiposo e denominada genericamente “adipocinas” (Lafontan, 2005).

Entre as diversas adipocinas secretadas pelo tecido adiposo, destacam-se a leptina, a adiponectina, a adipsina, a resistina, o TNF- α , o PAI-1, as interleucinas 1, 6 e 8 (IL-1, 6 e 8), o fator 1 de crescimento insulina-símile (IGF-1), a MCP-1 e a visfatina. Com exceção quase que única da adiponectina, a produção e a secreção desses diversos fatores se intensificam com a obesidade (Frühbeck *et al.*, 2001).

A leptina é uma dessas adipocinas, sendo um hormônio peptídico com peso molecular de 16kDa, que apresenta uma estrutura terciária semelhante a alguns membros da família das citocinas. É produzida principalmente pelos adipócitos ou pelas células gordurosas, sendo que sua concentração varia de acordo com a quantidade de tecido adiposo (Trayhurn e Wood, 2004).

Os mecanismos do desenvolvimento da obesidade tornaram-se mais claros após a clonagem do gene da leptina, em 1994, realizado pelo grupo do Dr. Friedman, da *Rockefeller University*. Esta informação desencadeou uma verdadeira revolução na compreensão na fisiopatologia da obesidade (Zhang *et al.*, 1994). A leptina tem, entre suas ações, a ativação de receptores hipotalâmicos, inibindo a secreção do neuropeptídeo Y (NPY), diminuindo o apetite e aumentando a termogênese pela ativação do sistema nervoso simpático (Marchi-Alves *et al.*, 2010).

Quando da descoberta da leptina, acreditava-se que a obesidade pudesse ser causada pela sua deficiência e que poderia ser revertida através de sua reposição. Porém, a grande maioria dos obesos apresenta concentrações de leptina circulantes altas e, mesmo assim, esses obesos não são capazes de reduzir o consumo de alimentos. Dessa maneira, acredita-se que a obesidade comum é também uma condição de resistência à leptina. Devido às mutações no gene do receptor da leptina (LEPR) serem excessivamente raras, atualmente dá-se atenção também para a identificação dos eventos moleculares que ocorrem após a ligação da leptina a seus receptores localizados nos neurônios-alvo do hipotálamo (Considine *et al.*, 1996; Clement *et al.*, 1998).

Estudos realizados na população coreana (Yun *et al.*, 2010), em voluntários libaneses (Gannage-Yared *et al.*, 2006) e com uma população de tailandeses mostraram que a leptina no soro foi associada com a síndrome metabólica (Suriyaprom, Tungtrongchitr e Thawnasom, 2014). Stepien e colaboradores (2012) demonstraram, em seu estudo, que a resistência à insulina e à leptina pode ser fator patogênico importante em pacientes hipertensos com obesidade grave. Em pesquisa publicada recentemente pelo nosso grupo, observamos que a variante LEP 3'HVR foi associada com obesidade e concentrações de leptina plasmática aumentadas na população brasileira (Hinuy *et al.*, 2010).

O controle da saciedade se dá por liberação de outros hormônios, além da leptina – aqueles produzidos pelas células do trato gastrointestinal. A grelina é hormônio produzido pelas células epiteliais estomacais em resposta ao estado nutricional ou à entrada de alimento no estômago. A concentração de grelina plasmática aumenta durante a ingestão de alimento e diminui no final do período absorptivo, sendo o primeiro sinal que comunica ao cérebro a ingestão de alimento, através do estímulo para produção dos orexígenos NPY e AgRP no núcleo arqueado (ARC) (Murphy, Dhillo e Bloom, 2006; Klok, Jakobsdottir e Drent, 2007).

A adiponectina é uma das adipocinas também utilizada para avaliar o perfil inflamatório em indivíduos obesos, sendo secretada exclusivamente pelo tecido adiposo (Scherer *et al.*, 1995); tem papel na regulação da homeostase da energia e funciona em combinação com a leptina (Yamauchi *et al.*, 2001). A concentração circulante dessa adipocina encontra-se diminuída na obesidade, no DM2 e na resistência à insulina (Weyer *et al.*, 2001).

Outra adipocina bastante estudada é a resistina, uma proteína também muito utilizada para avaliação da obesidade em várias pesquisas (Silha *et al.*, 2003; Gürsoy *et al.*, 2012; Stepien *et al.*, 2012), sendo recentemente descoberta em ratos e expressa nos adipócitos, como um antagonista à ação da insulina, ligando, dessa maneira, a obesidade com o diabetes (Steppan *et al.*, 2001). Ou seja, sua função pode estar relacionada com a homeostase da glicose e a resistência à insulina em indivíduos diabéticos (El-Shal, Pasha e Rashad, 2013). Em pesquisa realizada com pacientes apresentando obesidade mórbida, a resistina foi positivamente associada com IMC elevado (Vendrell *et al.*, 2004).

Devido à produção destas adipocinas e de fatores inflamatórios pelo tecido adiposo, a obesidade é considerada doença crônica, acompanhada por processo inflamatório de baixo grau, que está associado a várias outras doenças, em particular as disfunções metabólicas (Mello, Studdert e Brennan, 2006; Hossain, Kavar e Nahas, 2007; Shuldiner, 2008).

Hotamisligil e colaboradores (1993) foram uns dos primeiros a descreverem a ligação entre obesidade e inflamação. Os autores verificaram uma correlação positiva entre a massa adiposa e a expressão do gene fator de necrose tumoral- (TNF-).

Existem fatores secretados por macrófagos que induzem a inflamação nos adipócitos, ao estimular a transcrição de genes relacionados com a inflamação,

incluindo quimiocinas, moléculas de adesão e várias adipocinas. Esses fatores exercem ações parácrinas, que perpetuam a inflamação local no tecido adiposo, além de ações endócrinas, que induzem a resistência à insulina e as disfunções vascular e cardíaca. Além disso, recentemente, foi descrito que fatores secretados por macrófagos prejudicam a diferenciação de células adiposas em humanos (Permana, Menge e Reaven, 2006; Tilg e Moschen, 2006).

Figura 2 – Anormalidades dos adipócitos na obesidade e papel pró-aterogênico da adiposidade. O ganho de peso progressivo leva à hipertrofia dos adipócitos e ao estado pró-inflamatório, com aumento da ativação dos macrófagos, secreção de quimiocinas e citocinas e dano endotelial. RE – retículo endoplasmático; IKK β – IkappaB quinase; IL – interleucina; JNK – c-Jun N-terminal quinase; MCP – proteína de quimioatração de monócitos; SAA – amiloide sérica; TLR – receptor toll-like; TNF – fator de necrose tumoral. Adaptado de Sanz, Moreno e Fuster (2008)

A participação da inflamação tem descrições fundamentadas, mas ainda é controversa sua associação com obesidade e doença cardiovascular e com comorbidades, como dislipidemia, DM2, hipertensão e síndrome metabólica (Berg e Scherer, 2005). Há evidências de que o estado inflamatório da obesidade pode ser devido a resistência à insulina, hiperlipidemia e síndrome metabólica (Do Prado *et al.*, 2009).

1.3 Alterações genéticas que podem estar associadas à obesidade

O aumento mundial da prevalência da obesidade atribui-se principalmente às mudanças nos estilos de vida, que incidem sobre certa susceptibilidade ou predisposição genética para se ser obeso. Neste contexto, também o fenótipo da obesidade, do qual se distinguem quatro tipos, em função da distribuição anatômica da gordura corporal (global, androide, ginoide e visceral), é influenciado pela base genética e por fatores ambientais (Marques-Lopes *et al.*, 2004).

Um estudo realizado com 1.974 pares de gêmeos monozigóticos e 2.097 dizigóticos, acompanhados por 25 anos, verificou as variações de IMC desses indivíduos. Foi observada maior concordância entre valores de IMC entre os pares de gêmeos monozigóticos (Stunkard *et al.*, 1986). Outro estudo, conduzido com 540 indivíduos adotados, que tiveram suas medidas de IMC comparadas com o IMC de seus pais adotivos e biológicos, resultou em forte relação entre os valores de IMC desses indivíduos e seus pais biológicos, mas nenhuma associação de valores de IMC com seus respectivos pais adotivos (Stunkard, Foch e Hrubec, 1986). Estima-se que a influência de fatores genéticos sobre o desenvolvimento da obesidade esteja entre 50% e 80% (Marques-Lopes *et al.*, 2004).

O estudo genético da obesidade comum baseia-se geralmente nas análises de variantes no DNA genômico, na maioria das vezes polimorfismos de uma única base, os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*), situados dentro ou próximo de genes candidatos. Estudos genéticos de diferentes tipos, realizados em membros de uma mesma família ou em indivíduos não-aparentados e empregando diferentes métodos de análise (estudos de transmissão em famílias, estudos de associação em indivíduos obesos não-aparentados) são realizados para determinar se existe associação entre um alelo de determinado gene e características relacionadas à obesidade (Angeli, 2008).

Os SNPs são mutações estáveis resultantes da substituição de um único nucleotídeo, estão entre as formas mais comuns de alterações genéticas e podem estar contidos em sequências codificadoras, intrônicas ou em regiões promotoras de genes. Esse tipo de polimorfismo tem sido relacionado a disfunções metabólicas, incluindo a obesidade, e às variações na resposta à terapia farmacológica (Irizarry *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2001; Chagnon *et al.*, 2003).

Existem vários pesquisadores que estão realizando estudos com SNPs e associação com a obesidade (Sirois-Gagnon *et al.*, 2011; Dougkas *et al.*, 2013; Ng *et al.*, 2014). Baseado nessa informação, foram selecionados 11 SNPs [*CD40* (rs1883832) C>T, *CX3CR1* (rs3732379) C>T, *CX3CR1* (rs3732378) G>A, *E-selectina* (rs5368) C>T, *ICAM-1* (rs1799969) G>A, *ICAM-1* (rs281432) C>G, *LIGHT* (rs344560) G>A, *LIGHT* (rs2291668) C>T, *RAGE* (rs2070600) G>A, *RAGE* (rs2236493) C>T e *VCAM* (rs3176878) C>T] de genes que, de alguma maneira, estão relacionados com a inflamação, para se verificar associação desses polimorfismos com a obesidade.

1.3.1 Gene *CD40*

CD40 é uma glicoproteína transmembrana tipo I, de aproximadamente 45 a 50kDa (Hornung *et al.*, 1998), que está expressa em células da parede vascular, tais como células endoteliais, macrófagos, células musculares lisas e plaquetas (Wang, B. *et al.*, 2011). Outra função é estimular a liberação de várias citocinas pró-inflamatórias, tais como molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1), IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α , interferon- γ , e MCP-1 (Wang, M. *et al.*, 2011).

O gene CD40 regula importantes funções das células B, está localizado no cromossomo 20 (20q11) (Ban *et al.*, 2006) e possui 9 exons (Tomer, Concepcion e Greenberg, 2002). Observou-se que as concentrações solúveis de CD40L em pacientes obesos foram maiores do que em indivíduos de peso normal (Unek *et al.*, 2010).

Estudos vêm sugerindo que a inflamação desencadeada durante a obesidade está relacionada à molécula CD40 pró-inflamatória (Aukrust *et al.*, 1999; Varo *et al.*, 2003). Esta molécula é um membro da família do fator de necrose tumoral, assim como o CD40 ligante (CD40L) na aterosclerose, e é apontada como um potencial contribuinte para a inflamação associada com a obesidade e suas complicações metabólicas (Lin *et al.*, 2012).

CD40L (CD40 ligante) é produzido por células T CD4+ ativadas (Poggi *et al.*, 2009). A obesidade em ratos e seres humanos tem sido associada recentemente com o acúmulo de células T no tecido adiposo (Wu *et al.*, 2007; Henegar *et al.*, 2008; Rausch *et al.*, 2008). Em ratos obesos, o acúmulo de

linfócitos T pró-inflamatórios no tecido adiposo visceral precede ao aparecimento de macrófagos, sugerindo que os linfócitos T desempenham papel importante na iniciação da inflamação do tecido adiposo (Kintscher *et al.*, 2008).

Diversos estudos realizados com *CD40* (rs1883832) C>T mostraram sua associação com a síndrome coronária aguda (SCA) e que esse polimorfismo participa da regulação da expressão do CD40 (Tian *et al.*, 2008; Tian *et al.*, 2010; Wang, Ming *et al.*, 2011). Este SNP localiza-se na região 5'UTR na posição -1 da sequência de consenso de Kozak do gene CD40, que é uma sequência de reconhecimento curta, que facilita a ligação inicial do mRNA para a pequena subunidade ribossomal (Kozak, 1986).

1.3.2 Genes ICAM-1, VCAM e E-selectina

A molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) é uma glicoproteína de superfície de 95kD, apresenta papel diferenciado no processo inflamatório da obesidade (Jiang *et al.*, 2002) e está envolvida na migração de leucócitos para locais de inflamação (Buraczynska *et al.*, 2012). A forma solúvel é sICAM-1, que encontra-se em elevada concentração, na obesidade, e está também correlacionada com a deposição de gordura abdominal (Tsakadze *et al.*, 2004).

Estudo realizado em camundongos machos, após dieta rica em gordura durante 3 semanas, demonstrou que houve aumento específico na expressão de mRNA no tecido adiposo para ICAM-1, IL-6 e proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) (Brake *et al.*, 2006).

ICAM-1 e VCAM-1 são expressos por células endoteliais e leucócitos, em resposta às citocinas inflamatórias, aos níveis elevados de ácidos graxos livres, às lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e aos produtos finais de glicação avançados que ocorrem no diabetes (Meigs, Hu *et al.*, 2004). Estas moléculas de adesão (ICAM-1 e VCAM) facilitam o rolamento dos leucócitos e a adesão e a migração para o espaço subendotelial, onde ocorre o início da formação aterosclerótica e onde, conseqüentemente, haverá aumento das concentrações plasmáticas dessas moléculas, permitindo, dessa maneira, o desenvolvimento de DAC e DM2 (Meigs *et al.*, 2004).

Alguns estudos relataram que a produção de TNF- α , pelos adipócitos, é capaz de estimular diretamente a liberação de ICAM-1 e E-selectina a partir de células endoteliais (Schmidt *et al.*, 2002; Pontiroli *et al.*, 2004). Uma vez que tenha

ocorrido o emagrecimento, há diminuição significativa na circulação de TNF- α , sendo assim, é possível que este seja responsável pela diminuição das concentrações de ICAM-1 e E-selectina (Ziccardi *et al.*, 2002).

E-selectina é uma glicoproteína de superfície de 11kD (Wang *et al.*, 2010), sendo responsável pela adesão de neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos ao endotélio (Macias *et al.*, 2003). Geralmente, não é possível detectá-la quando não há ativação de células endoteliais, mas, quando há estímulos pró-inflamatórios, é rapidamente sintetizada em resposta a diversas citocinas (Wang *et al.*, 2010). Um estudo relacionou o aumento das concentrações plasmáticas de E-selectina, ICAM-1 e VCAM, com o risco aumentado 1,5 a 7,5 vezes em desenvolver o diabetes (Meigs *et al.*, 2004).

1.3.3 Gene *LIGHT* ou *TNFSF14*

TNFSF14 (fator de necrose tumoral 14) também conhecido como LIGHT, é uma proteína transmembrana tipo II de 240 aminoácidos (aa) (Del Rio *et al.*, 2010), sendo expressa em vários tecidos humanos e de roedores e fortemente expressada por células T ativadas e células dendríticas imaturas, que induzem apoptose (Hoffmann, 2008; Kim *et al.*, 2011).

Algumas pesquisas relataram que o LIGHT solúvel (sLIGHT) promove a aterogênese, através da indução de citocinas pró-inflamatórias e metaloproteinases (MMPs) em macrófagos e células endoteliais. Recentemente, foi mostrado o envolvimento de sLIGHT e HVEM, sugerindo, em humanos, a relação com obesidade e distúrbios metabólicos (Hofmann *et al.*, 1999; Schmidt *et al.*, 2001; Yan *et al.*, 2003).

Outros estudos descreveram a existência de uma interação entre LIGHT e HVEM que fornece um sinal pró-inflamatório para células T e macrófagos para produzir respostas inflamatórias, tais como liberação de citocinas e crescimento celular (Croft, 2003; Granger e Rickert, 2003; Kwon *et al.*, 2003). Uma pesquisa realizada por Kim e colaboradores (2011) verificou aumento da expressão de LIGHT em macrófagos e adipócitos, sendo este aumento devido a possíveis fatores relacionados à obesidade, como ácidos graxos livres e estresse oxidativo.

1.3.4 *Gene RAGE*

O receptor do produto final da glicação avançada (RAGE) é um membro da superfamília das imunoglobulinas de moléculas da superfície celular, localizado no cromossomo 6 (6p.21.3), no locus do complexo maior de histocompatibilidade da classe III, e é conhecido por amplificar a resposta pró-inflamatória, aumentando a produção de citocinas e de moléculas de adesão (Gaens *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2009; Ng *et al.*, 2012; Suchankova *et al.*, 2012).

Estudo realizado com o polimorfismo *RAGE* Gly82Ser (rs2070600) em uma população coreana, de homens com idades entre 30 e 70 anos, mostrou que o alelo S e as concentrações plasmáticas do sRAGE estão mais associados com a resposta pró-inflamatória em condições de obesidade, em relação aos não obesos, ou seja, pessoas obesas que são homozigotas S/S em *RAGE* Gly82Ser podem ter respostas pró-inflamatórias mais elevadas do que as não obesas (Kim *et al.*, 2009).

1.3.5 *Gene CX3CR1*

O CX3CR1 é o receptor para quimiocina fractalcina (CX3CL1) (Rodero *et al.*, 2008), localizado no cromossomo 16 (16q13), sendo expresso por monócitos, células T e células NK (Sabate *et al.*, 2008; Shah *et al.*, 2011). Este receptor (CX3CR1) é responsável por desempenhar papel na sinalização de leucócitos e na sua migração para locais de inflamação, modulando as ações de células imunocompetentes em doenças inflamatórias (Imai *et al.*, 1997; Combadiere *et al.*, 1998).

Um estudo realizado com 900 franco-canadenses, em pacientes obesos (IMC $\geq 30\text{kg/m}^2$) e não obesos (IMC $< 30\text{kg/m}^2$), nos polimorfismos V249I (rs3732379) e T280M (rs3732378) do CX3CR1, mostrou associação desses com obesidade, porém há necessidade de novas pesquisas para determinar o papel efetivo do CX3CR1 na obesidade e suas consequências clínicas de risco cardiometabólico (Sirois-Gagnon *et al.*, 2011).

No presente estudo, foram avaliados os SNPs e os perfis de expressão gênica dos genes CD40, ICAM1, VCAM1, E-selectina, LIGHT, RAGE e CX3CR1 e a associação com a concentração sérica em pacientes obesos e não obesos da população brasileira residente na cidade de São Paulo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Principal

Investigar a contribuição dos polimorfismos dos genes *CD40*, *ICAM-1*, *VCAM*, *E-selectina*, *LIGHT*, *RAGE* e *CX3CR1* na manifestação da obesidade.

2.2 Objetivos Secundários

- Determinar a frequência alélica e genotípica dos polimorfismos dos genes *CD40* (rs1883832), *ICAM-1* (rs281432 e rs1799969), *VCAM* (rs3176878), *E-selectina* (rs5368), *LIGHT* (rs344560 e rs2291668), *RAGE* (rs2070600 e rs2236493) e *CX3CR1* (rs3732379 e rs3732378) em indivíduos com peso corpóreo considerado normal, com sobrepeso e como obesidade.

- Avaliar a associação dos diferentes genótipos na expressão do mRNA (ácido ribonucleico mensageiro) dos genes *CD40*, *ICAM-1*, *VCAM*, *E-selectina*, *LIGHT*, *RAGE* e *CX3CR1* em células mononucleares periféricas de indivíduos com peso normal, com sobrepeso e com obesidade.

- Associar as variações das concentrações das proteínas séricas solúveis de *PAI-1*, *IL-6*, *TNF-*, resistina, adiponectina e leptina com polimorfismos dos genes *CD40* (rs1883832), *ICAM-1* (rs281432 e rs1799969), *VCAM* (rs3176878), *E-selectina* (rs5368), *LIGHT* (rs344560 e rs2291668), *RAGE* (rs2070600 e rs2236493) e *CX3CR1* (rs3732379 e rs3732378) em indivíduos com peso normal, com sobrepeso e com obesidade.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística

Foram incluídos, no estudo, 40 indivíduos com peso normal ($18,5 \leq \text{IMC} < 25\text{kg/m}^2$), 55 com sobrepeso corporal ($25,0 \leq \text{IMC} < 30\text{kg/m}^2$) e 104 com obesidade ($\text{IMC} \geq 30\text{kg/m}^2$), brasileiros, sem vínculo genético, de etnias branca, parda, negra e amarela, de ambos os sexos (55 homens e 144 mulheres), com idade entre 30 e 68 anos. Os critérios adotados para a seleção dos participantes do estudo foram estabelecidos pela OMS, sendo que aqueles com $18,5 \leq \text{IMC} < 25\text{kg/m}^2$ foram classificados como peso normal; $25,0 \leq \text{IMC} < 30\text{kg/m}^2$ como sobrepeso corporal; e $\text{IMC} \geq 30\text{kg/m}^2$ como obesos (WHO, 2000). Aplicou-se, também, um questionário, para obtenção de dados socioeconômicos e informações sobre idade, IMC, medicamentos, consumo de bebidas alcoólicas, tabagismo e histórico familiar (**APÊNDICE B**).

O estudo foi realizado no Laboratório de Investigação Molecular em Cardiologia (LIMC), do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia do Estado de São Paulo (IDPC), no Hospital Universitário, da Universidade de São Paulo (HU/USP), e no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP).

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (CEP-IDPC), protocolo 4134, e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEP/FCF/USP), protocolo 585 (**ANEXO A**). Os indivíduos selecionados foram informados, pelo investigador principal ou por membro da equipe colaboradora designada por ele, sobre os objetivos da pesquisa desenvolvida neste trabalho. Somente participaram do estudo aqueles que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**APÊNDICE A**).

3.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos, no presente estudo, indivíduos com obesidade secundária; hipogonadismo em homens, como nas síndromes de Prader-Willi e Bardet-Biedl, ou hiperandrogenismo em mulheres que apresentavam síndrome do ovário policístico; disfunções hormonais como síndrome de Cushing ou

hipotireoidismo e hipertireoidismo; ou que foram submetidos à terapia ou a cirurgias que poderiam induzir ao desenvolvimento da obesidade.

3.3 Material biológico

As amostras de sangue periférico foram obtidas em uma única coleta, com os indivíduos em jejum de 12 horas, utilizando-se o sistema Vacutainer™ (Becton Dickinson Company, Plymouth, Reino Unido).

Cerca de 4,5 mL de sangue foi obtido em tubos contendo EDTA (1 mg/mL de K₃EDTA por mL de sangue), para extração de DNA genômico, hemograma completo e hemoglobina glicosilada. Amostras de sangue com fluoreto de sódio foram utilizadas para determinação da glicemia. A coleta foi em tubo contendo citrato de sódio para dosagem de fibrinogênio. Para a extração de mRNA, foram utilizados tubos do modelo *Tempus™ Blood RNA* (Lincoln Centre Drive, Foster City, CA, EUA). Para as determinações de colesterol total e frações, triacilglicerois, apolipoproteínas AI (apo AI) e B (apo B), hormônio estimulador da tireoide (TSH), tiroxina livre (T₄ livre), ureia, creatinina, AST, ALT, insulina e PCRus, utilizaram-se tubos (5,0 mL) sem anticoagulante e com gel separador.

3.4 Métodos

3.4.1 *Determinação das medidas antropométricas*

O peso e a altura dos voluntários foram aferidos utilizando-se uma balança mecânica para pesagem de humanos contendo aferidor de altura (Filizola S.A., São Paulo, Brasil), com o mínimo possível de roupas e descalços (Monteiro, 1998). O IMC foi estimado pela fórmula $IMC = \text{peso (kg)} / \text{Altura}^2$.

Tabela 1 – Classificação de peso pelo IMC

Classificação	IMC (kg/m ²)	Risco de comorbidade
Baixo peso	< 18,5	Baixo
Peso normal	18,5-24,9	-

Sobrepeso	25,0 a 29,9	Moderado
Obeso I	30,0 a 34,9	Aumentado
Obeso II	35,0 a 39,9	Grave
Obeso III	$\geq 40,0$	Muito grave

Fonte: DIRETRIZES BRASILEIRAS DE OBESIDADE III.

A aferição da circunferência abdominal foi feita com o indivíduo estando em pé, em posição ereta, utilizando-se uma fita métrica flexível inextensível de 200 cm de comprimento, com precisão de uma casa decimal. Para garantir a validade e a fidedignidade das medidas, observou-se rigorosamente a posição da fita no momento da medição, mantendo-a no plano horizontal. Para obtenção dos valores das circunferências, circundava-se com a fita o local do corpo que se desejava medir, sendo a mesma colocada com firmeza, sem esticar excessivamente, evitando-se, assim, a compressão do tecido subcutâneo. A leitura foi feita no centímetro mais próximo, no ponto de cruzamento da fita. As circunferências foram aferidas com o indivíduo usando apenas a roupa íntima, em posição ortostática, abdômen relaxado, braços ao lado do corpo e os pés juntos. A medida da circunferência da cintura foi tomada na altura da cintura natural do indivíduo, que é a parte mais estreita do tronco, e a circunferência do quadril foi medida na extensão máxima das nádegas (Ferreira *et al.*, 2006). Para relação cintura/quadril foram usados como valores de corte 0,90, para homens, e 0,85, para mulheres (WHO, 2000).

Tabela 2 – Associação da circunferência abdominal e risco de complicações metabólicas associadas com obesidade

Circunferência abdominal (cm)			
Risco de complicações metabólicas	Homem	Mulher	Nível de ação*
Aumentado	≥ 94	≥ 80	1
Aumentado substancialmente	≥ 102	≥ 88	2

Fonte: DIRETRIZES BRASILEIRAS DE OBESIDADE III.

*Nível de ação: significa a importância de se recomendar a redução da medida da circunferência abdominal quando 1 é menos importante do que 2.

A medida da composição corporal foi avaliada por impedância elétrica, utilizando-se o impedanciômetro modelo 310e (RJL Systems, EUA).

3.4.2 Determinação dos parâmetros bioquímicos

Os parâmetros bioquímicos foram determinados pelo Laboratório de Análises Clínicas, da Associação Fundo de Incentivo à Pesquisa (AFIP), entidade associada ao IDPC. O hemograma completo com contagem de plaquetas foi realizado pelo método citoquímico/isovolumétrico ou de impedância automatizado *ABX Pentra 120* (ABX, Kyoto, Japão) e *ABX Pentra 80* (ABX, Kyoto, Japão).

A determinação da atividade da AST, ALT, assim como a quantificação da concentração de glicose, ureia, creatinina, colesterol total, HDL e triacilglicerol, foi realizada por cinéticos no UV, métodos colorimétricos e enzimáticos automatizados, respectivamente, nos equipamentos *Dimension® RXL* (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, EUA) e *XPAND* (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, EUA). Os valores de colesterol VLDL e LDL foram calculados segundo a fórmula de Friedewald e colaboradores (Friedewald, Levy e Fredrickson, 1972).

Na determinação dos valores de TSH, T₄ livre e insulina foi utilizado o método de quimiluminescência automatizada *IMMULITE®* (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, EUA).

Para dosagens de PCRus, apo A e apo B foi utilizado o método de imunoensaio-turbidimétrico automatizado, com leitura no aparelho Hitachi-modelo 912 (Myco instrumentation, Renton, WA).

Para obter o valor percentual da hemoglobina glicada, foi utilizado o método de HPLC automatizado, com leitura no aparelho *G7 HPLC Analyzer* (Tosoh Bioscience, Maryland, EUA), enquanto a concentração plasmática do fibrinogênio foi obtida através do método de Klauss modificado, com leitura realizada no aparelho *Sysmex® CA-1500* (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, EUA).

Os índices de avaliação de resistência à insulina e disfunção das células beta, respectivamente, *Homeostatic Model Assessment – Insulin Resistance*

(HOMA-IR) e *Homeostatic Model Assessment – cells* (HOMA-) (Matthews *et al.*, 1985), foram estimados pelas fórmulas:

$HOMA- = 20 \times \text{insulina de jejum } (\mu\text{U/mL}) / \text{glicemia de jejum } (\text{mmol/L}) - 3,5;$

$HOMA-IR = \text{glicemia de jejum } (\text{mmol/L}) \times \text{insulina de jejum } (\mu\text{U/mL}) / 22,5.$

3.5 Determinação dos genótipos

3.5.1 Seleção dos SNPs

Os SNPs foram selecionados a partir de pesquisas feitas no Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Para a confirmação das informações obtidas no NCBI, foi utilizado o *software Ingenuity Pathway Analysis* (IPA - <http://www.ingenuity.com/>) (*Ingenuity® Systems*, Califórnia, EUA), que possibilita mostrar as interações entre as doenças e as moléculas, as proteínas ou os genes que se quer estudar.

O *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) (*Ingenuity® Systems*, Califórnia, EUA) é uma ferramenta computacional (*software*) que serve para auxiliar na pesquisa de interações entre genes e doença, mostrando, de forma mais intuitiva, a relação do que se quer pesquisar (doença) com possíveis marcadores (biomarcadores) através de uma rede de interações. Dessa maneira, foi construída uma imagem, a qual demonstrava as vias de possíveis ligações das moléculas de interesse com a obesidade e, finalmente, resultando na seleção dos genes (CX3CR1, RAGE, ICAM-1, VCAM, E-selectina, LIGHT e CD40).

A **FIGURA 3** demonstra as relações obtidas entre os genes e as doenças selecionadas no IPA. Em vermelho, mostram-se as doenças que, de alguma maneira, estão sendo reguladas pelos genes estudados; em verde, são biomarcadores encontrados para ajudar no diagnóstico ou no tratamento da obesidade e da síndrome metabólica; e, em laranja, encontram-se os genes que foram estudados.

© 2000-2014 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Figura 3 – Demonstração da relação dos genes, doenças e biomarcadores utilizando o IPA

3.5.2 Extração do DNA genômico

O DNA foi extraído a partir de sangue periférico anticoagulado com EDTA no equipamento *QIAcube*[®] (QIAGEN, GmbH, Alemanha), utilizando o *Kit Mini QIAamp*[®] *DNA Blood* (QIAGEN, GmbH, Alemanha), seguindo as orientações do fabricante. A quantificação do DNA genômico foi determinada utilizando o fluorímetro *Qubit*[®] *Fluorometer 2.0* (Applied Biosystems, Foster City, EUA). A integridade do DNA extraído foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

3.5.3 Análise dos polimorfismos genéticos

A escolha dos SNPs (polimorfismos de um único nucleotídeo) determinados pelo sistema *PyroMarq Q24* (QIAGEN, GmbH, Alemanha) foi realizada utilizando o banco de dados públicos dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Os critérios, como frequência do alelo menor (FAM) superior a 0,05% para SNPs presentes em regiões codificantes e superior 0,1% para SNPs presentes em regiões regulatórias como promotoras, 3'UTR

(*untranslated region* – região não traduzida), 5'UTR e *splicing*, foram utilizados como argumento de busca. Os iniciadores para a PCR (reação em cadeia da polimerase) e para a reação de pirosequenciamento foram construídos utilizando o programa *PyroMark Assay Design 2.0* (QIAGEN, GmbH, Alemanha). Para cada SNP, foram construídos três iniciadores, sendo que um deles foi obrigatoriamente marcado com biotina, totalizando 30 oligonucleotídeos. As sequências dos iniciadores e os polimorfismos estudados encontram-se no **QUADRO 1**.

Quadro 1 – Iniciadores utilizados na reação de pirosequenciamento

Gene	SNP	Sequências dos Iniciadores	Tamanho do Produto de PCR
CD40 (rs1883832)	C>T	5'GTCCTGCCGCCTGGTCTC3' Biotina-5'CAAGCAGCCCCAGAGGAC3' 5'CGCCTGGTCTCACCT3'	68pb
CX3CR1 (rs3732379)	G>A	5'TAAGCGTCTCCAGGAAAATCATAA3' Biotina-5'TTTCCTCTTCTGGACACCCTACA3' 5'TCTCCAGGAAAATCATAA3'	50pb
CX3CR1 (rs3732378)	C>T	5'TCTGAACCTTCTCCCCAGCAAA3' Biotina-5'GCTGGCCCTCAGTGTGACT3' 5'TGGCTAAATGCAACC3'	88pb
E-selectina (rs5368)	C>T	5'GCTGTGAGGAGGGATTTGAATT3' Biotina-5'CTTTGGGGCAATCTAGGTTTACAG3' 5'GAGGAGGGATTTGAATTA3'	166pb
ICAM-1 (rs1799969)	G>A	Biotina-5'CGACTCCCCCACAACCTTG3' 5'TGCGGTACACTGACTGAGG3' 5'CGAGACTGGGAACAGC3'	194pb
ICAM-1 (rs281432)	C>G	5'GTGGAGGAGCTGGGACTTTC3' Biotina-5'TTCCAGTAAATCCAGCCTTCAGC3' 5'GGAGTCATGGAGGGT3'	99pb
LIGHT (rs344560)	A>G	5'TTGGTCAGCCAGCAGTCA3' Biotina-5'CATCAGCAGTCGAACCA3' 5'CCTGGAGGCTGGGGA3'	151pb
LIGHT (rs2291668)	C>T	5'GGGTGGGTCTGGGTCTCTT3' Biotina-5'GGGTGACCATCTCTCCTAGACG3' 5'CTGTTGCTGATGGGG3'	102pb
RAGE (rs2070600)	G>A	Biotina-5'GAGGCCCTGGGACAGTGT3' 5'GCCTGGCACCAGGAAAATC3' 5'GGAAGGAAGAGGGAGC3'	97pb
RAGE (rs2236493)	A>G	5'GGGCAGGCTTAAGGTCCTTC3' Biotina-5'GCGGAACCAGCTTCTCTGA3' 5'CAGGCTTAAGGTCCTTC3'	116pb
VCAM (rs3176878)	C>T	5'CCATTTTGTATTTCAGGAAGA3' Biotina-5'TGGCAGGTATTATTAAGGAGGATG3' 5'GGAAGAGAAAAACAACAAAG3'	97pb

O protocolo inicial de otimização da PCR foi correspondente a *Pyromark PCR Master Mix*, *CoralLoad Concentrate*, 200 M, de cada iniciador, 10 g de DNA em uma reação com volume final de 25µl.

Para determinar a temperatura de hibridização dos iniciadores, foi testado um gradiente de temperatura, no qual variou-se a temperatura de desnaturação (T_m). E, para escolha da melhor temperatura de hibridização, foi realizada uma corrida eletroforética dos produtos da PCR em gel de agarose 1%.

A **FIGURA 4** representa um exemplo de um experimento avaliando o gradiente de temperatura para amplificação dos genes LIGHT e ICAM-1 na otimização para o pirosequenciamento. A seta indica o fragmento que apresentou melhor amplificação, que se traduziu em um fragmento único, sem o aparecimento de bandas inespecíficas acima ou abaixo e de intensidade forte e homogênea, que foram as colunas 2 e 5. Neste caso, a melhor temperatura de hibridização foi de 62°C.

Figura 4 – Fotografia do gel de agarose a 1% do produto da PCR com gradiente de temperatura de hibridização (TH) dos genes LIGHT e ICAM-1. M: marcador de tamanho molecular de DNA de 100 pares de bases (pb). 1: produto da PCR com TH do LIGHT de 60°C. 2: produto da PCR com TH do LIGHT de 62°C. 3: produto da PCR com TH do LIGHT de 64°C. 4: produto da PCR com TH do ICAM-1 de 60°C. 5: produto da PCR com TH do ICAM-1 de 62°C. 6: produto da PCR com TH do ICAM-1 de 64°C

A **TABELA 3** resume as condições otimizadas e a amplificação pela PCR para os polimorfismos estudados.

Tabela 3 – Condições de amplificação pela PCR para os polimorfismos dos genes CD40, CX3CR1, E-SELECTINA, ICAM-1, LIGHT, RAGE e VCAM

Polimorfismo	Desnaturação	Hibridação	Extensão	Ciclos
CD40 C>T	94°C/30seg	64°C/30seg	72°C/30seg	45
CX3CR1 C>T	94°C/30seg	60°C/30seg	72°C/30seg	45
CX3CR1 G>A	94°C/30seg	60°C/30seg	72°C/30seg	45
E-SELECTINA C>T	94°C/30seg	62°C/30seg	72°C/30seg	45
ICAM-1 G>A	94°C/30seg	62°C/30seg	72°C/30seg	45
ICAM-1 G>C	94°C/30seg	62°C/30seg	72°C/30seg	45
LIGHT G>A	94°C/30seg	60°C/30seg	72°C/30seg	45
LIGHT C>T	94°C/30seg	62°C/30seg	72°C/30seg	45
RAGE G>A	94°C/30seg	64°C/30seg	72°C/30seg	45
RAGE C>T	94°C/30seg	60°C/30seg	72°C/30seg	45
VCAM C>T	94°C/30seg	60°C/30seg	72°C/30seg	45

O protocolo para reação de pirosequenciamento consiste em purificação dos produtos da PCR, isolamento da fita (do produto da PCR) sintetizada com o iniciador marcado com a biotina, mistura através do sistema a vácuo dos produtos purificados com os reagentes de pirosequenciamento (álcool 70%, solução de desnaturação e tampão de lavagem), adição dos nucleotídeos, de acordo com a ordem de dispensação criada pelo programa *PyroMark Assay Desing 2.0*, e captura do sinal fluorescente, pelo sistema, a cada adição de nucleotídeos.

O método de pirosequenciamento se baseia na amplificação pela PCR da região desejada com marcação por biotina na região 5'. O produto da PCR é desnaturado e o segmento marcado com biotina serve de molde para o

pirossequenciamento, após ser isolado, pela propriedade de ligação biotina-estreptoavidina, que hibridiza com o iniciador do sequenciamento (**FIGURA 5**).

O iniciador hibridado e o molde fita simples são incubados com as enzimas DNA polimerase, ATP sulfurilase, luciferase e aspirase, assim como os substratos adenosina 5-fosfosulfato (APS) e luciferina. O primeiro deoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP) é adicionado na reação. A DNA polimerase catalisa a adição do dNTP ao iniciador do sequenciamento, se ele for a base complementar da fita molde. Cada incorporação é acompanhada pela liberação de pirofosfato (PPi) na quantidade equimolar para a quantidade de nucleotídeo incorporado.

A ATP sulfurilase converte o PPi para ATP na presença de APS. Este ATP direciona a conversão mediada pela luciferase da luciferina para oxiluciferina, que gera luz visível em quantidade proporcional à quantidade de ATP. A luz produzida na reação catalisada pela luciferase é detectada por um sensor da CCD e é vista como um pico nos dados brutos liberados (Pirograma). A altura de cada pico (correspondente à produção de luz) é proporcional ao número de nucleotídeos incorporados e ATP. Quando a degradação é completa, outro nucleotídeo é adicionado.

Figura 5 – Fundamento de método do pirosequenciamento, segundo manual do equipamento Q24 da QIAGEN
(www.qiagen.com)

A adição de dNTPs ocorre sequencialmente. É importante ressaltar que a deoxiadenosina alfa tio trifosfato (dNTP S) é usada como uma substituta do deoxiadenosina trifosfato (dATP), pois este é eficientemente utilizado pela DNA polimerase, mas não reconhecido pela luciferase. No processo contínuo, a fita

complementar do DNA é polimerizada e a sequência do nucleotídeo é determinada pelo sinal do pico no traçado do pirograma.

3.6 Determinação da expressão gênica

3.6.1 Extração do RNA total

O RNA (ácido ribonucleico) foi extraído a partir de sangue periférico anticoagulado, coletado no tubo *Tempus™ Blood RNA* (Lincoln Centre Drive, Foster City, CA, EUA), com o objetivo de manter a integridade do RNA total. O material foi extraído utilizando o *Tempus™ Spin RNA Isolation Kit* (Lincoln Centre Drive, Foster City, CA, EUA), seguindo as orientações do fabricante. A quantificação e a pureza do RNA foram determinadas utilizando o fluorímetro *Qubit® Fluorometer 2.0* (Applied Biosystems, Foster City, EUA).

3.6.2 Análise da expressão do mRNA pela RT seguida da PCR em tempo real

A quantificação da expressão do mRNA dos genes LIGHT, CX3CR1, RAGE e ICAM-1 foi realizada por transcrição reversa do mRNA, seguida da PCR (RT-qPCR) em tempo real, utilizando o sistema de amplificação *Rotor-Gene* (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha).

A primeira etapa consiste da síntese de cDNA (ácido desoxirribonucleico complementar) a partir de 1.000 g de RNA de cada amostra. O reagente empregado foi *High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, EUA), que continha os iniciadores aleatórios (*random primers*), dNTPs, transcriptase reversa e tampão da enzima. A reação foi realizada em termociclador *Mastercycler Personal* para 25 tubos de 200µL (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), obedecendo-se aos seguintes ciclos de temperatura e tempo: 25°C por 10 min, 37°C por 120 min e 85°C por 5 min. As amostras de cDNA obtidas foram armazenadas a -20°C até a utilização.

Na segunda etapa, o cDNA de cada gene foi amplificado pela PCR em tempo real, utilizando-se iniciadores e sondas de detecção marcadas com FAM adquiridos no formato "*TaqMan® Gene Expression Assay*" (Life Technologies, Forest City, EUA) que continha os iniciadores e a sonda de cada gene prontos para

serem utilizados e identificados pelos números de catálogo, de acordo com o **QUADRO 2**.

Quadro 2 – Número de catálogo dos ensaios utilizados (iniciadores + sondas)

Gene	Número de catálogo
LIGHT	Hs00542477_m1
CX3CR1	Hs01922583_s1
RAGE	Hs00179504_m1
ICAM-1	Hs00164932_m1

Os demais reagentes da PCR foram: solução denominada *TaqMan® Fast Universal Master Mix* (MgCl_2 25mM, dNTPs 10mM, enzima AmpliTaq Gold 150U e tampão da reação; Life Technologies, Forest City, USA). O volume final foi de 20µl por reação e os ensaios foram realizados em duplicata.

O protocolo da RT-PCR utilizado foi constituído pelas seguintes etapas:

- 1) Tempo de incubação de 10 minutos a 95°C, para ativação da enzima *Hot Star Taq* e também para outros reagentes atingirem a temperatura ideal da reação.
- 2) 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, que correspondem à fase de desnaturação, seguidos de 15 segundos a 60°C, que correspondem à fase de hibridização e extensão.
- 3) Os sinais de fluorescência foram detectados nos filtros verde (FAM) e amarelo (VIC) no equipamento *Rotor-Gene* (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha).
- 4) Foi determinada uma linha de corte na região logarítmica da curva, sendo que o número de ciclos onde essa linha cruza correspondente ao Ct (*cycle threshold*). O valor de Ct é preditivo da quantidade de mRNA alvo presente na amostra.

Os sinais de fluorescência emitidos pelos fluoróforos das sondas *TaqMan* foram detectados pelo equipamento *Rotor-Gene Q* (QIAGEN, GmbH, Alemanha). Os dados foram analisados utilizando o programa *Rotor-Gene Q Series*

Software (QIAGEN, GmbH, Alemanha), que gera curvas semilogarítmicas dos sinais de amplificação. Esse programa fornece o parâmetro ciclo no qual o sinal de fluorescência é significativo, denominado ciclo threshold (Ct) (Bustin e Mueller, 2005). Para cada amostra de cDNA, o Ct de cada gene foi registrado e comparado com o gene da GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) e da SDHA [complexo da succinato desidrogenase, subunidade A, flavoproteína (Fp)] que foram utilizados como controles endógenos.

A escolha do controle endógeno foi feita avaliando-se 6 genes diferentes GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase), B2M (beta 2-microglobulina), HPRT1 (hipoxantina fosforobosiltransferase 1), SDHA [complexo da succinato desidrogenase, subunidade A, flavoproteína (Fp)], UBC (ubiquitina C) e HMBS (hidroximetilbilane sintase) em uma amostragem de cDNAs que incluíram pacientes randomizados entre caso e controle. Após a PCR em tempo real, os dados foram analisados no programa *geNorm* (Primer Design Ltd.). Os genes com menores variações entre as amostras foram o GAPDH e o SDHA.

A quantidade de cDNA utilizada nos ensaios foi otimizada a partir de curva-padrão que permite avaliar a linearidade da amplificação bem como a eficiência da mesma. Para essa finalidade, foram utilizadas diluições seriadas (1:2, 1:4; 1:8 e 1:16) de cDNA e os respectivos Ct foram plotados em gráficos que permitem verificar a relação entre essas duas variáveis (Ct x log da diluição de cDNA).

A eficiência da reação foi calculada de acordo com a inclinação da curva gerada pela seguinte fórmula: $E = 10^{-1/s} - 1 \times 100$, onde s é a inclinação da curva. Segundo Livak e Schmittgen (2001), para a PCR em tempo real ter alta eficiência (90% a 110%), a inclinação (*slope*) da curva-padrão deve ser próxima de -3,3. Quando esses critérios não são atendidos, é preciso verificar as concentrações de iniciadores e sondas de outras curvas-padrão (Livak e Schmittgen, 2001).

Na **TABELA 4**, estão apresentados os resultados de inclinações (*slopes*) das curvas e as respectivas eficiências dos ensaios.

Tabela 4 – Valores de inclinação da curva e eficiência dos ensaios de RT-PCR em tempo real

Gene	Inclinação da Curva	Eficiência
LIGHT	-3,30	100%
CX3CR1	-3,36	99%
RAGE	-3,55	91%
ICAM-1	-3,32	100%

Os valores de Ct obtidos nos ensaios foram utilizados para o cálculo da expressão relativa de mRNA de cada gene alvo em relação à do GAPDH (controle endógeno). Essa relação é denominada Delta Ct (ΔCt) e foi calculada pela fórmula:

$$\Delta Ct = (Ct_{\text{gene alvo}} - Ct_{\text{controle endógeno}})$$

Os dados de ΔCt foram transformados em escala logarítmica ($2^{-\Delta Ct}$) para a análise dos dados.

3.7 Análise das citocinas

3.7.1 Dosagem das proteínas séricas no soro

As amostras de soro dos indivíduos incluídos no estudo foram obtidas a partir do sangue total periférico colhido em tubo com ativador de coágulo e gel separador. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente, por 30 minutos, para coagularem e, em seguida, foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos a 25°C. O soro foi estocado a -20°C.

A dosagem de adiponectina, PAI-1 e resistina foi alcançada utilizando *MILLIPLEX™ Multiplex Map Human Adipokine Magnetic Bead Panel 1 kit* (Millipore, Missouri, EUA) e, para as dosagens IL-6, leptina e TNF- α , foi utilizado *MILLIPLEX™ Human Adipokine Magnetic Bead Panel 2 kit* (Millipore, Missouri, EUA) no equipamento LUMINEX® 200™ System (Luminex Corporation, Austin, EUA).

3.8 Análise estatística dos dados

A montagem do banco de dados e as análises estatísticas foram realizadas no programa SPSS versão 17 (SPSS Inc., Chicago, EUA). Os gráficos foram construídos no programa GraphPad Prism 5 (Califórnia, EUA). Foi avaliado se as variáveis obedecem a uma distribuição normal através do teste de aderência Kolmogorov-Smirnov. Foram utilizados testes que comparam proporções (Qui-quadrado, teste Exato de Fisher ou *Likelihood*), bem como o teste t de *Student*, para comparação de médias para as variáveis numéricas. Para as variáveis numéricas que não obedeceram à distribuição normal, foram utilizados testes não-paramétricos, como Mann-Whitney, para comparação de médias entre dois grupos, e Kruskal-Wallis, para comparação de médias entre três ou mais grupos.

O teste Tukey foi utilizado para as comparações múltiplas no teste de ANOVA, considerando 95% de intervalo de confiança.

Na regressão logística univariada, o modelo utilizado teve, como variável dependente, o IMC e, independente, o polimorfismo e o resultado da expressão gênica.

O modelo utilizado para análise da regressão logística multinomial foi com o um p valor ajustado através das variáveis glicose, colesterol total, insulina, PAI-1, IL-6, TNF- α , resistina, adiponectina, leptina, hábito de fumar, presença de DM2 e hipertensão. Não foram inseridas todas as variáveis estudadas, pois apresentaram alta correlação com algumas que haviam sido selecionadas; por esse motivo, caso fossem adicionadas todas as variáveis, o modelo não conseguiria ajustar-se devido à multicolinearidade.

Em todas as análises, o nível de significância considerado foi de 5%.

4. RESULTADOS

Os resultados apresentados referem-se às análises realizadas entre os grupos de peso normal (C), sobrepeso (SP) e obeso (OO). Em alguns momentos, no entanto, foram realizadas comparações entre os grupos do estudo.

4.1 Características da população estudada

Verificou-se que os três grupos (C, SP e OO) apresentaram-se semelhantes – quanto às variáveis gênero, etnia, histórico familiar de DCV, prática de exercício físico, consumo de bebida alcoólica e número de mulheres com menopausa (**TABELA 5**) – e diferentes, com relação às variáveis tabagismo ($p=0,010$), número de indivíduos com DM2 ($p=0,003$) e hipertenso ($p<0,05$), sendo que a variável fumantes apareceu com maior frequência no grupo de sobrepeso ($p=0,010$). Predominou maior frequência de diabético e hipertenso no grupo dos obesos. Esse último dado já é conhecido na literatura, pois a obesidade está diretamente relacionada com o desenvolvimento da DM2 e da hipertensão arterial (Gregg *et al.*, 2007; Eckel *et al.*, 2011; Lakoski *et al.*, 2011).

Tabela 5 – Características sociodemográficas da população estudada

Variável		Normal (40)	Sobrepeso (55)	Obeso (104)	P
GÊNERO	MASCULINO	22,5% (9)	30,9% (17)	27,9% (29)	0,662 ^(a)
ETNIA**	BRANCA	77,5% (31)	58,2% (32)	64,4% (67)	0,286 ^(b)
	PARDA	17,5% (7)	27,3% (15)	28,8% (30)	
	NEGRA	5,0% (2)	12,7% (7)	4,8% (5)	
	AMARELA	0,0% (0)	1,8% (1)	1,9% (2)	
TABAGISMO	NUNCA FUMOU	75,0% (30)	67,3% (37)	66,3% (69)	0,010 ^(a)
	FUMANTE	12,5% (5)	25,5% (14)	9,6% (10)	
	PAROU DE FUMAR	12,5% (5)	7,2% (4)	24,1% (25)	
Diabete melito tipo 2		7,5% (3)	21,8% (12)	34,6% (36)	0,003 ^(a)
Hipertensão arterial		15,0% (6)	10,9% (6)	44,2% (46)	<0,001 ^(a)

História familiar de DCV	60,0% (24)	43,6% (24)	53,8% (56)	0,259 ^(a)
Prática de atividade física	50,0% (20)	43,6% (24)	35,6% (37)	0,251 ^(a)
Consumo alcoólico	15,0% (6)	27,3% (15)	16,3% (17)	0,190 ^(a)
Menopausa	12,9% (4)	26,3% (10)	25,3% (19)	0,324 ^(a)

Nota: Número de indivíduos entre parênteses. Os indivíduos com $18,5 \leq \text{IMC} < 25\text{kg/m}^2$ foram classificados como peso normal, $25,0 \leq \text{IMC} < 30\text{kg/m}^2$ foram classificados como sobrepeso e $\text{IMC} \geq 30\text{kg/m}^2$ foram classificados como obesos (WHO, 2000). Variáveis categóricas foram comparadas por qui-quadrado^(a) ou Likelihood Ratio^(b). DCV: doença cardiovascular; **Etnia: autodeclaração dos participantes.

Na **TABELA 6**, está representado o perfil bioquímico e antropométrico dos grupos C, SP e OO. Foram incluídos no estudo **199** indivíduos, sendo 40 com peso normal, 55 com sobrepeso e 104 obesos, de ambos os sexos e com idades entre 30 e 68 anos.

Os valores de IMC, CA, RCQ e teor de gordura foram maiores no grupo OO. Quando foi feita comparação entre os grupos, essas variáveis apresentaram valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$). Esses dados são considerados fatores relevantes para caracterização da população do estudo.

O perfil glicêmico (glicemia, hemoglobina glicada, insulina, HOMA- e HOMA-IR) apresentou-se mais elevado no grupo OO. Também foi verificado que os grupos se mostraram estatisticamente diferentes para essas variáveis ($p < 0,05$). No perfil lipídico (colesterol total, HDL-C, LDL-C, VLDL-C, triacilglicerol, Apo AI e Apo B), verificaram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos estudados, com exceção de colesterol total ($p = 0,237$), LDL-C ($p = 0,246$) e Apo AI ($p = 0,474$). Esses resultados vêm comprovar que a obesidade está envolvida diretamente com os distúrbios metabólicos, sendo esse um dos critérios utilizados para a caracterização da síndrome metabólica.

Analisou-se o perfil inflamatório (PCRus, fibrinogênio, PAI-1, IL-6 e TNF-) dos indivíduos que mostraram diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos, com exceção do fibrinogênio ($p = 0,078$). Esses resultados corroboram os resultados da literatura, que mostram que a obesidade é um processo inflamatório de baixo grau que ocorre nos adipócitos (Sanz, Moreno e Fuster, 2008; Shuldiner, 2008).

As concentrações de resistina, adiponectina e leptina foram maiores no grupo OO, quando comparados os três grupos do estudo, apresentando valores significativos ($p < 0,05$).

Tabela 6 – Dados do perfil bioquímico e antropométrico de indivíduos classificados como peso normal, sobrepeso e obeso

Variável	Normal (40)	Sobrepeso (55)	Obeso (104)	P
Idade, anos	47,0(40,3-50,8)	44,0(37,0-52,0)	48,0(37,3-53,0)	0,665
IMC, kg/m ²	23,0(21,6-24,4) ^a	27,5(26,4-28,7) ^b	33,9(31,6-36,4) ^c	<0,001
CA, cm	76,0(71,3-80,5) ^a	88,0(83,0-94,0) ^b	101,0(94,3-109,8) ^c	<0,001
RCQ	0,81(0,76-0,87) ^a	0,88(0,81-0,94) ^b	0,88(0,83-0,95) ^b	<0,001
Teor de gordura, %	30,8(25,6-33,7) ^a	33,9(28,3-36,2) ^a	39,2(34,3-42,7) ^b	<0,001
Glicose, mg/dL	90,0(84,3-95,8) ^a	93,0(87,0-99,0) ^{a,b}	96,0(88,0-104,0) ^b	0,007
Hemoglobina Glicosilada, %	5,5(5,3-5,7) ^a	5,7(5,2-6,0) ^{a,b}	5,8(5,4-6,0) ^b	0,016
Insulina, uIU/mL	5,3(3,3-7,4) ^a	7,0(5,3-9,6) ^a	14,2(9,3-22,2) ^b	<0,001
HOMA-	67,7(53,1-100,0) ^a	94,8(65,7-165,6) ^a	160,4(120,7-216,7) ^b	<0,001
HOMA-IR	1,2(0,7-1,7) ^a	1,6(1,2-2,2) ^a	3,4(2,0-6,4) ^b	<0,001
Colesterol Total, mg/dL	196,0(159,3-206,5)	196,5(164,5-221,5)	201,5(173,0-230,0)	0,237
HDL-C, mg/dL	60,5(50,3-69,5) ^a	51,0(43,8-63,3) ^b	48,0(41,3-55,0) ^b	<0,001
LDL-C, mg/dL	108,5(91,3-130,0)	116,0(95,5-143,0)	119,0(101,0-149,0)	0,246
VLDL-C, mg/dL	14,9(12,1-23,1) ^a	21,0(15,8-32,4) ^b	26,0(18,0-35,0) ^b	<0,001
Triacilgliceróis, mg/dL	74,5(61,0-115,5) ^a	103,0(79,0-162,0) ^b	130,0(91,3-173,8) ^c	<0,001
Apo AI, mg/dL	152,8(130,4-175,0)	151,0(124,0-169,0)	143,0(125,0-160,0)	0,474
Apo B, mg/dL	86,2(76,5-106,7) ^a	94,0(75,4-109,5) ^{a,b}	103,0(84,8-120,0) ^b	0,014
PCRus, mg/dL	0,08(0,04-0,25) ^a	0,32(0,09-0,78) ^b	0,42(0,15-0,88) ^b	<0,001
Fibrinogênio, mg/dL	321,5(275,5-376,2)	340,0(278,7-399,5)	350,0(295,3-416,0)	0,078
PAI-1, ng/mL	67,6(45,8-76,5) ^a	84,4(63,6-103,8) ^a	107,8(74,7-151,2) ^b	<0,001
IL-6, pg/mL	0,08(0,08-1,93) ^a	1,08(0,08-2,21) ^a	1,93(0,60-4,44) ^b	<0,001
TNF- α , pg/mL	1,87(0,29-4,06) ^a	3,47(0,69-5,02) ^a	5,06(3,14-6,30) ^b	<0,001
Resistina, ng/mL	26,9(16,7-36,2) ^a	36,5(28,4-51,9) ^b	40,1(27,1-55,1) ^b	0,004
Adiponectina, μ g/mL	21,8(7,8-33,3) ^a	12,9(7,6-21,3) ^a	31,1(15,5-101,9) ^b	<0,001
Leptina, ng/mL	10,2(5,8-13,8) ^a	11,1(6,1-21,5) ^a	32,1(18,2-45,2) ^b	<0,001

Nota: Número de indivíduos entre parênteses. Os indivíduos com $18,5 \leq \text{IMC} < 25 \text{kg/m}^2$ foram classificados como peso normal, $25,0 \leq \text{IMC} < 30 \text{kg/m}^2$ foram classificados como sobrepeso e $\text{IMC} \geq 30 \text{kg/m}^2$ foram classificados como obesos (WHO, 2000). Variáveis contínuas são apresentadas através da mediana e Percentil₂₅ – Percentil₇₅ e foram comparadas utilizando o teste de Kruskal-Wallis para os 3 grupos. IMC: índice de massa corpórea; CA: circunferência abdominal; RCQ: relação cintura/quadril. 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; PCRus; Proteína C Reativa ultrasensível.

4.2 Frequências alélica e genotípica dos polimorfismos

Foi realizada a genotipagem de 199 indivíduos, sendo 40 com peso normal, 55 com sobrepeso e 104 obesos, de ambos os sexos e com idades entre 30 e 68 anos.

As frequências genótípicas e alélicas dos SNPs *CD40* (rs1883832) C>T, *CX3CR1* (rs3732379) C>T, *CX3CR1* (rs3732378) G>A, *E-selectina* (rs5368) C>T, *ICAM-1* (rs1799969) G>A, *ICAM-1* (rs281432) C>G, *LIGHT* (rs344560) G>A, *LIGHT* (rs2291668) C>T, *RAGE* (rs2070600) G>A, *RAGE* (rs2236493) C>T e *VCAM* (rs3176878) C>T deste estudo podem ser observadas na **TABELA 7**. Os SNPs, a seguir enumerados, encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg, que caracterizou validade amostral pelos resultados obtidos: *CD40* (rs1883832) C>T: $\chi^2 = 0.42$; *CX3CR1* (rs3732379) C>T: $\chi^2 = 0.66$; *CX3CR1* (rs3732378) G>A: $\chi^2 = 0.005$; *E-selectina* (rs5368) C>T: $\chi^2 = 1.98$; *ICAM-1* (rs1799969) G>A: $\chi^2 = 0.77$; *ICAM-1* (rs281432) C>G: $\chi^2 = 0.41$; *LIGHT* (rs344560) G>A: $\chi^2 = 12.04$; *LIGHT* (rs2291668) C>T: $\chi^2 = 0.003$; *RAGE* (rs2070600) G>A: $\chi^2 = 0.01$; *RAGE* (rs2236493) C>T: $\chi^2 = 1.10$; *VCAM* (rs3176878) C>T: $\chi^2 = 0.05$.

Tabela 7 – Frequências dos polimorfismos *CD40*, *CX3CR1*, *E-selectina*, *ICAM-1*, *LIGHT*, *RAGE* e *VCAM* em indivíduos classificados como peso normal, sobrepeso e obesos

Polimorfismos	Genótipos			Alelos	
<i>CD40</i> (rs1883832) C>T	CC	CT	TT	C	T
Obeso (104)	62,5% (65)	33,7% (35)	3,8% (4)	79,3%	20,7%
Sobrepeso (55)	58,2% (32)	34,5% (19)	7,3% (4)	75,5%	24,5%
Normal (40)	47,5% (19)	50,0% (20)	2,5% (1)	72,5%	27,5%
$\chi^2 = 4,540$ (4gl, $p=0,317$) ^(b)			$\chi^2 = 1,690$ (2gl, $p=0,430$) ^(a)		
<i>CX3CR1</i> (rs3732379) C>T	CC	CT	TT	C	T
Obeso (104)	67,3% (70)	27,9% (29)	4,8% (5)	81,3%	18,7%
Sobrepeso (55)	60,0% (33)	38,2% (21)	1,8% (1)	79,1%	20,9%
Normal (40)	55,0% (22)	32,5% (13)	12,5% (5)	71,2%	28,8%
$\chi^2 = 6,533$ (4gl, $p=0,163$) ^(b)			$\chi^2 = 3,458$ (2gl, $p=0,177$) ^(a)		

<i>CX3CR1</i> (rs3732378) G>A	GG	AG	AA	G	A
Obeso (104)	82,7% (86)	15,4% (16)	1,9% (2)	90,4%	9,6%
Sobrepeso (55)	83,6% (46)	16,4% (9)	0,0% (0)	91,8%	8,2%
Normal (40)	75,0% (30)	25,0% (10)	0,0% (0)	87,5%	12,5%
$\chi^2 = 3,667$ (4gl, $p=0,366$) ^(b)			$\chi^2 = 0,994$ (2gl, $p=0,608$) ^(a)		
<i>E-selectina</i> (rs5368) C>T	CC	CT	TT	C	T
Obeso (104)	77,9% (81)	21,2% (22)	1,0% (1)	88,5%	11,5%
Sobrepeso (55)	81,8% (45)	12,7% (7)	5,5% (3)	88,2%	11,8%
Normal (40)	75,0% (30)	22,5% (9)	2,5% (1)	86,2%	13,8%
$\chi^2 = 4,642$ (4gl, $p=0,326$) ^(b)			$\chi^2 = 0,275$ (2gl, $p=0,872$) ^(a)		
<i>ICAM-1</i> (rs1799969) G>A	GG	GA	AA	G	A
Obeso (104)	83,7% (87)	15,4% (16)	1,0% (1)	91,3%	8,7%
Sobrepeso (55)	90,9% (50)	9,1% (5)	0,0% (0)	95,5%	4,5%
Normal (39)	84,6% (33)	12,8% (5)	2,6% (1)	91,0%	9,0%
$\chi^2 = 3,142$ (4gl, $p=0,534$) ^(b)			$\chi^2 = 2,006$ (2gl, $p=0,367$) ^(a)		
<i>ICAM-1</i> (rs281432) G>C	GG	CG	CC	G	C
Obeso (104)	24,0% (25)	52,9% (55)	23,1% (24)	50,5%	49,5%
Sobrepeso (55)	20,0% (11)	56,4% (31)	23,6% (13)	48,2%	51,8%
Normal (40)	32,5% (13)	45,0% (18)	22,5% (9)	55,0%	45,0%
$\chi^2 = 2,101$ (4gl, $p=0,717$) ^(a)			$\chi^2 = 0,874$ (2gl, $p=0,646$) ^(a)		

LIGHT (rs344560) G>A	GG	AG	AA	G	A
Obeso	91,3%	6,7%	1,9%	94,7%	5,3%
(104)	(95)	(7)	(2)		
Sobrepeso	89,1%	10,9%	0,0%	94,5%	5,5%
(55)	(49)	(6)	(0)		
Normal	92,5%	5,0%	2,5%	95,0%	5,0%
(40)	(37)	(2)	(1)		
$\chi^2 = 3,228$ (4gl, $p=0,520$) ^(b)			$\chi^2 = 0,0193$ (2gl, $p=0,990$) ^(a)		
LIGHT (rs2291668) C>T	CC	CT	TT	C	T
Obeso	62,5%	32,7%	4,8%	78,8%	21,2%
(104)	(65)	(34)	(5)		
Sobrepeso	70,9%	25,5%	3,6%	83,6%	16,4%
(55)	(39)	(14)	(2)		
Normal	70,0%	30,0%	0,0%	85,0%	15,0%
(40)	(28)	(12)	(0)		
$\chi^2 = 4,384$ (4gl, $p=0,357$) ^(b)			$\chi^2 = 1,945$ (2gl, $p=0,378$) ^(a)		
RAGE (rs2070600) G>A	GG	GA	AA	G	A
Obeso	99,0%	1,0%	0,0%	99,5%	0,5%
(104)	(103)	(1)	(0)		
Sobrepeso	98,2%	1,8%	0,0%	99,1%	0,9%
(55)	(54)	(1)	(0)		
Normal	97,5%	2,5%	0,0%	98,8%	1,2%
(40)	(39)	(1)	(0)		
$\chi^2 = 0,495$ (2gl, $p=0,781$) ^(b)			$\chi^2 = 0,506$ (2gl, $p=0,776$) ^(b)		
RAGE (rs2236493) C>T	CC	CT	TT	C	T
Obeso	4,8%	36,5%	58,7%	23,1%	76,9%
(104)	(5)	(38)	(61)		
Sobrepeso	3,6%	40,0%	56,4%	23,6%	76,4%
(55)	(2)	(22)	(31)		
Normal	2,5%	40,0%	57,5%	22,5%	77,5%
(40)	(1)	(16)	(23)		
$\chi^2 = 0,627$ (4gl, $p=0,960$) ^(b)			$\chi^2 = 0,0340$ (2gl, $p=0,983$) ^(a)		

VCAM (rs3176878) C>T	CC	CT	TT	C	T
Obeso	69,2%	27,9%	2,9%	83,2%	16,8%
(104)	(72)	(29)	(3)		
Sobrepeso	65,5%	30,9%	3,6%	80,9%	19,1%
(55)	(36)	(17)	(2)		
Normal	65,0%	30,0%	5,0%	80,0%	20,0%
(40)	(26)	(12)	(2)		

$$\chi^2 = 0,591 \text{ (4gl, } p=0,964)^{(b)}$$

$$\chi^2 = 0,495 \text{ (2gl, } p=0,781)^{(a)}$$

NOTA: Número de indivíduos entre parênteses. Os indivíduos com $18,5 \leq \text{IMC} < 25\text{kg/m}^2$ foram classificados como peso normal, $25,0 \leq \text{IMC} < 30\text{kg/m}^2$ foram classificados como sobrepeso e $\text{IMC} \geq 30\text{kg/m}^2$ foram classificados como obesos (WHO, 2000). Variáveis categóricas foram comparadas por qui-quadrado^(a) ou Likelihood Ratio^(b).

4.2.1 *Análise utilizando o modelo de regressão logística univariada para as variáveis dependentes “ter peso normal” e “ter obesidade”*

A análise de regressão logística univariada não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) para a presença dos polimorfismos, apesar de alguns casos, como o CD40 (rs1883832) C>T [$p = 0,104$] e CX3CR1 (rs3732379) C>T [$p = 0,170$], demonstrarem uma tendência de proteção na presença do polimorfismo em ter peso normal.

Tabela 8 – Análise utilizando modelos de regressão logística univariada para a variável dependente *ter obesidade*, de acordo com a distribuição dos genótipos de SNPs investigados como variável independente

Modelos	SNPs	Genótipos	Obeso (n= 104)	Normal (n= 40)	OR (IC 95%)	P
1	CD40 (rs1883832) C>T	CC	62,5% (65)	47,5% (19)	1,00	0,104
		CT+TT	37,5% (39)	52,5% (21)	0,54 (0,26-1,13)	
2	CX3CR1 (rs3732379) C>T	CC	67,3% (70)	55,0% (22)	1,00	0,170
		CT+TT	32,7% (34)	45,0% (18)	0,59 (0,28-1,25)	
3	CX3CR1 (rs3732378) G>A	GG	82,7% (86)	75,0% (30)	1,00	0,299
		AG+AA	17,3% (18)	25,0% (10)	0,63 (0,26-1,51)	
4	E-selectina (rs5368) C>T	CC	77,9% (81)	75,0% (30)	1,00	

		CT+TT	22,1% (23)	25,0% (10)	0,85 (0,36-2,00)	0,712
5	ICAM-1 (rs1799969) G>A	GG	83,7% (87)	84,6% (33)	1,00	0,889
		GA+AA	16,3% (17)	15,4% (6)	1,08 (0,39-2,96)	
6	ICAM-1 (rs281432) G>C	GG	24,0% (25)	32,5% (13)	1,00	0,304
		CG+CC	76,0% (79)	67,5% (27)	1,52 (0,68-3,39)	
7	LIGHT (rs344560) G>A	GG	91,3% (95)	92,5% (37)	1,00	0,823
		AG+AA	8,7% (9)	7,5% (3)	1,17 (0,30-4,56)	
8	LIGHT (rs2291668) C>T	CC	62,5% (65)	70,0% (28)	1,00	0,400
		CT+TT	37,5% (39)	30,0% (12)	1,40 (0,63-3,07)	
9	RAGE (rs2070600) G>A	GG	99,0% (103)	97,5% (39)	1,00	0,496
		GA+AA	1,0% (1)	2,5% (1)	0,38 (0,02-6,2)	
10	RAGE (rs2236493) C>T	CC	4,8% (5)	2,5% (1)	1,00	0,542
		CT+TT	95,2% (99)	97,5% (39)	0,51 (0,06-4,47)	
11	VCAM (rs3176878) C>T	CC	69,2% (72)	65,0% (26)	1,00	0,626
		CT+TT	30,8% (32)	35,0% (14)	0,83 (0,38-1,79)	

4.2.2 *Análise utilizando o modelo de regressão logística multinomial para as variáveis dependentes “ter peso normal” e “ter sobrepeso corporal”*

O modelo utilizado para análise da regressão logística multinomial é com o um p valor ajustado através das variáveis glicose, colesterol total, insulina, PAI-1, IL-6, TNF- α , resistina, adiponectina, leptina, hábito de fumar, presença de diabetes tipo 2 e hipertensão. Não foram inseridas todas as variáveis estudadas, pois apresentaram alta correlação com algumas que haviam sido selecionadas, por esse motivo, caso fossem adicionadas todas as variáveis, o modelo não conseguiria ajustar-se devido à multicolinearidade.

Os resultados dessa análise não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$) para a presença dos polimorfismos estudados.

Os polimorfismos RAGE (*rs2070600*) G>A e RAGE (*rs2236493*) C>T foram excluídos da análise, devido o número insuficiente de indivíduos em algum dos grupos (C, SP e OO).

Tabela 9 – Análise de Regressão Logística multinomial (modelo enter) para as variáveis dependentes “peso normal” (modelo 1) e “sobrepeso” (modelo 2) em relação aos polimorfismo

Modelos	Variáveis Independentes	OR (IC 95%)	P
1	<i>CD40 (rs1883832) C>T</i>	0,24 (0,04-1,38)	0,109
	<i>CX3CR1 (rs3732379) C>T</i>	0,45 (0,07-2,83)	0,393
	<i>CX3CR1 (rs3732378) G>A</i>	0,69 (0,09-5,61)	0,731
	<i>E-selectina (rs5368) C>T</i>	1,13 (0,15-8,24)	0,907
	<i>ICAM-1 (rs1799969) G>A</i>	0,68 (0,07-7,02)	0,747
	<i>ICAM-1 (rs281432) G>C</i>	1,44 (0,15-14,16)	0,753
	<i>LIGHT (rs344560) G>A</i>	13,32 (0,52-340,66)	0,118
	<i>LIGHT (rs2291668) C>T</i>	1,51 (0,22-10,32)	0,673
	<i>VCAM (rs3176878) C>T</i>	0,91 (0,13-6,41)	0,923
2	<i>CD40 (rs1883832) C>T</i>	0,59 (0,13-2,69)	0,491
	<i>CX3CR1 (rs3732379) C>T</i>	0,98 (0,19-4,98)	0,981
	<i>CX3CR1 (rs3732378) G>A</i>	1,74 (0,26-11,54)	0,564
	<i>E-selectina (rs5368) C>T</i>	1,71 (0,28-10,38)	0,561
	<i>ICAM-1 (rs1799969) G>A</i>	1,73 (0,25-11,89)	0,578
	<i>ICAM-1 (rs281432) G>C</i>	0,54 (0,06-4,66)	0,575
	<i>LIGHT (rs344560) G>A</i>	3,80 (0,24-60,04)	0,343
	<i>LIGHT (rs2291668) C>T</i>	1,44 (0,28-7,27)	0,660
	<i>VCAM (rs3176878) C>T</i>	0,94 (0,17-5,36)	0,947

Modelo 1: foram incluídos os grupos peso normal e obeso.

Modelo 2: foram incluídos os grupos sobrepeso e obeso.

4.3 Análise da expressão gênica

Foi realizada a análise da expressão dos genes LIGHT, CX3CR1, RAGE e ICAM-1 em **94** indivíduos, sendo 17 com peso normal, 30 com sobrepeso e 47 obesos.

Na **TABELA 10** e na **FIGURA 6**, estão representadas medianas e Percentil₂₅ – Percentil₇₅ da expressão relativa do mRNA dos genes acima citados nos grupos peso normal, sobrepeso e obeso.

Não houve diferença estatística na expressão gênica para LIGHT, RAGE e ICAM-1 ($p > 0,05$) entre os grupos estudados, mas foi significativa para CX3CR1 ($p = 0,020$).

Tabela 10 – Expressão relativa dos genes LIGHT, CX3CR1, RAGE e ICAM-1 em células do sangue periférico dos indivíduos com peso normal, com sobrepeso e obesos

Gene	GRUPOS			
	Normal (17)	Sobrepeso (30)	Obeso (47)	<i>P</i>
LIGHT	0,931(0,801-1,101)	1,029(0,823-1,135)	0,967(0,810-1,101)	0,738
CX3CR1	0,867(0,707-1,453) ^a	1,099(0,767-1,440) ^{a,b}	1,243(1,031-1,493) ^b	0,020
RAGE	1,031(0,778-1,165)	0,910(0,700-1,135)	1,056(0,815-1,590)	0,141
ICAM-1	0,933(0,786-1,234)	1,018(0,824-1,204)	1,035(0,853-1,181)	0,915

Nota: Número de indivíduos entre parênteses. Os indivíduos com $18,5 \leq \text{IMC} < 25\text{kg/m}^2$ foram classificados como peso normal, $25,0 \leq \text{IMC} < 30\text{kg/m}^2$ foram classificados como sobrepeso e $\text{IMC} \geq 30\text{kg/m}^2$ foram classificados como obesos (WHO, 2000). Variáveis contínuas são apresentadas através da mediana e Percentil₂₅ – Percentil₇₅ e foram comparadas utilizando o teste de Kruskal-Wallis para os 3 grupos.

Figura 6 – Representação gráfica por dispersão da expressão relativa do mRNA dos genes LIGHT, CX3CR1, RAGE e ICAM-1 em células do sangue periférico dos grupos peso normal, sobrepeso e obeso. NOTA: Variáveis contínuas foram comparadas utilizando o teste de Kruskal-Wallis para os 3 grupos

A **FIGURA 7** representa os valores da expressão dos genes LIGHT, CX3CR1, RAGE e ICAM-1, tendo como referência a expressão desses genes nos indivíduos com peso normal, demonstrando aumento da expressão dos genes CX3CR1, ICAM-1 e LIGHT no grupo sobrepeso. Quanto ao grupo dos obesos, a figura mostra que houve aumento da expressão LIGHT, CX3CR1, RAGE e ICAM-1 em relação ao grupo de peso normal.

Figura 7 – Representação gráfica da diferença de expressão do mRNA dos genes LIGHT, CX3CR1, RAGE e ICAM-1, tendo como referência a expressão gênica do grupo peso normal

4.3.1 *Análise utilizando o modelo de regressão logística univariada para as variáveis dependentes “ter sobrepeso corporal” e “ter obesidade”*

A expressão do gene CX3CR1 se mostrou relevante no aumento do risco de obesidade, em comparação com o grupo peso normal (OR: 4,24, IC95%: 1,27-14,08, $p= 0,018$), e a expressão do gene LIGHT mostrou tendência no aumento de peso em comparação com o grupo peso normal (OR: 3,17, IC95%: 0,92-10,96, $p= 0,069$).

Tabela 11 – Análise por Regressão Logística univariada para as variáveis dependentes “sobrepeso” (modelo 1) e “obeso” (modelo 2) em relação à expressão gênica

Modelos	Gene	OR (IC 95%)	P
1	LIGHT	3,17 (0,92-10,96)	0,069
	CX3CR1	1,60 (0,45-5,72)	0,469
	RAGE	0,59 (0,18-1,97)	0,393
	ICAM-1	1,13 (0,34-3,70)	0,846

2	<i>LIGHT</i>	1,60 (0,51-5,09)	0,422
	<i>CX3CR1</i>	4,24 (1,27-14,08)	0,018
	<i>RAGE</i>	1,10 (0,36-3,35)	0,866
	<i>ICAM-1</i>	1,17 (0,39-3,57)	0,777

Modelo 1: foram incluídos os grupos sobrepeso e peso normal.

Modelo 2: foram incluídos os grupos obeso e peso normal.

4.3.2 *Análise utilizando o modelo de regressão logística multinomial para as variáveis dependentes “ter peso normal” e “ter sobrepeso corporal”*

O modelo utilizado para análise da regressão logística multinomial foi com o um p valor ajustado através das variáveis glicose, colesterol total, insulina, PAI-1, IL-6, TNF- α , resistina, adiponectina, leptina, hábito de fumar, presença de DM2 e hipertensão. Não foram inseridas todas as variáveis estudadas, pois apresentaram alta correlação com algumas que haviam sido selecionadas; por esse motivo, caso fossem adicionadas todas as variáveis, o modelo não conseguiria ajustar-se devido à multicolinearidade.

Para essa análise, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) para a expressão dos genes estudados.

Tabela 12 – Regressão logística multinomial (modelo enter) para as variáveis dependentes “peso normal” (modelo 1) e “sobrepeso” (modelo 2) em relação à expressão gênica

Modelos	Variáveis Independentes	OR (IC 95%)	P
1	<i>LIGHT</i>	0,95 (0,85-1,06)	0,337
	<i>CX3CR1</i>	1,11 (0,98-1,25)	0,113
	<i>RAGE</i>	1,00 (0,95-1,06)	0,875
	<i>ICAM-1</i>	1,00 (1,00-1,00)	0,548
2	<i>LIGHT</i>	0,92 (0,84-1,02)	0,126
	<i>CX3CR1</i>	1,00 (0,94-1,08)	0,846
	<i>RAGE</i>	1,00 (0,96-1,04)	0,934
	<i>ICAM-1</i>	0,95 (0,87-1,04)	0,289

Nota: Os valores da expressão gênica foram utilizados na escala log.

Modelo 1: foram incluídos os grupos peso normal e obeso.
Modelo 2: foram incluídos os grupos sobrepeso e obeso.

4.3.3 Efeito dos polimorfismos na expressão gênica

Foi realizado o estudo de associação dos genótipos dos polimorfismos CD40 (*rs1883832*) C>T, CX3CR1 (*rs3732379*) C>T, CX3CR1 (*rs3732378*) G>A, E-selectina (*rs5368*) C>T, ICAM-1 (*rs1799969*) G>A, ICAM-1 (*rs281432*) C>G, LIGHT (*rs344560*) G>A, LIGHT (*rs2291668*) C>T, RAGE (*rs2070600*) G>A, RAGE (*rs2236493*) C>T e VCAM (*rs3176878*) C>T com a expressão gênica de LIGHT, CX3CR1, RAGE e ICAM-1 nos indivíduos dos grupos C, SP e OO, porém os polimorfismos LIGHT (*rs344560*) G>A, RAGE (*rs2070600*) G>A e RAGE (*rs2236493*) C>T não foram inseridos na análise devido algum grupo não ter número suficiente de indivíduos para que pudesse ser realizada a análise proposta.

Na **TABELA 13** e na **FIGURA 8**, verifica-se que os indivíduos do grupo peso normal portadores do genótipo GG para o polimorfismo ICAM-1 (*rs281432*) G>C apresentaram aumento da expressão de RAGE quando comparado com o genótipo CG+CC ($p= 0,023$). Para os demais grupos na análise do efeito do polimorfismo ICAM-1 (*rs281432*) G>C na expressão gênica, não houve diferença significativa.

Não houve diferença estatística para os demais polimorfismos estudados em nenhum dos dois grupos.

Tabela 13 – Análise de associação entre o polimorfismo ICAM-1 (*rs281432*) G>C, expressão dos genes LIGHT, CX3CR1, RAGE e ICAM-1 em indivíduos classificados como peso normal, sobrepeso e obesos

VARIÁVEL	ICAM-1 (<i>rs281432</i>) G>C Normal			ICAM-1 (<i>rs281432</i>) G>C Sobrepeso			ICAM-1 (<i>rs281432</i>) G>C Obeso		
	GG (7)	CG+CC (10)	<i>p</i>	GG (7)	CG+CC (23)	<i>p</i>	GG (10)	CG+CC (37)	<i>p</i>
LIGHT	0,17±0,06	0,15±0,04	0,414	0,15±0,04	0,16±0,04	0,321	0,15±0,04	0,16±0,04	0,451
CX3CR1	0,22±0,13	0,29±0,09	0,210	0,25±0,12	0,29±0,11	0,399	0,41±0,17	0,33±0,09	0,159
RAGE	0,0018±0,0006	0,0013±0,0003	0,023	0,0015±0,0006	0,0015±0,0008	0,960	0,0020±0,0008	0,0019±0,0012	0,896
ICAM-1	0,057±0,010	0,050±0,018	0,334	0,053±0,009	0,055±0,013	0,797	0,054±0,011	0,055±0,012	0,837

Nota: Número de indivíduos entre parênteses. Variáveis contínuas são apresentadas como média ± DP e comparadas por *Teste-t de Student*.

Figura 8 – Representação gráfica das associações dos polimorfismos com a expressão dos genes LGALS2, NFKB, ICAM1, LTA, LIGHT, VCAM1 e MMP9 e nos indivíduos dos grupos peso normal, sobrepeso e obeso

5. DISCUSSÃO

5.1 Fatores biodemográficos e análise laboratorial

A sociedade moderna tem desfrutado de melhora nas condições de vida, com acesso a alimentos, assistência médica, medicamentos, *laser*, cultura, transporte, entre outros diversos benefícios. Por outro lado, houve também mudanças no estilo de vida, levando ao aumento de ingestão de carboidratos e gorduras saturadas, sob a forma de alimentos processados, e, consequentemente, levando a outras alterações na saúde, como uma epidemia global de obesidade, estimada em cerca de 700 milhões de pessoas afetadas até 2015. De acordo com a OMS e a Associação Médica Americana (AMA), entre outras autoridades na área de saúde, a obesidade é considerada uma nova doença preocupante. Ademais, a ausência de uma definição de obesidade, única e largamente aceitável, leva os pesquisadores a estabelecerem como uma doença de natureza multifatorial e pouco entendida (Calder *et al.*, 2011).

Está bem estabelecido que a obesidade é o desequilíbrio entre a ingestão e o gasto energético por um longo período, principalmente com aumento de consumo de alimentos com alto conteúdo calórico, associado a estilo de vida sedentário. As variações entre os indivíduos têm sido estabelecidas como fatores genéticos ligados ao metabolismo energético. Estudos realizados desde a década de 1980 têm mostrado que os fatores genéticos contribuem de forma significativa no desenvolvimento da obesidade (Stunkard *et al.*, 1986; Stunkard *et al.*, 1990).

As manifestações de origem monogênicas são geralmente severas e precoces, além de facilmente diagnosticadas; no entanto, as formas mais comuns são as não-monogênicas; dificilmente se tem bem definidas as alterações genéticas e, portanto, estas são de difícil identificação. Recentemente, a obesidade tem sido associada com outros fatores, como a baixa qualidade do sono, a alteração da flora bacteriana intestinal ou o consumo inadequado de nutrientes que podem aumentar a susceptibilidade e o ganho de peso. Há, também, a obesidade relacionada com as complicações devido as mudanças epigenéticas (Cotillard *et al.*, 2013; Mesarwi *et al.*, 2013).

Dados epidemiológicos e experimentais vêm demonstrando relação importante entre a obesidade, as complicações metabólicas e a inflamação crônica. A inflamação de baixo grau do tecido adiposo (característica da obesidade) pode

ser devido às alterações epigenética, que ocorrem em resposta ao estilo de vida e aos outros fatores ambientais, que influenciam a estrutura da cromatina, os fatores de transcrição e os RNA não codificantes.

No presente estudo, procuramos avaliar, além dos marcadores inflamatórios bem estabelecidos para a obesidade, também outros, estudados em processos inflamatórios relacionados com desenvolvimento de aterosclerose e que não foram avaliados na obesidade, até o momento. Através de técnicas moleculares mais sensíveis e reprodutíveis (como RT-PCR), procuramos buscar associação com alguns dos marcadores inflamatórios solúveis no sangue periférico, com finalidade de sugerir novos biomarcadores moleculares.

O modelo experimental proposto foi de avaliar indivíduos com características fenotípicas, que identificam o indivíduo de peso normal, sobrepeso e obesos.

Os dados biodemográficos mostraram que os indivíduos obesos apresentaram fenótipos de interesse ao estudo, assim como a caracterização da obesidade sob o ponto de vista biométrico, como valores elevados de IMC, CA, RCQ e teor de gordura. De acordo com Flegal e colaboradores (2009), o percentual de gordura é significativamente mais correlacionado à CA do que o IMC nos homens. Nas mulheres, o IMC apresenta maior correlação com o percentual de gordura do que a CA.

A caracterização étnica não mostrou diferenças significativas entre brancos, pardos, negros e amarelos, lembrando que cada indivíduo se autodeclarou e que qualquer informação sobre raça, cor da pele ou etnia deve ser considerada com cautela no Brasil. Ressaltando, ainda, que a coleta de dados, bem como interpretação da informação, foram conduzidas dentro do apropriado contexto cultural e social (Gattas *et al.*, 2004).

A frequência de indivíduos obesos que pararam de fumar, na casuística avaliada, mostrou dados interessantes. A adesão de abandono foi de 24,1% nos obesos. Segundo Williamson e colaboradores (1991), os indivíduos que param de fumar ganham peso, em média, 2,8kg para os homens e 3,8kg para as mulheres, sendo que mais de 10% das pessoas ganham 13kg ou mais. Embora os mecanismos que levem ao ganho de peso após a suspensão do uso de cigarro não estejam bem compreendidos, acredita-se que o hábito de fumar pode aumentar a atividade adrenérgica, aumentando diretamente a termogênese e, dessa maneira,

reduzindo o peso (Lee *et al.*, 2006). Desta forma, a nicotina inalada através do uso de cigarro promove a elevação aguda da concentração de alguns neurotransmissores no cérebro, tais como dopamina e serotonina, que são substâncias que inibem a ingestão de alimentos (Chatkin e Chatkin, 2007).

Os indivíduos obesos avaliados apresentaram maior frequência de DM2 em relação aos indivíduos não obesos. Diversos estudos já relataram que o excesso de peso é um fator de risco estabelecido para DM2 (Pinkney, 2002; Daousi *et al.*, 2006; Gregg *et al.*, 2007). Entretanto, Zhang e colaboradores (2009) verificaram que o IMC elevado é somente um de muitos fatores que afetam o risco de DM2, sugerindo que outros fatores de risco devem ser estudados.

Um mecanismo que explica a relação entre obesidade e DM2 é o fato de os adipócitos de indivíduos obesos apresentarem perfil de secreção e função endócrina alterados, resultando no aumento da liberação de adipocinas e moléculas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6) (Sell, Dietze-Schroeder e Eckel, 2006), fazendo com que haja disfunção nas células- β , causando falha na liberação da insulina e aumento da glicemia (Kahn, Hull e Utzschneider, 2006). Essa disfunção das células β representa uma possível ligação entre obesidade e DM2 (Eckel *et al.*, 2011).

Os resultados do nosso estudo mostraram valores aumentados de insulina, glicose, hemoglobina glicada, HOMA- α e HOMA-IR em indivíduos obesos em comparação aos de peso normal.

Além de alta frequência de diabéticos melito tipo 2 no grupo de indivíduos obesos, foi também observada frequência maior de hipertensos e hipercolesterolêmicos. Em um estudo realizado nos Estados Unidos, com indivíduos do MESA (*Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis*), foi constatado que o estado de obesidade e inflamação está fortemente associado ao risco de hipertensão (Lakoski *et al.*, 2011). Essa associação entre obesidade e hipertensão ocorre por 3 motivos: disfunção do tecido adiposo, ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona e disfunção endotelial (Rahmouni *et al.*, 2005).

A hiperglicemia observada em indivíduos obesos se associa às concentrações séricas mais elevadas de triglicerídeos, que foram observadas nos obesos. Em estudo realizado anteriormente pelo nosso grupo, ficou demonstrado que a chance de um indivíduo obeso apresentar valores elevados de triglicerídeos é três vezes maior do que os de peso normal (Hinuy, 2004). Em nosso estudo,

observamos diferenças significantes entre os valores de HDL-C, VLDL-C, triacilglicerol e apo B, caracterizando aumento de risco cardiovascular demonstrado pelo perfil mais aterogênico dos lipídeos plasmáticos.

No estudo realizado por Kahn e Valdez (2003), observou-se que 9.183 indivíduos norte-americanos brancos, negros, hispânicos e de outras etnias, com elevadas medidas de cintura combinadas com altas concentrações de triglicerídeos, exibiam hiperinsulinemia, hiperglicemia, menores concentrações de HDL-C, concentrações mais elevadas de apo B e maior risco para DM2.

A concentração de apolipoproteína B elevada em indivíduos obesos influencia as concentrações séricas de colesterol, pois a apo B é a principal componente proteica da lipoproteína de baixa densidade e é responsável pelo transporte de colesterol para os tecidos (Sierra-Johnson *et al.*, 2006). No estudo realizado por Panagiotakos e colaboradores (2008), demonstrou-se que a apo B foi significativamente correlacionada com hipercolesterolemia, o que foi observado também no presente estudo.

A obesidade caracteriza-se como doença inflamatória crônica de baixo grau (Yudkin *et al.*, 1999; Das, 2001; Festa *et al.*, 2001; Engstrom *et al.*, 2003). A base que sustenta essa afirmação é a alteração nas concentrações dos marcadores inflamatórios circulantes, que estão aumentadas, tanto as citocinas pró-inflamatórias como as proteínas de fase aguda, na obesidade – estes marcadores incluem IL-6, TNF- α , proteína C-reativa (PCR) e outros (Das, 2001; Bulló *et al.*, 2003).

As quantificações dos marcadores inflamatórios consagrados foram realizadas, tais como PCRus, Fibrinogênio, PAI-1, IL-6 e TNF- α ; também foram realizadas as dosagens de algumas adipocinas (leptina, adiponectina e resistina).

A PCR apresentou aumento significativo nos obesos, quando comparados com os de peso normal, caracterizando positivamente o marcador clássico de inflamação sistêmica. Esta proteína é produzida principalmente pelo fígado, sob a estimulação de citocinas pró-inflamatórias que são provenientes dos adipócitos (Pepys e Hirschfield, 2003). Fronczyk e colaboradores (2013) demonstraram que as concentrações da PCR estão aumentadas em obesos com DM2 e que esse resultado é devido ao excesso de gordura corporal. Os dados do nosso estudo concordam com os resultados de estudos anteriores.

A hiperleptinemia também foi observada nos indivíduos obesos, sendo atribuída às alterações no receptor de leptina ou à deficiência em seu sistema de transporte, na barreira hematoencefálica, fenômeno denominado resistência à leptina, o qual pode ser um fator de risco ainda maior para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e hipertensão (Ihara *et al.*, 2006; Romero e Zanesco, 2006). A retroalimentação negativa é interrompida na maioria dos obesos, resultando na resistência à leptina que ocorre em resposta à sinalização em excesso – que é um mecanismo clássico de resistência ao hormônio (Knight *et al.*, 2010).

Resultados da determinação de leptina mostraram associação com a obesidade, estabelecendo a importância deste marcador bioquímico. Estudos realizados em uma população coreana (Yun *et al.*, 2010), em voluntários libaneses (Gannage-Yared *et al.*, 2006) e com uma população de tailandeses mostraram que a leptina no soro foi associada com a síndrome metabólica (Suriyaprom, Tungtrongchitr e Thawnasom, 2014). Stepien e colaboradores (2012) demonstraram, em seu estudo, que a resistência à insulina e à leptina pode ser fisiopatologicamente importante em pacientes hipertensos com obesidade grave. Os resultados encontrados no presente estudo estão de acordo com os relatados na literatura, inclusive em outras populações etnicamente diferentes.

A adiponectina foi uma das adipocinas utilizada para avaliar o perfil inflamatório dos indivíduos estudados. Este marcador é secretado exclusivamente pelo tecido adiposo (Scherer *et al.*, 1995), tendo papel na regulação da homeostase da energia e funciona em combinação com a leptina (Yamauchi *et al.*, 2001). A concentração circulante dessa adipocina encontra-se diminuída na obesidade, na DM2 e na resistência à insulina, porém a hipoadiponectinemia é mais relacionada com a resistência à insulina do que com o grau de adiposidade (Weyer *et al.*, 2001). Em nosso estudo, as concentrações de adiponectina foram maiores no grupo dos obesos, porém os indivíduos com peso normal apresentaram valores maiores do que os com sobrepeso, o que pode ser explicado parcialmente pelos diferentes tipos de medicação que os obesos possam estar utilizando, principalmente as estatinas.

A resistina é uma proteína também muito utilizada para avaliação da obesidade em muitos estudos (Silha *et al.*, 2003; Gürsoy *et al.*, 2012; Stepien *et al.*, 2012), sendo recentemente descoberta em ratos e expressa nos adipócitos, como

um antagonista à ação da insulina, ligando, dessa maneira, a obesidade com o diabetes (Steppan *et al.*, 2001); ou seja, sua função está relacionada com a homeostase da glicose e à resistência à insulina em indivíduos diabéticos (El-Shal, Pasha e Rashad, 2013). Em uma pesquisa realizada com pacientes diagnosticados com obesidade mórbida, a concentração sérica de resistina foi positivamente associada com o IMC elevado (Vendrell *et al.*, 2004) – dados semelhantes com os nossos resultados.

Além das adipocinas (adiponectina, leptina e resistina), o tecido adiposo é responsável pela secreção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral- (TNF-) e a interleucina-6 (IL-6) (Hotamisligil, 2006; Tilg e Moschen, 2006).

No presente estudo, os indivíduos obesos apresentaram concentrações séricas de TNF- e IL-6 mais elevadas do que aqueles com peso normal, caracterizando compatibilidade com estudos realizados por outros autores.

Hotamisligil e colaboradores (1993) foram um dos primeiros a descrever a ligação entre obesidade e inflamação, estabelecendo uma correlação positiva entre a massa adiposa e a expressão do gene fator de necrose tumoral- (TNF-). Estudos realizados com obesos demonstraram que a perda de peso excessiva diminui TNF- e IL-6 e aumenta adiponectina no tecido adiposo (Dandona *et al.*, 1998; Fontana *et al.*, 2007; Moschen *et al.*, 2010).

Outro marcador sérico avaliado neste estudo foi o inibidor do plasminogênio ativado-1 (PAI-1). Alguns estudos mostraram que concentrações elevadas estão associadas com obesidade e síndrome metabólica (Alessi *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2013; Kenny *et al.*, 2013). Um estudo com 145 mulheres, com idade superior a 40 anos, realizado no sul do Brasil, demonstrou uma correlação positiva entre os valores de PAI-1 e RCQ e os de triglicérides (De Souza *et al.*, 2012).

Os dados obtidos na literatura, com relação ao estado inflamatório da obesidade, mostraram similaridade com os resultados achados em nossa pesquisa.

5.2 Polimorfismos e expressão gênica

Os polimorfismos e a expressão dos genes estudados não apresentaram diferenças estatísticas, entre obesos, sobrepesos e normais. Estes resultados nos surpreenderam, uma vez que a literatura mostra associação na maioria dos genes

avaliados neste estudo. O resultado pode ser explicado pelo número baixo de indivíduos avaliados, apesar de estatisticamente ser considerado adequado pela frequência dos genótipos citados na literatura. A ausência da associação aqui encontrada não deve levar a uma interpretação final nem invalidar o estudo, pois pode ser que, nesta população, este seja o resultado real. A expressão do CX3CR1 demonstrou estar aumentada em indivíduos obesos – o que ainda não tem sido descrito na literatura consultada.

O CX3CR1 é um receptor da fractalcina (CX3CL1), sendo uma quimiocina que desempenha papel na sinalização de leucócitos e na sua migração para locais de inflamação, modulando as ações de células imunocompetentes em doenças inflamatórias (Imai *et al.*, 1997; Combadiere *et al.*, 1998). Um estudo realizado com 900 franco-canadenses, em pacientes obesos ($\text{IMC} \geq 30\text{kg/m}^2$) e não obesos ($\text{IMC} < 30\text{kg/m}^2$), nos polimorfismos V249I (rs3732379) e T280M (rs3732378) do CX3CR1, mostrou associação desses com obesidade (Sirois-Gagnon *et al.*, 2011).

Em nossos resultados, não verificamos associação dos mesmos polimorfismo com obesidade; isso pode ter ocorrido pela diversidade genética presente em nosso país, devido ao número de indivíduos ser bem menor que o estudo canadense e também pelos critérios que adotamos em nosso estudo, de acordo com OMS, em que são classificados os indivíduos com $18,5 \leq \text{IMC} < 25\text{kg/m}^2$ como peso normal, $25,0 \leq \text{IMC} < 30\text{kg/m}^2$ como sobrepeso e $\text{IMC} \geq 30\text{kg/m}^2$ como obesos (WHO, 2000). Apesar de não verificarmos associação dos polimorfismos, houve associação da expressão mRNA do CX3CR1 com obesidade em nosso estudo.

O receptor do produto final de glicação avançada (RAGE) é um membro multiligante da superfamília das imunoglobulinas de proteínas da superfície celular, cujas variantes genéticas foram associadas às complicações de várias doenças, tais como aterosclerose, processos inflamatórios, diabetes e doença de Alzheimer (Hudson *et al.*, 2002; Kalea, Schmidt e Hudson, 2009). Estudo realizado com o polimorfismo RAGE Gly82Ser (rs2070600), em uma população coreana, de homens com idades entre 30 e 70 anos, mostrou que o alelo S pode ser mais estreitamente associado com a resposta pró-inflamatória em condições de obesidade, em relação aos não obesos, ou seja, pessoas obesas que são

homozigotas S/S em *RAGE* Gly82Ser podem ter respostas pró-inflamatórias mais elevadas do que as não obesas (Kim *et al.*, 2009).

Os resultados obtidos em nosso estudo, de associação dos polimorfismos *RAGE* (rs2070600 e rs2236493) e da expressão desse mesmo gene com obesidade, não demonstraram associação com a população estudada.

O ICAM-1 é uma molécula de adesão transmembrana, sendo ativada por células endoteliais, leucócitos, fibroblastos e células musculares lisas, responsável por promover a adesão de neutrófilos, monócitos e linfócitos, e apresenta valores plasmáticos aumentados em pacientes com síndrome coronária aguda (SCA) (Alwi, 2008). Pesquisa realizada com o polimorfismo *ICAM-1* (rs281432) G>C em diabetes melito tipo 1, em uma população sueca, indicou associação com o desenvolvimento de DM1 e frequência elevada de heterozigotos (Ma *et al.*, 2006).

Esse polimorfismo, *ICAM-1* (rs281432) G>C, também apresentou frequência elevada de heterozigotos (52,3%) em nossa pesquisa e foi associado à presença do genótipo CG+CC com o aumento da expressão do *RAGE* em indivíduos com peso normal – porém, não foi verificada associação dele com obesidade. Com outro polimorfismo *ICAM-1* (rs1799969) G>A do estudo não se verificou sua relação com obesidade, assim como a expressão do *ICAM-1* não foi associada à obesidade.

Diversos estudos realizados com *CD40* (rs1883832) C>T mostraram sua associação com SCA e que este polimorfismo participa da regulação da expressão do *CD40* (Tian *et al.*, 2008; Tian *et al.*, 2010; Wang, Ming *et al.*, 2011). Este SNP localiza-se na região 5'UTR na posição -1 da sequência de consenso de Kozak do gene *CD40*, que é uma sequência de reconhecimento curta, que facilita a ligação inicial do mRNA para a pequena subunidade ribossomal (Kozak, 1986). Porém, o polimorfismo *CD40* (rs1883832) C>T estudado não apresentou associação com a obesidade, apesar de alguns estudos mostrarem ligação com SCA e essa doença ser uma comorbidade da obesidade (Tian *et al.*, 2008; Tian *et al.*, 2010).

A avaliação da associação do polimorfismo *E-selectina* (rs5368) C>T com obesidade não apresentou significância estatística com a obesidade. A *E-selectina* é uma glicoproteína de superfície celular expressa em células endoteliais após ativação de citocinas, sendo uma molécula de adesão da família das

selectinas e responsável pela regulação da adesão dos leucócitos ao endotélio (Binns *et al.*, 1996; Abu-Amero *et al.*, 2006).

Neste estudo, a expressão de E-selectina não foi realizada porque células mononucleares do sangue periférico não expressam este gene ou, se expressam, as quantidades são tão pequenas que não podem ser quantificadas.

O polimorfismo VCAM (rs3176787) C>T não apresentou associação com a obesidade. Este gene é ativado por células endoteliais e células musculares lisas, que se ligam aos monócitos e linfócitos T ativados e, assim como ICAM-1, seus valores plasmáticos são mais altos em indivíduos com SCA (Alwi, 2008). Apesar de existirem estudos que mostram ligação do VCAM com SCA e de essa doença ser uma comorbidade da obesidade, os nossos resultados não mostraram associação com a obesidade.

O gene LIGHT codifica uma proteína transmembrana tipo II, sendo expressa em vários tecidos humanos, e fortemente expressa em células T ativadas, células B e monócitos (Del Rio *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011). Este gene é promotor da aterogênese, através da indução de citocinas pró-inflamatórias e metaloproteinases (MMPs) em macrófagos e células endoteliais, é responsável pela expressão de moléculas de adesão e também regula a homeostase lipídica (Kim *et al.*, 2008; Sandberg *et al.*, 2009). Os nossos resultados para o estudo dos polimorfismos *LIGHT* (rs344560) G>A e *LIGHT* (rs2291668) C>T não mostraram associação com a obesidade, assim como na expressão do *LIGHT* também não foi verificada ligação com a obesidade.

Apesar de algumas limitações, o nosso estudo sugere que a expressão do CX3CR1 foi significativamente associada com o aumento de risco da obesidade. Porém, os resultados apresentados pelos polimorfismos dos genes CD40, CX3CR1, *E-selectina*, *ICAM-1*, *LIGHT*, *RAGE* e *VCAM* não demonstraram associação com a população de obesos selecionada. Isso pode ter ocorrido devido ao número amostral pequeno, pela classificação adotada para fazer as análises e também pela diversidade genética que ocorre em nosso país.

6. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Este estudo não encontrou associação dos mesmos polimorfismos com obesidade; isso pode ter ocorrido pela diversidade genética presente em nosso país, pelo número amostral pequeno – o que pode ter diminuído a detecção de pequenas diferenças entre os grupos – e também pela classificação que adotamos em nosso estudo, que entendeu os indivíduos com $18,5 \leq \text{IMC} < 25\text{kg/m}^2$ como peso normal, com $25,0 \leq \text{IMC} < 30\text{kg/m}^2$ como sobrepeso e com $\text{IMC} \geq 30\text{kg/m}^2$ como obesos (WHO, 2000).

7. CONCLUSÕES

- Não houve associação dos polimorfismos *CD40* (rs1883832) C>T, *CX3CR1* (rs3732379) C>T, *CX3CR1* (rs3732378) G>A, *E-selectina* (rs5368) C>T, *ICAM-1* (rs1799969) G>A, *ICAM-1* (rs281432) C>G, *LIGHT* (rs344560) G>A, *LIGHT* (rs2291668) C>T, *RAGE* (rs2070600) G>A, *RAGE* (rs2236493) C>T e *VCAM* (rs3176878) C>T com a obesidade.
- Houve associação da expressão do gene *CX3CR1* com a obesidade.
- Houve associação do polimorfismo *ICAM-1* (rs281432) G>C com a expressão do gene *RAGE* em indivíduos de peso normal.

BIBLIOGRAFIA

ABRANTES, M. M.; LAMOUNIER, J. A.; COLOSIMO, E. A. [Overweight and obesity prevalence in Northeast and Southeast Regions of Brazil]. **Rev Assoc Med Bras**, v. 49, n. 2, p. 162-6, 2003 Apr-Jun 2003. ISSN 0104-4230. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12886393> >.

ABU-AMERO, K. K. et al. E-selectin S128R polymorphism and severe coronary artery disease in Arabs. **Bmc Medical Genetics**, v. 7, Jun 6 2006. ISSN 1471-2350. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000239072500001 >.

ALESSI, M. C. et al. Plasminogen activator inhibitor 1, transforming growth factor-beta1, and BMI are closely associated in human adipose tissue during morbid obesity. **Diabetes**, v. 49, n. 8, p. 1374-80, Aug 2000. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10923640> >.

ALWI, I. Serum adhesion molecule levels in acute coronary syndrome among Indonesian patients. **Acta Med Indones**, v. 40, n. 3, p. 135-8, Jul 2008. ISSN 0125-9326. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18845851> >.

ANGELI, C. B. **Susceptibilidade Genética e Outros Fatores de Risco Associados ao Sobrepeso e à Obesidade em Populações Afro-descendentes do Vale do Ribeira-SP**. 2008. 212 Departamento de Genética e Biologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

ARORA, S.; ANUBHUTI. Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity--a review. **Neuropeptides**, v. 40, n. 6, p. 375-401, Dec 2006. ISSN 0143-4179. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16935329> >.

AUKRUST, P. et al. Enhanced levels of soluble and membrane-bound CD40 ligand in patients with unstable angina. Possible reflection of T lymphocyte and platelet involvement in the pathogenesis of acute coronary syndromes. **Circulation**, v. 100, n. 6, p. 614-20, Aug 1999. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10441098> >.

BAN, Y. et al. Association of a C/T single-nucleotide polymorphism in the 5' untranslated region of the CD40-gene with Graves' disease in Japanese. **Thyroid**, v. 16, n. 5, p. 443-446, May 2006. ISSN 1050-7256. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000238443500004 >.

BERG, A. H.; SCHERER, P. E. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. **Circulation Research**, v. 96, n. 9, p. 939-949, May 13 2005. ISSN 0009-7330. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000229057400005 >.

BERGHOEFER, A. et al. Obesity prevalence from a European perspective: a systematic review. **Bmc Public Health**, v. 8, Jun 5 2008. ISSN 1471-2458. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000257165000002 >.

BINNS, R. M. et al. In vivo E-selectin upregulation correlates early with infiltration of PMN, later with PBL entry: MAbs block both. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 270, n. 1, p. H183-H193, Jan 1996. ISSN 0363-6135. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1996TV39100024 >.

BRAKE, D. K. et al. ICAM-1 expression in adipose tissue: effects of diet-induced obesity in mice. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 291, n. 6, p. C1232-C1239, Dec 2006. ISSN 0363-6143. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000241992000016 >.

BULLÓ, M. et al. Systemic inflammation, adipose tissue tumor necrosis factor, and leptin expression. **Obes Res**, v. 11, n. 4, p. 525-31, Apr 2003. ISSN 1071-7323. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12690081> >.

BURACZYNSKA, M. et al. The intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) gene polymorphism K469E in end-stage renal disease patients with cardiovascular disease. **Hum Immunol**, May 2012. ISSN 1879-1166. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22609477> >.

BUSTIN, S. A.; MUELLER, R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. **Clinical Science**, v. 109, n. 4, p. 365-379, Oct 2005. ISSN 0143-5221. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000232567400003 >.

CALDER, P. C. et al. Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. **British Journal of Nutrition**, v. 106, p. S1+, Dec 2011. ISSN 0007-1145. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000298112400001 >.

CHAGNON, Y. C. et al. The human obesity gene map: the 2002 update. **Obes Res**, v. 11, n. 3, p. 313-67, Mar 2003. ISSN 1071-7323. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12634430> >.

CHATKIN, R.; CHATKIN, J. M. Tabagismo e variação ponderal: a fisiopatologia e genética podem explicar esta associação? **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 33, n. 6, p. 712-719, 2007-12 2007. ISSN 1806-3713. Disponível em: < <Go to ISI>://SCIELO:S1806-37132007000600016 >.

CLEMENT, K. et al. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. **Nature**, v. 392, n. 6674, p. 398-401, Mar 26 1998. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000072713600054 >.

COMBADIERE, C. et al. Identification of CX3CR1. A chemotactic receptor for the human CX3C chemokine fractalkine and a fusion coreceptor for HIV-1. **J Biol Chem**, v. 273, n. 37, p. 23799-804, Sep 1998. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9726990> >.

CONSIDINE, R. V. et al. Serum immunoreactive leptin concentrations in normal-weight and obese humans. **New England Journal of Medicine**, v. 334, n. 5, p. 292-295, Feb 1 1996. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1996TV69500003 >.

CONSTANTIN, A. et al. Leptin G-2548A and leptin receptor Q223R gene polymorphisms are not associated with obesity in Romanian subjects. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 391, n. 1, p. 282-6, Jan 2010. ISSN 1090-2104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19913498> >.

CONSULTATION, W. H. O.; WHO. **Obesity and overweight**. ORGANIZATION, W. H. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> 2012.

COTILLARD, A. et al. Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. **Nature**, v. 500, n. 7464, p. 585+, Aug 29 2013. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000323625900036 >.

CROFT, M. Co-stimulatory members of the TNFR family: Keys to effective T-cell immunity? **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 8, p. 609-620, Aug 2003. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000184557500010 >.

DANDONA, P. et al. Tumor necrosis factor-alpha in sera of obese patients: Fall with weight loss. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 83, n. 8, p. 2907-2910, Aug 1998. ISSN 0021-972X; 1945-7197. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000075265300048 >.

DAOUSI, C. et al. Prevalence of obesity in type 2 diabetes in secondary care: association with cardiovascular risk factors. **Postgraduate Medical Journal**, v. 82, n. 966, p. 280-284, Apr 2006. ISSN 0032-5473. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000236582700011 >.

DAS, U. N. Is obesity an inflammatory condition? **Nutrition**, v. 17, n. 11-12, p. 953-66, 2001 Nov-Dec 2001. ISSN 0899-9007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11744348> >.

DE SOUZA, C. I. et al. Association of adipokines and adhesion molecules with indicators of obesity in women undergoing mammography screening. **Nutrition & Metabolism**, v. 9, Oct 31 2012. ISSN 1743-7075. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000313242200001 >.

DEL RIO, M. L. et al. HVEM/LIGHT/BTLA/CD160 cosignaling pathways as targets for immune regulation. **J Leukoc Biol**, v. 87, n. 2, p. 223-35, Feb 2010. ISSN 1938-3673. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20007250> >.

DO PRADO, W. L. et al. Obesidade e Adipocinas Inflamatórias: Implicações Práticas para a Prescrição de Exercício. **Rev Bras Med Esporte**, v. 15, p. 6, 2009.

DOUGKAS, A. et al. The impact of obesity-related SNP on appetite and energy intake. **Br J Nutr**, v. 110, n. 6, p. 1151-6, Sep 2013. ISSN 1475-2662. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23433430> >.

DU, T. et al. Increasing trends in central obesity among Chinese adults with normal body mass index, 1993-2009. **Bmc Public Health**, v. 13, Apr 10 2013. ISSN 1471-2458. Disponível em: < [Go to ISI>://WOS:000317778300001](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23433430) >.

ECKEL, R. H. et al. Obesity and type 2 diabetes: what can be unified and what needs to be individualized? **J Clin Endocrinol Metab**, v. 96, n. 6, p. 1654-63, Jun 2011. ISSN 1945-7197. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21602457> >.

EL-SHAL, A. S.; PASHA, H. F.; RASHAD, N. M. Association of resistin gene polymorphisms with insulin resistance in Egyptian obese patients. **Gene**, v. 515, n. 1, p. 233-238, Feb 15 2013. ISSN 0378-1119. Disponível em: < [Go to ISI>://WOS:000314559400035](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23433430) >.

ENGSTROM, G. et al. Inflammation-sensitive plasma proteins are associated with future weight gain. **Diabetes**, v. 52, n. 8, p. 2097-2101, Aug 2003. ISSN 0012-1797. Disponível em: < [Go to ISI>://WOS:000184414200028](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23433430) >.

ESTEGHAMATI, A. et al. Third national surveillance of risk factors of non-communicable diseases (SuRFNCD-2007) in Iran: methods and results on prevalence of diabetes, hypertension, obesity, central obesity, and dyslipidemia. **Bmc Public Health**, v. 9, May 29 2009. ISSN 1471-2458. Disponível em: < [Go to ISI>://WOS:000268086000001](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23433430) >.

FAROOQI, I. S. Genetic, molecular and physiological insights into human obesity. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 41, n. 4, p. 451-455, Apr 2011. ISSN 0014-2972. Disponível em: < [Go to ISI>://WOS:000288215100014](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23433430) >.

FERREIRA, M. G. et al. Acurácia da circunferência da cintura e da relação cintura/quadril como preditores de dislipidemias em estudo transversal de doadores de sangue de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 2, p. 307-314, 2006-02 2006. ISSN 0102-311X. Disponível em: < [Go to ISI>://SCIELO:S0102-311X2006000200008](http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0102-311X2006000200008) >.

FESTA, A. et al. The relation of body fat mass and distribution to markers of chronic inflammation. **International Journal of Obesity**, v. 25, n. 10, p. 1407-1415, Oct 2001. ISSN 0307-0565. Disponível em: < [Go to ISI>://WOS:000171515800003](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23433430) >.

FLASO. Consenso Latino Americano Sobre Obesidade. IV Congreso Latinoamericano de Obesidad Y Transtornos Alimentarios, 1998, Montevideo (Uruguay).

FLEGAL, K. M. et al. Comparisons of percentage body fat, body mass index, waist circumference, and waist-stature ratio in adults. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 89, n. 2, p. 500-508, Feb 1 2009. ISSN 0002-9165. Disponível em: < [Go to ISI>://WOS:000262608700006](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23433430) >.

FLIER, J. S. et al. Severely impaired adiponin expression in genetic and acquired obesity. **Science**, v. 237, n. 4813, p. 405-8, Jul 1987. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3299706> >.

FONTANA, L. et al. Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. **Diabetes**, v. 56, n. 4, p. 1010-1013, Apr 2007. ISSN 0012-1797. Disponível em: < [Go to ISI>://WOS:000245697200013](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17038567) >.

FRANSEN, R. et al. Obesity and dyslipidemia. **Med Clin North Am**, v. 95, n. 5, p. 893-902, Sep 2011. ISSN 1557-9859. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21855698> >.

FRIEDMAN, W.T.; FREDRICK, D.S.; LEVY, R. I. ESTIMATION OF CONCENTRATION OF LOW-DENSITY LIPOPROTEIN CHOLESTEROL IN PLASMA, WITHOUT USE OF PREPARATIVE ULTRACENTRIFUGE. **Clinical Chemistry**, v. 18, n. 6, p. 499-504, 1972. ISSN 0009-9147. Disponível em: < [Go to ISI>://WOS:A1972M604800001](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7125001) >.

FRONCZYK, A. et al. Increased Concentration of C-Reactive Protein in Obese Patients with Type 2 Diabetes Is Associated with Obesity and Presence of Diabetes but Not with Macrovascular and Microvascular Complications or Glycemic Control. **Inflammation**, Oct 2013. ISSN 1573-2576. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24197824> >.

FRÜHBECK, G. et al. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 280, n. 6, p. E827-47, Jun 2001. ISSN 0193-1849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11350765> >.

GAENS, K. H. J. et al. Association of Polymorphism in the Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) Gene with Circulating RAGE Levels. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 94, n. 12, p. 5174-5180, Dec 2009. ISSN 0021-972X. Disponível em: < [Go to ISI>://WOS:000272379400076](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19900076) >.

GANNAGE-YARED, M.-H. et al. Serum adiponectin and leptin levels in relation to the metabolic syndrome, androgenic profile and somatotrophic axis in healthy non-diabetic elderly men. **European Journal of Endocrinology**, v. 155, n. 1, p. 167-176, Jul 2006. ISSN 0804-4643. Disponível em: < [Go to ISI>://WOS:000239209900023](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16700023) >.

GATTAS, G. J. F. et al. Ethnicity and glutathione S-transferase (GSTM1/GSTT1) polymorphisms in a Brazilian population. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 4, p. 451-458, Apr 2004. ISSN 0100-879X. Disponível em: < [Go to ISI>://WOS:000221046000002](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15000002) >.

GRANGER, S. W.; RICKERT, S. LIGHT-HVEM signaling and the regulation of T cell-mediated immunity. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 14, n. 3-4, p. 289-296, Jun-Aug 2003. ISSN 1359-6101. Disponível em: < [Go to ISI>://WOS:000183679400010](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12500010) >.

GREGG, E. W. et al. The relative contributions of different levels of overweight and obesity to the increased prevalence of diabetes in the United States: 1976-2004. **Preventive Medicine**, v. 45, n. 5, p. 348-352, Nov 2007. ISSN 0091-7435. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000251563000008 >.

GÜRSOY, G. et al. Relation of resistin with obesity and some cardiovascular risk factors in hypertensive women. **J Res Med Sci**, v. 17, n. 5, p. 443-7, May 2012. ISSN 1735-1995. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23626608> >.

HENEGAR, C. et al. Adipose tissue transcriptomic signature highlights the pathological relevance of extracellular matrix in human obesity. **Genome Biology**, v. 9, n. 1, 2008. ISSN 1474-760X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000253779800022 >.

HINUY, H. M. **Avaliação de regiões hipervariáveis de genes que predisõem à obesidade**. 2004. Departamento de Análises clínicas e Toxicológicas, Universidade de São Paulo

HINUY, H. M. et al. Relationship between variants of the leptin gene and obesity and metabolic biomarkers in Brazilian individuals. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 54, n. 3, p. 282-288, Apr 2010. ISSN 0004-2730. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000278067300006 >.

HOFFMANN, R. A wiki for the life sciences where authorship matters. **Nature Genetics**, v. 40, n. 9, p. 1047-1051, Sep 2008. ISSN 1061-4036. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000258761200013 >.

HOFMANN, M. A. et al. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: A central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. **Cell**, v. 97, n. 7, p. 889-901, Jun 25 1999. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000081162800010 >.

HORNUNG, M. et al. The CD40 TRAF family member interacting motif carries the information to rescue WEHI 231 cells from anti-IgM-induced growth arrest. **European Journal of Immunology**, v. 28, n. 11, p. 3812-3823, Nov 1998. ISSN 0014-2980. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000076985600042 >.

HOSSAIN, P.; KAWAR, B.; NAHAS, M. E. Obesity and diabetes in the developing world - A growing challenge. **New England Journal of Medicine**, v. 356, n. 3, p. 213-215, Jan 18 2007. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000243488100003 >.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 860-7, Dec 2006. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17167474> >.

HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. ADIPOSE EXPRESSION OF TUMOR-NECROSIS-FACTOR-ALPHA - DIRECT ROLE IN OBESITY-LINKED INSULIN RESISTANCE. **Science**, v. 259, n. 5091, p. 87-91, Jan 1 1993. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1993KE60100035 >.

HUDSON, B. I. et al. Glycation and diabetes: The RAGE connection. **Current Science**, v. 83, n. 12, p. 1515-1521, Dec 25 2002. ISSN 0011-3891. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000180238800020 >.

IBGE. **Pesquisa de Orçamentos Familiares - POF**. 2011.

IHARA, S. et al. An alpha1-receptor blocker reduces plasma leptin levels in hypertensive patients with obesity and hyperleptinemia. **Hypertens Res**, v. 29, n. 10, p. 805-11, Oct 2006. ISSN 0916-9636. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17283868> >.

IMAI, T. et al. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. **Cell**, v. 91, n. 4, p. 521-30, Nov 1997. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9390561> >.

IRIZARRY, K. et al. Single nucleotide polymorphism identification in candidate gene systems of obesity. **Pharmacogenomics J**, v. 1, n. 3, p. 193-203, 2001. ISSN 1470-269X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11908756> >.

ITO, S. et al. Increased plasma sphingosine-1-phosphate in obese individuals and its capacity to increase the expression of plasminogen activator inhibitor-1 in adipocytes. **Coronary Artery Disease**, v. 24, n. 8, p. 642-650, Dec 2013. ISSN 0954-6928; 1473-5830. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000326972000004 >.

JAMES, W. P. T. The epidemiology of obesity: the size of the problem. **Journal of Internal Medicine**, v. 263, n. 4, p. 336-352, Apr 2008. ISSN 0954-6820; 1365-2796. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000253759900002 >.

JIANG, H. et al. C/T polymorphism of the intercellular adhesion molecule-1 gene (exon 6, codon 469). A risk factor for coronary heart disease and myocardial infarction. **International Journal of Cardiology**, v. 84, n. 2-3, p. 171-177, Aug 2002. ISSN 0167-5273. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000177321600008 >.

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**, v. 40, n. 3, p. 15, 2004.

KAHN, H. S.; VALDEZ, R. Metabolic risks identified by the combination of enlarged waist and elevated triacylglycerol concentration. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 78, n. 5, p. 928-934, Nov 2003. ISSN 0002-9165. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000186146500007 >.

KAHN, S. E.; HULL, R. L.; UTZSCHNEIDER, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 840-846, Dec 14 2006. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000242805400040 >.

KALEA, A. Z.; SCHMIDT, A. M.; HUDSON, B. I. RAGE: a novel biological and genetic marker for vascular disease. **Clinical Science**, v. 116, n. 7-8, p. 621-637, Apr 2009. ISSN 0143-5221. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000264911500008 >.

KANG, Y. S. Obesity Associated Hypertension: New Insights into Mechanism. **Electrolyte Blood Press**, v. 11, n. 2, p. 46-52, Dec 2013. ISSN 1738-5997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24627704> >.

KENNY, S. et al. Gastric Expression of Plasminogen Activator Inhibitor (PAI)-1 Is Associated with Hyperphagia and Obesity in Mice. **Endocrinology**, v. 154, n. 2, p. 718-726, Feb 2013. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000313959800017 >.

KIM, C. S. et al. Prevalence, awareness, and management of obesity in Korea: data from the Korea national health and nutrition examination survey (1998-2011). **Diabetes Metab J**, v. 38, n. 1, p. 35-43, Feb 2014. ISSN 2233-6079. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24627826> >.

KIM, H.-M. et al. LIGHT/TNFSF14 enhances adipose tissue inflammatory responses through its interaction with HVEM. **Febs Letters**, v. 585, n. 3, p. 579-584, Feb 4 2011. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000286657700022 >.

KIM, O. Y. et al. G allele at RAGE SNP82 is associated with proinflammatory markers in obese subjects. **Nutrition Research**, v. 29, n. 2, p. 106-113, Feb 2009. ISSN 0271-5317. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000264596700006 >.

KIM, W. J. et al. Comparative analysis of the expression patterns of various TNFSF/TNFRSF in atherosclerotic plaques. **Immunol Invest**, v. 37, n. 4, p. 359-73, 2008. ISSN 1532-4311. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18569075> >.

KINTSCHER, U. et al. T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue - A primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v. 28, n. 7, p. 1304-1310, Jul 2008. ISSN 1079-5642. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000256890400020 >.

KLOK, M. D.; JAKOBSDOTTIR, S.; DRENT, M. L. The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: A review. **Obesity Reviews**, v. 8, n. 1, p. 21-34, Jan 2007. ISSN 1467-7881. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000243841100005 >.

KNIGHT, Z. A. et al. Hyperleptinemia Is Required for the Development of Leptin Resistance. **Plos One**, v. 5, n. 6, Jun 29 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000279369900023 >.

KORNER, J. et al. Prospective study of gut hormone and metabolic changes after adjustable gastric banding and Roux-en-Y gastric bypass. **International Journal of Obesity**, v. 33, n. 7, p. 786-795, Jul 2009. ISSN 0307-0565. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000267948800010 >.

KOZAK, M. POINT MUTATIONS DEFINE A SEQUENCE FLANKING THE AUG INITIATOR CODON THAT MODULATES TRANSLATION BY EUKARYOTIC RIBOSOMES. **Cell**, v. 44, n. 2, p. 283-292, Jan 31 1986. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1986AZC2900011 >.

KWON, B. et al. Involvement of tumor necrosis factor receptor superfamily (TNFRSF) members in the pathogenesis of inflammatory diseases. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 35, n. 1, p. 8-16, Feb 28 2003. ISSN 1226-3613. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000181687200002 >.

LAFONTAN, M. Fat cells: afferent and efferent messages define new approaches to treat obesity. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 45, p. 119-46, 2005. ISSN 0362-1642. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15822173> >.

LAKOSKI, S. G. et al. The relationship between inflammation, obesity and risk for hypertension in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). **J Hum Hypertens**, v. 25, n. 2, p. 73-9, Feb 2011. ISSN 1476-5527. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20944659> >.

LAVIE, C. J.; MILANI, R. V.; VENTURA, H. O. Obesity and Cardiovascular Disease Risk Factor, Paradox, and Impact of Weight Loss. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 53, n. 21, p. 1925-1932, May 26 2009. ISSN 0735-1097; 1558-3597. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000266236800001 >.

LEE, H. et al. Increased leptin and decreased ghrelin level after smoking cessation. **Neuroscience Letters**, v. 409, n. 1, p. 47-51, Nov 27 2006. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000242101800010 >.

LIN, Q. Q. et al. SIRT1 regulates TNF- α -induced expression of CD40 in 3T3-L1 adipocytes via NF- κ B pathway. **Cytokine**, Jun 2012. ISSN 1096-0023. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22717288> >.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, Dec 2001. ISSN 1046-2023. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000173949500003 >.

MA, J. et al. Genetic influences of the intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) gene polymorphisms in development of Type 1 diabetes and diabetic nephropathy. **Diabetic Medicine**, v. 23, n. 10, p. 1093-1099, Oct 2006. ISSN 0742-3071. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000240526300008 >.

MACIAS, C. et al. Endothelial adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1 and e-selectin in patients with acute coronary syndrome. **Revista Espanola de Cardiologia**, v. 56, n. 2, p. 137-144, Feb 2003. ISSN 0300-8932. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000181281100005 >.

MARCHI-ALVES, L. M. et al. Leptin, obesity and hypertension: importance of nursing actions. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 23, n. 2, p. 286-290, Mar-Apr 2010. ISSN 0103-2100. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000277421900021 >.

MARQUES-LOPES, I. et al. Aspectos genéticos da obesidade. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 3, p. 327-338, 2004-09 2004. ISSN 1415-5273. Disponível em: < <Go to ISI>://SCIELO:S1415-52732004000300006 >.

MATTHEWS, D. R. et al. **Homeostasis model assement: insulin resistance and β cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man**: Diabetologia: 412-419 p. 1985.

MEIGS, J. B. et al. Biomarkers of endothelial dysfunction and risk of type 2 diabetes mellitus. **Jama-Journal of the American Medical Association**, v. 291, n. 16, p. 1978-1986, Apr 28 2004. ISSN 0098-7484. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000221062000029 >.

MELLO, M. M.; STUDDERT, D. M.; BRENNAN, T. A. Obesity - The new frontier of public health law. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 24, p. 2601-2610, Jun 15 2006. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000238233400014 >.

MESARWI, O. et al. Sleep Disorders and the Development of Insulin Resistance and Obesity. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 42, n. 3, p. 617-+, Sep 2013. ISSN 0889-8529. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000325191100014 >.

MONTEIRO, J. C. **Obesidade: diagnóstico, métodos e fundamentos**. São Paulo: Lemos Editorial: 31-53 p. 1998.

MOSCHEN, A. R. et al. Anti-inflammatory effects of excessive weight loss: potent suppression of adipose interleukin 6 and tumour necrosis factor alpha expression. **Gut**, v. 59, n. 9, p. 1259-1264, Sep 2010. ISSN 0017-5749. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000282187100021 >.

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, Dec 2006. ISSN 0163-769X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17077190 >.

NG, Z. X. et al. Lack of association between Gly82Ser, 1704G/T and 2184A/G of RAGE gene polymorphisms and retinopathy susceptibility in Malaysian diabetic patients. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, n. 1, p. 455-461, 2012 2012. ISSN 1676-5680. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000301923500050 >.

NG, Z. Y. et al. Association of Leptin/Receptor and TNF- α gene variants with adolescent obesity in Malaysia. **Pediatr Int**, Mar 2014. ISSN 1442-200X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24628746> >.

OGDEN, C. L. et al. Prevalence of Childhood and Adult Obesity in the United States, 2011-2012. **Jama-Journal of the American Medical Association**, v. 311, n. 8, p. 806-814, Feb 26 2014. ISSN 0098-7484; 1538-3598. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000331793700020 >.

PANAGIOTAKOS, D. B. et al. Abdominal obesity, blood glucose and apolipoprotein B levels are the best predictors of the incidence of hypercholesterolemia (2001-2006) among healthy adults: the ATTICA Study. **Lipids in Health and Disease**, v. 7, Mar 2008. ISSN 1476-511X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000255653500001 >.

PEPYS, M. B.; HIRSCHFIELD, G. M. C-reactive protein: a critical update. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 12, p. 1805-1812, Jun 2003. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000183623600002 >.

PERMANA, P. A.; MENGE, C.; REAVEN, P. D. Macrophage-secreted factors induce adipocyte inflammation and insulin resistance. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 341, n. 2, p. 507-14, Mar 2006. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16427608> >.

PI-SUNYER, F. X. et al. Clinical guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults: Executive summary. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, n. 4, p. 899-917, Oct 1998. ISSN 0002-9165. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000076192600021 >.

PINKNEY, J. Prevention and cure of type 2 diabetes - Weight loss is the key to controlling the diabetes epidemic. **British Medical Journal**, v. 325, n. 7358, p. 232-233, Aug 3 2002. ISSN 0959-535X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000177339000004 >.

POGGI, M. et al. The inflammatory receptor CD40 is expressed on human adipocytes: contribution to crosstalk between lymphocytes and adipocytes. **Diabetologia**, v. 52, n. 6, p. 1152-1163, Jun 2009. ISSN 0012-186X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000265684500022 >.

PONTIROLI, A. F. et al. Body weight and glucose metabolism have a different effect on circulating levels of ICAM-1, E-selectin, and endothelin-1 in humans. **European Journal of Endocrinology**, v. 150, n. 2, p. 195-200, Feb 2004. ISSN 0804-4643. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000220401800013 >.

RAHMOUNI, K. et al. Obesity-associated hypertension - New insights into mechanisms. **Hypertension**, v. 45, n. 1, p. 9-14, Jan 2005. ISSN 0194-911X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000226035100003 >.

RAUSCH, M. E. et al. Obesity in C57BL/6J mice is characterized by adipose tissue hypoxia and cytotoxic T-cell infiltration. **International Journal of Obesity**, v. 32, n. 3, p. 451-463, Mar 2008. ISSN 0307-0565. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000254083600008 >.

RODERO, M. et al. Polymorphism in the Microglial Cell-Mobilizing CX3CR1 Gene Is Associated With Survival in Patients With Glioblastoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 36, p. 5957-5964, Dec 20 2008. ISSN 0732-183X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000261843600021 >.

ROMERO, C. E. M.; ZANESCO, A. O papel dos hormônios leptina e grelina na gênese da obesidade. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 1, p. 85-91, 2006-02 2006. ISSN 1415-5273. Disponível em: < <Go to ISI>://SCIELO:S1415-52732006000100009 >.

SABATE, J.-M. et al. The V249I polymorphism of the CX3CR1 gene is associated with fibrostenotic disease behavior in patients with Crohn's disease. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v. 20, n. 8, p. 748-755, Aug 2008. ISSN 0954-691X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000257829000007 >.

SANDBERG, W. J. et al. Inflammatory Interaction Between LIGHT and Proteinase-Activated Receptor-2 in Endothelial Cells Potential Role in Atherogenesis. **Circulation Research**, v. 104, n. 1, p. 60-U192, Jan 2 2009. ISSN 0009-7330. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000262201800011 >.

SANZ, J.; MORENO, P. R.; FUSTER, V. The year in atherothrombosis. **J Am Coll Cardiol**, v. 51, n. 9, p. 944-55, Mar 2008. ISSN 1558-3597. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18308164 >.

SARTORELLI, D. S.; FRANCO, L. J. Tendências do diabetes mellitus no Brasil: o papel da transição nutricional. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, p. S29-S36, 2003 2003. ISSN 0102-311X. Disponível em: < <Go to ISI>://SCIELO:S0102-311X2003000700004 >.

SCHERER, P. E. et al. A NOVEL SERUM-PROTEIN SIMILAR TO C1Q, PRODUCED EXCLUSIVELY IN ADIPOCYTES. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 45, p. 26746-26749, Nov 10 1995. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1995TE58300007 >.

SCHMIDT, A. et al. Lovastatin-stimulated superinduction of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 in TNF-alpha activated human vascular endothelial cells. **Atherosclerosis**, v. 164, n. 1, p. 57-64, Sep 2002. ISSN 0021-9150. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000177457400006 >.

SCHMIDT, A. M. et al. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. **Journal of Clinical Investigation**, v. 108, n. 7, p. 949-955, Oct 2001. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000171341400002 >.

SELL, H.; DIETZE-SCHROEDER, D.; ECKEL, J. The adipocyte-myocyte axis in insulin resistance. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 17, n. 10, p. 416-422, Dec 2006. ISSN 1043-2760. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000243054200013 >.

SHAH, R. et al. Fractalkine Is a Novel Human Adipochemokine Associated With Type 2 Diabetes. **Diabetes**, v. 60, n. 5, p. 1512-1518, May 2011. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000290349700018 >.

SHULDINER, A. R. Obesity Genes and Gene-Environment-Behavior Interactions: Recommendations for a Way Forward. **Obesity**, v. 16, p. S79-S81, Dec 2008. ISSN 1930-7381. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000261406200014 >.

SIERRA-JOHNSON, J. et al. Comparison of apolipoprotein-B/apolipoprotein-AI in subjects with versus without the metabolic syndrome. **American Journal of Cardiology**, v. 98, n. 10, p. 1369-1373, Nov 2006. ISSN 0002-9149. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000244052400014 >.

SIERVOGEL, R. M. et al. Lifetime overweight status in relation to serial changes in body composition and risk factors for cardiovascular disease: The Fels Longitudinal Study. **Obesity Research**, v. 8, n. 6, p. 422-430, Sep 2000. ISSN 1071-7323. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000089384500002 >.

SILHA, J. V. et al. Plasma resistin, adiponectin and leptin levels in lean and obese subjects: correlations with insulin resistance. **European Journal of Endocrinology**, v. 149, n. 4, p. 331-335, Oct 2003. ISSN 0804-4643. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000185849400010 >.

SIROIS-GAGNON, D. et al. Association of Common Polymorphisms in the Fractalkine Receptor (CX3CR1) With Obesity. **Obesity**, v. 19, n. 1, p. 222-227, Jan 2011. ISSN 1930-7381. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000285633600034 >.

STEEMBURGO, T.; DE AZEVEDO, M. J.; ALFREDO MARTINEZ, J. Gene-nutrient interaction and its association with obesity and diabetes mellitus. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 53, n. 5, p. 497-508, Jul 2009. ISSN 0004-2730. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000268846000003 >.

STEPIEN, M. et al. Serum concentrations of adiponectin, leptin, resistin, ghrelin and insulin and their association with obesity indices in obese normo- and hypertensive patients - pilot study. **Archives of Medical Science**, v. 8, n. 3, p. 431-436, Jun 2012. ISSN 1734-1922. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000306150200007 >.

STEPAN, C. M. et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. **Nature**, v. 409, n. 6818, p. 307-312, Jan 18 2001. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000166434300037 >.

STUNKARD, A. J.; FOCH, T. T.; HRUBEC, Z. A TWIN STUDY OF HUMAN OBESITY. **Jama-Journal of the American Medical Association**, v. 256, n. 1, p. 51-54, Jul 4 1986. ISSN 0098-7484. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1986C935200016 >.

STUNKARD, A. J. et al. THE BODY-MASS INDEX OF TWINS WHO HAVE BEEN REARED APART. **New England Journal of Medicine**, v. 322, n. 21, p. 1483-1487, May 24 1990. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1990DE23700002 >.

_____. AN ADOPTION STUDY OF HUMAN OBESITY. **New England Journal of Medicine**, v. 314, n. 4, p. 193-198, Jan 23 1986. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1986AXY3800001 >.

SUCHANKOVA, P. et al. Is the Gly82Ser polymorphism in the RAGE gene relevant to schizophrenia and the personality trait psychoticism? **Journal of Psychiatry & Neuroscience**, v. 37, n. 2, p. 122-128, Mar 2012. ISSN 1180-4882. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000301327600007 >.

SURIYAPROM, K.; TUNGTRONGCHITR, R.; THAWNASOM, K. Measurement of the levels of leptin, BDNF associated with polymorphisms LEP G2548A, LEPR Gln223Arg and BDNF Val66Met in Thai with metabolic syndrome. **Diabetol Metab Syndr**, v. 6, n. 1, p. 6, 2014. ISSN 1758-5996. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24444121> >.

TAYLOR, J. G. et al. Using genetic variation to study human disease. **Trends Mol Med**, v. 7, n. 11, p. 507-12, Nov 2001. ISSN 1471-4914. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11689336> >.

TIAN, C. et al. A common polymorphism in CD40 Kozak sequence (-1C/T) is associated with acute coronary syndrome. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 64, n. 3, p. 191-194, Mar 2010. ISSN 0753-3322. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000276934500008 >.

TIAN, C. X. et al. [Association between inflammatory cytokine CD40 gene polymorphism and risk of acute coronary syndrome]. **Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi**, v. 36, n. 3, p. 199-204, Mar 2008. ISSN 0253-3758. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19099972> >.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 6, n. 10, p. 772-83, Oct 2006. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16998510> >.

TOMER, Y.; CONCEPCION, E.; GREENBERG, D. A. A C/T single-nucleotide polymorphism in the region of the CD40 gene is associated with Graves' disease. **Thyroid**, v. 12, n. 12, p. 1129-1135, Dec 2002. ISSN 1050-7256. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000180487500013 >.

TRAYHURN, P.; WOOD, I. S. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. **British Journal of Nutrition**, v. 92, n. 3, p. 347-355, Sep 2004. ISSN 0007-1145. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000224519100002 >.

TSAKADZE, N. L. et al. Signals mediating cleavage of intercellular adhesion molecule-1. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 287, n. 1, p. C55-C63, Jul 2004. ISSN 0363-6143. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000221926100007 >.

UNEK, I. T. et al. The levels of soluble CD40 ligand and C-reactive protein in normal weight, overweight and obese people. **Clin Med Res**, v. 8, n. 2, p. 89-95, Jul 2010. ISSN 1554-6179. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20660932> >.

VAN DER MERWE, M. T.; PEPPER, M. S. Obesity in South Africa. **Obesity Reviews**, v. 7, n. 4, p. 315-322, Nov 2006. ISSN 1467-7881. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000241190200001 >.

VARO, N. et al. Elevated plasma levels of the atherogenic mediator soluble CD40 ligand in diabetic patients: a novel target of thiazolidinediones. **Circulation**, v. 107, n. 21, p. 2664-9, Jun 2003. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12742991> >.

VENDRELL, J. et al. Resistin, adiponectin, ghrelin, leptin, and proinflammatory cytokines: Relationships in obesity. **Obesity Research**, v. 12, n. 6, p. 962-971, Jun 2004. ISSN 1071-7323. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000222547800012 >.

VIGITEL. **Quase metade da população brasileira está acima do peso**. SAÚDE, M. D. Portal da Saúde 2012.

WANG, B. et al. Regression of atherosclerosis plaques in apolipoprotein E(-/-) mice after lentivirus-mediated RNA interference of CD40. **Int J Cardiol**, Jun 2011. ISSN 1874-1754. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21640399> >.

WANG, M. et al. The CD40 Gene Polymorphism rs1883832 Is Associated with Risk of Acute Coronary Syndrome in a Chinese Case-Control Study. **DNA and Cell Biology**, v. 30, n. 3, p. 173-178, Mar 2011. ISSN 1044-5498. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000287916400006 >.

_____. The CD40 gene polymorphism rs1883832 is associated with risk of acute coronary syndrome in a Chinese case-control study. **DNA Cell Biol**, v. 30, n. 3, p. 173-8, Mar 2011. ISSN 1557-7430. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21091218> >.

WANG, Z. et al. E-selectin gene polymorphisms are associated with essential hypertension: a case-control pilot study in a Chinese population. **Bmc Medical Genetics**, v. 11, Aug 27 2010. ISSN 1471-2350. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000283195400001 >.

WEYER, C. et al. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: Close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, n. 5, p. 1930-1935, May 2001. ISSN 0021-972X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000168731600018 >.

WHO. Obesity: Preventing and managing the global epidemic - Introduction. **Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic: Report of a WHO Consultation**, v. 894, p. 1-253, 2000. ISSN 0512-3054. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000168728400001 >.

WILLIAMSON, D. F. et al. Smoking cessation and severity of weight gain in a national cohort. **N Engl J Med**, v. 324, n. 11, p. 739-45, Mar 1991. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1997840> >.

WU, H. et al. T-cell accumulation and regulated on activation, normal T cell expressed and secreted Upregulation in adipose tissue in obesity. **Circulation**, v. 115, n. 8, p. 1029-1038, Feb 27 2007. ISSN 0009-7322. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000244482200015 >.

XU, B. et al. Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. **Nat Neurosci**, v. 6, n. 7, p. 736-42, Jul 2003. ISSN 1097-6256. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12796784> >.

YAMAUCHI, T. et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. **Nature Medicine**, v. 7, n. 8, p. 941-946, Aug 2001. ISSN 1078-8956. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000171740400032 >.

YAN, S. F. et al. Glycation, inflammation, and RAGE - A scaffold for the macrovascular complications of diabetes and beyond. **Circulation Research**, v. 93, n. 12, p. 1159-1169, Dec 12 2003. ISSN 0009-7330. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000187183500004 >.

YUDKIN, J. S. et al. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 19, n. 4, p. 972-8, Apr 1999. ISSN 1079-5642. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10195925> >.

YUN, J. E. et al. Serum leptin is associated with metabolic syndrome in obese and nonobese Korean populations. **Metabolism-Clinical and Experimental**, v. 59, n. 3, p. 424-429, Mar 2010. ISSN 0026-0495. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000276761800019 >.

ZHANG, Q.; WANG, Y.; HUANG, E. S. Changes in racial/ethnic disparities in the prevalence of Type 2 diabetes by obesity level among US adults. **Ethn Health**, v. 14, n. 5, p. 439-57, Oct 2009. ISSN 1465-3419. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19360513> >.

ZHANG, Y. et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, n. 6505, p. 425-32, Dec 1994. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7984236> >.

ZICCARDI, P. et al. Reduction of inflammatory cytokine concentrations and improvement of endothelial functions in obese women after weight loss over one year. **Circulation**, v. 105, n. 7, p. 804-809, Feb 19 2002. ISSN 0009-7322. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000173974800008 >.

APÊNDICES

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE SERVIÇOS DA SAÚDE
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa:

“Estudo dos polimorfismos dos genes CD40, ICAM1, VCAM1, E-selectina, LIGHT, RAGE e CX3CR1 relacionados com inflamação e sua associação ao sobrepeso corporal.”

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(a) Voluntário(a),

Meu nome é Mario Hiroyuki Hirata, sou professor 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 do Setor de Dislipidemia do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC) e com a colaboração de outros pesquisadores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

Para participar desta pesquisa precisarei do seu consentimento e amostras de sangue que serão coletadas no Setor de Coleta do Laboratório Clínico ou no Setor de Dislipidemia. O risco à saúde será mínimo e a coleta de sangue pode formar uma mancha roxa (hematoma) no local da picada da agulha.

Nesta pesquisa, vamos fazer testes de RNA e de DNA em alguns genes que estão relacionados com inflamação, e aterosclerose (CD40, ICAM1, VCAM1, E-selectina, LIGHT, RAGE e CX3CR1), ou seja, para estudar a relação entre alterações nas sequências do DNA (polimorfismos genéticos) e a expressão de RNAm que possam estar relacionados com o aumento de peso.

Além disso, realizaremos exames de sangue (glicemia, hemoglobina glicada, colesterol total + frações, triglicérides, apolipoproteína A e B, hemograma completo, T4, TSH, creatinina, uréia, AST, ALT e proteína C reativa ultra-sensível). Para estes procedimentos, serão coletados aproximadamente 48 mL de sangue.

A sua amostra de DNA será armazenada no Laboratório de Biologia Molecular aplicada ao Diagnóstico (LBMA) da FCF/USP, sob minha responsabilidade, e será mantida em banco de materiais biológicos sem a sua identificação. Se futuramente sua amostra for utilizada em outro projeto, este novo projeto será submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e então, alguém entrará em contato com você para solicitar autorização.

Os resultados obtidos durante a pesquisa serão **confidenciais** e somente serão revelados a terceiros com sua autorização. Sua identidade será mantida em segredo, quando os resultados desta pesquisa forem publicados em artigos de revistas científicas ou forem apresentados em temas de aulas e debates.

Comitê de Ética do IDPC

Av. Dr. Dante Pazzanese 500, Ibirapuera,
CEP: 04012-180, São Paulo, SP

Telefones: 5085-6040

Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Cidade Universitária
CEP: 05508-900, São Paulo, SP

Telefone: 3091-3677

Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia
Comitê de Ética em Pesquisa
Av. Dr. Dante Pazzanese, 500 - 8º andar - Torre
04012-180 - São Paulo

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE SERVIÇOS DA SAÚDE
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR

Você receberá todos os resultados dos exames laboratoriais necessários sem qualquer custo e, caso se interesse, você terá acesso aos resultados dos testes genéticos no final da pesquisa.

Sua participação neste estudo é voluntária, portanto, não receberá qualquer pagamento por sua participação. Por quaisquer motivos, independente de seu consentimento, os membros da equipe podem encerrar sua participação no estudo devido a alguma alteração médica que pode colocá-lo em risco de outra complicação, devido ao cancelamento do estudo pela coordenação do mesmo, caso o sujeito não cumpra as orientações ou por outras questões administrativas. Caso isso ocorra um dos pesquisadores entrará em contato e lhe explicará o motivo da exclusão.

Você pode desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, sem penalidade ou perda dos benefícios a que você tem direito e seu tratamento médico no Instituto Dante Pazzanese (IDPC) não será afetado. Caso você desista de participar da pesquisa, poderá solicitar a retirada de seus dados genéticos do banco de dados do LBMA/D da FCF/USP.

Não há benefício direto aos participantes da pesquisa, porém os resultados deste estudo vão ajudar para uma melhor conduta terapêutica no caso de obesidade.

Em caso de dúvida ou desistência, você poderá entrar em contato com os pesquisadores: Aécio Braga (telefone: 7556-0272), Paula Lima (telefone: 5085-6086) ou Mario Hiroyuki Hirata (telefone: 3091-3660) 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 20 ____.

Assinatura do voluntário(a)

Assinatura do Pesquisador
(carimbo ou nome legível)

Você autoriza o armazenamento do DNA para pesquisas futuras? Sim () Não ()

Comitê de Ética do IDPC
Av. Dr. Dante Pazzanese 500, Ibirapuera,
CEP: 04012-180, São Paulo, SP
Telefones: 5085-6040

Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP
Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Cidade Universitária
CEP: 05508-900, São Paulo, SP
Telefone: 3091-3677

APÊNDICE B – FICHA DE COLETA DE DADOS INDIVIDUAIS

INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA (IDPC) E FACULDADE DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (FCF/USP)

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		

INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA (IDPC) E FACULDADE DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (FCF/USP)

Possui algum parente (pai, mãe ou irmão) com:		
☐ Diabetes Mellitus ☐ Obesidade ☐ Hipertensão		
☐ Doenças cardiovascular 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	Bioimpedancia	

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

ANEXOS

ANEXO A – CÓPIA DO AVAL DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FCF-USP E DO IDPC

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

PARECER CONSUBSTANCIADO

Parecer CEP/FCF/120/2011
Protocolo CEP/FCF/585
CAAE: 0030.0.018.131-11

I – Identificação:

Projeto de Pesquisa	Estudo dos polimorfismos dos genes <i>CD40</i> , <i>ICAM1</i> , <i>VCAM1</i> , <i>E-selectina</i> , <i>LIGHT</i> , <i>RAGE</i> e <i>CX3CR1</i> relacionados com inflamação e sua associação ao sobrepeso corporal
Pesquisador Responsável	Prof. Dr. Mário Hiroyuki Hirata
Aluno de pós-graduação envolvido	Aécio Assunção Braga
Instituição	Faculdade de Ciências farmacêuticas – USP

II - Sumário Geral do Protocolo:

Acredita-se que a obesidade seja decorrente de um desequilíbrio entre a quantidade de energia ingerida e o gasto energético por um longo período. Segundo dados da OMS, estima-se que existam cerca de 1,5 bilhão de adultos que estão acima do peso no mundo e desses, mais de 200 milhões de homens e quase 300 milhões de mulheres obesas. O objetivo deste estudo será investigar a influência de polimorfismos dos genes *CD40*, *ICAM1*, *VCAM1*, *E-selectina*, *LIGHT*, *RAGE* e *CX3CR1* em leucócitos do sangue periférico na obesidade de indivíduos com sobrepesos. Participarão desse estudo 100 indivíduos obesos e 100 não-obesos triados no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC), de ambos os sexos, com idade de 30 à 70 anos; Serão avaliados parâmetros bioquímicos, inflamatórios como colesterol total e frações, triglicérides HbA1c, e glicemia, assim como, as determinações de *CD40*, *ICAM1*, *VCAM1*, *E-selectina*, *LIGHT*, *RAGE* e *CX3CR1*. Serão analisados dados antropométricos como altura, pressão arterial e IMC. Os polimorfismos genéticos serão analisados por PiroSequenciamento e os estudos de expressão gênica serão analisados pela PCR em tempo real. Os resultados deste estudo contribuirão para o conhecimento da influência de polimorfismos dos genes *CD40*, *ICAM1*, *VCAM1*, *E-selectina*, *LIGHT*, *RAGE* e *CX3CR1* em indivíduos obesos promovendo uma melhor abordagem terapêutica aos pacientes.

Os objetivos do presente estudo são:

Determinar a frequência alélica e genotípica dos polimorfismos do gene *CD40* (rs1883832), *ICAM1* (rs281432 e rs1799969), *VCAM1* (rs3176878), *E-selectina* (rs5368), *LIGHT* (rs344560 e rs2291668), *RAGE* (rs2070600 e rs2236493) e *CX3CR1* (rs3732379 e rs3732378) em pacientes obesos;

Verificar a expressão dos genes *CD40*, *ICAM1*, *VCAM1*, *E-selectina*, *LIGHT*, *RAGE* e *CX3CR1* nas células periféricas de pacientes obesos;

Relacionar a presença dos principais SNPs dos genes *CD40*, *ICAM1*, *VCAM1*, *E-selectina*, *LIGHT*, *RAGE* e *CX3CR1* com alguns fatores de risco para desenvolvimento da obesidade

Tipo de estudo:

Caso-controle

Descrição da Casuística:

Serão estudados 100 indivíduos obesos (IMC > 30 kg/m²) e 100 não-obesos sem vínculo genético, com idade entre 30 e 70 anos, que serão selecionados no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC). Para o estudo, o tamanho da amostra foi calculado com base na prática clínica observada no Instituto Dante Pazzanese de

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Cardiologia (IDPC). O cálculo foi realizado para um estudo com 80% de poder de significância 0,05, p bicaudal. O N indicado foi de aproximadamente 147. Desta forma, optou-se pelo N de 100 pacientes para participar do estudo de expressão gênica e 200 pacientes para o estudo de polimorfismos genéticos.

Será aplicado um questionário, contendo algumas informações pessoais, como se possui o hábito de fumar, beber, se possui algum tipo de doença (hipertensão, alterações nos níveis de colesterol, diabetes, depressão), ou doença na família e se faz uso de algum tipo de medicamento de uso contínuo. O questionário está inserido no corpo do projeto.

As amostras de sangue serão coletadas após jejum de 10 a 12 horas em tubos modelo vacutainer™ (Becton Dickinson Company, Plymouth, Reino Unido). Para as determinações bioquímicas de perfil lipídico serão coletados em tubos de 10 mL com gel separador com ativador de coágulo. Para glicemia serão coletados 2 mL de sangue em tubos contendo Fluoreto de sódio + EDTA. Para a genotipagem e expressão gênica serão coletados 30 mL de sangue com anticoagulante EDTA (3 tubos de 10 mL de sangue). Os soros e plasma serão separados e mantidos a -20°C até sua posterior utilização na determinação dos diversos marcadores inflamatórios.

Os critérios de inclusão dos participantes são:

Para o grupo de estudo: ser obeso ($IMC > 30 \text{ kg/m}^2$), ter entre 30 e 70 anos e estar sendo atendido no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia.

Para o grupo controle: não ser obeso, ter entre 30 e 70 anos e estar sendo atendido no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia.

Serão critérios de exclusão: indivíduos com hipo- ou hipertireoidismo, síndrome de Cushing, hipogonadismo em homens, hiperandrogenismo em mulheres e outros tipos de obesidade secundária. Também serão excluídos os portadores de doença hepática, renal ou gastro-intestinal grave, mulheres grávidas ou indivíduos que não aceitem participar do estudo.

III – Situação do Protocolo: APROVADO em reunião de 25/07/2011.

Cabe ao pesquisador:

- Comunicar ao CEP:
 - A ocorrência de efeitos colaterais e ou de reações não esperadas;
 - Eventuais modificações no projeto aguardando a apreciação e aprovação do CEP;
 - A interrupção do projeto;
- Apresentar relatório parcial em julho/12 e relatório final em julho/13 (modelo do CEP).

São Paulo, 26 de julho de 2011.

Profa. Dra. Mariza Landgraf
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP/FCF/USP

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Coordenadoria de Serviços de Saúde
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA
Comitê de Ética em Pesquisa

DATA DA ENTRADA: 11 de agosto de 2011.

DATA DA AVALIAÇÃO: 12 de agosto de 2011.

CAAE: 0030.0.018.131-11/ FR 430344

Nº DO PROTOCOLO NO CEP: 4134

(este nº. deverá citar nas correspondências referentes a este projeto)

Investigador Principal: Mario Hiroyuki Hirata

Nº de Sujeitos no Centro: 300

Nº de Sujeitos no Brasil: 300

Nº de Sujeitos Total: 300

Área de Conhecimento: Ciências Biológicas

Área Temática Especial: Genética Humana

Unitermos: Obesidade, inflamação, polimorfismos genéticos

Fase: Não se aplica

Nível: Não informado

Duração do Estudo:

Patrocinador: Não se aplica

Grupo: II

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêutica da Universidade de São Paulo

Instituição Co-Participante: Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia

CEP: Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia

Projeto de Pesquisa Clínica: "Estudo dos polimorfismos dos genes CD40, ICAM1, VCAM1, E-selectina, LIGHT, RAGE e CX3CR1 relacionados com inflamação e sua associação ao sobrepeso corporal".

Considerações/Comentários: O presente estudo tem como objetivo determinar a frequência alélica e genotípica dos polimorfismos do gene CD40 (rs1883832), ICAM1 (rs281432 e rs1799969), VCAM1 (rs3176878), E-selectina (rs5368), LIGHT

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Coordenadoria de Serviços de Saúde
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA
Comitê de Ética em Pesquisa

(rs344560 e rs2291668), RAGE (rs2070600 e rs2236493) e CX3CR1 (rs3732379 e rs3732378) em pacientes obesos; verificar a expressão dos genes CD40, ICAM1, VCAM1, E-selectina, LIGHT, RAGE e CX3CR1 nas células periféricas de pacientes obesos; relacionar a presença dos principais SNPs dos genes CD40, ICAM1, VCAM1, E-selectina, LIGHT, RAGE e CX3CR1 com alguns fatores de risco para desenvolvimento da obesidade.

Ao se proceder à análise ao projeto em questão, considera-se que:

- a) O projeto preenche os requisitos fundamentais das resoluções CNS 196/96, 251/97 e 292/99, sobre as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, do Conselho Nacional de Saúde / Conselho Nacional de Ética em Pesquisa / Agência Nacional de Vigilância Sanitária e as Boas Práticas de Pesquisa Clínica do ICH-GCP.
- b) O Comitê de Ética em Pesquisa avaliou o Protocolo de Estudo e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.
- c) O Comitê de Ética em Pesquisa segue os preceitos das resoluções CNS 196/96, 251/97 e 292/99, sobre as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, do Conselho Nacional de Saúde / Conselho Nacional de Ética em Pesquisa / Agência Nacional de Vigilância Sanitária e as Boas Práticas de Pesquisa Clínica do ICH-GCP.

Diante do exposto, O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, declara

"Declaro ter lido e concordar com o parecer ético emitido pelo CEP da Instituição proponente, conhecer e cumprir as Resoluções Éticas Brasileiras, em especial a Resolução CNS 196/96. Esta instituição está ciente de suas co-responsabilidades como instituição co-participante do presente projeto de

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Coordenadoria de Serviços de Saúde
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA
Comitê de Ética em Pesquisa

pesquisa, e de seu compromisso no resguardo da segurança e bem-estar dos sujeitos de pesquisa nela recrutados, dispondo de infra-estrutura necessária para a garantia de tal segurança e bem-estar.

São Paulo, 12 de agosto de 2011.

Pedro S. Farsky

Pedro Silvio Farsky
Coordenador CEP
CRM 55073

Dr. Pedro Silvio Farsky
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia

ANEXO B – FICHA DO ALUNO

2/4/2014

Ficha do Aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9136 - 7060081/1 - Aécio Assunção Braga

Email: aeciobraga@usp.br
Data de Nascimento: 20/01/1986
Cédula de Identidade: RG - 54.836.549-0 - MA
Local de Nascimento: Estado do Maranhão
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Farmacêutico - Universidade Federal do Maranhão - Maranhão - Brasil - 2009

Curso: Mestrado
Programa: Farmácia (Análises Clínicas)
Área: Análises Clínicas
Data de Matrícula: 07/07/2011
Início da Contagem de Prazo: 07/07/2011
Data Limite para o Depósito: 07/04/2014
Orientador Acadêmico: Prof(a). Dr(a). Primavera Borelli Garcia - 07/07/2011 a 01/01/2012 E.Mail: borelli@usp.br
Orientador: Prof(a). Dr(a). Primavera Borelli Garcia - 02/01/2012 a 25/03/2012 E.Mail: borelli@usp.br
Orientador: Prof(a). Dr(a). Mario Hiroyuki Hirata - 26/03/2012 até o presente. E.Mail: mhhirata@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 07/07/2011
Prorrogação: 90 dias
Período de 07/01/2014 a 07/04/2014
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 26/09/2012
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Ingressou no Mestrado em 07/07/2011
Prorrogação em 10/12/2013
Matrícula de Acompanhamento em 10/02/2014

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9136 - 7060081/1 - Aécio Assunção Braga

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5722-2/1	Controle Hormonal da Resposta Inflamatória	02/08/2011	22/08/2011	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5757-3/2	Tópicos em Análises Clínicas II	09/08/2011	29/11/2011	30	2	85,5	A	N	Concluída
FBC5708-5/1	Farmacogenômica Cardiovascular	30/08/2011	10/10/2011	90	6	92	A	N	Concluída
FBC5793-10/2	Tópicos em Análises Clínicas I	06/03/2012	26/06/2012	30	2	100	A	N	Concluída
MCM5797-4/3	Obesidade (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	11/06/2012	01/07/2012	60	4	95	A	N	Concluída
FBC5709-5/1	Biologia Molecular em Análises Clínicas	13/08/2012	16/09/2012	75	5	100	A	N	Concluída
TIC5012-2/1	Bioestatística (Curso Interunidades: Medicina /Tecnologia e Intervenção em Cardiologia - Universidade de São Paulo)	01/10/2012	09/12/2012	90	6	82	A	N	Concluída
FBC5761-6/1	Tópicos Avançados em Bioquímica Clínica	04/02/2013	03/03/2013	60	4	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	33
Estágios:			
Total:	0	25	33

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 10/02/2014

Impresso em: 02/04/14 18:37:50