UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA
ÁREA DE ANÁLISES CLÍNICAS

**Avaliação de regiões hipervariáveis de genes que
predispõem à obesidade**

Hamilton Massayuki Hinuy

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:

Profa. Assoc. Rosario Dominguez Crespo Hirata

São Paulo
2004

Hamilton Massayuki Hinuy

Avaliação de regiões hipervariáveis de genes que predisõem à
obesidade

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Assoc. Rosario Dominguez Crespo Hirata
orientador/presidente

Profa. Dra. Sandra Mara Ferreira Villares
1^a. examinadora

Profa. Dra. Ligia Ferreira Gomes
2^a. examinadora

São Paulo, 02 de abril de 2004.

Dedico este trabalho,

À Profa. Assoc. Rosario Dominguez Crespo Hirata, pelo exemplo de dedicação e rigor científico que serviram de modelo para meu aperfeiçoamento pessoal e profissional. Pela confiança e oportunidade de desenvolver este trabalho, meu eterno obrigado.

Ao Prof. Assoc. Mario Hiroyuki Hirata, pelas críticas e observações sempre presentes que auxiliaram no meu aprendizado e aprimoramento deste trabalho.

Aos meus pais Sadau Hinuy e Mayako Hinuy que foram responsáveis pela minha formação acadêmica e incentivadores incondicionais. Minha eterna gratidão.

Ao meu irmão Jacques e à minha cunhada Luciana pela amizade e incentivo sempre presentes.

*Quoy que par la mer par son onde bruyant,
Face herisser de peur cil qui la hante,
Ce nonobstante l'homme se fie au bois,
Qui d'espaisseur n'a que quatre ou cinq doigts,
De quoy est faict de vaisseur que le porte.
Ne voyant pas qu'il vuit en telle sorte,
Qu'il a la mort à quatre doigts de luy.
Reputer fol on peut donc bien celui
Qui va sur mer, si en Dieu ne se fie,
Car c'est seul Dieu qui peut sauver sa vie.*

Apesar do mar por suas ondas brilhantes,
Fazer arrepiar de medo quem frequente,
O homem não obstante confia na madeira,
Que de espessura não tem quatro ou cinco dedos,
De que é feito o navio que o leva,
Não percebendo que vive de tal modo,
Que tem a morte a quatro dedos dele.
Louco, portanto, pode muito bem ser reputado aquele
Que vai ao mar sem em Deus confiar,
Pois só Deus é que pode salvar-lhe a vida.

**Juvenal, Sátira XII,V *apud* “Viagem à Terra do Brasil”, Jean de Léry.
Ed. Universidade de São Paulo, 1980.**

“Enquanto somos, a morte não existe, e quando passa a existir, deixamos de ser”

Epicuro

“We wish to suggest a structure for the salt of deoxyribose nucleic acid (D.N.A.). This structure has novel features which are of considerable biological interest.”

Watson J.D., Crick F.H.C., “Molecular Structure of Nucleic Acids”, Nature 171(4356):737-738, April 25, 1953.

Agradecimentos

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de São Paulo, em nome do seu Diretor, Prof. Tit. Jorge Mancini Filho

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêutica da Universidade de São Paulo, em nome do seu chefe, Profa. Tit. Dulcineia Saes Parra Abdalla.

À Profa. Tit. Dulcineia Saes Parra Abdalla, Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Farmácia – Área de Análises Clínicas, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos professores do curso de graduação em Farmácia-Bioquímica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Farmácia – Área de Análises Clínicas, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos médicos do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia de São Paulo, cardiologistas Dr. Marcelo Ferraz Sampaio, Dr. Dikran Armaganijan, Dr. Michel Batloune, pelo apoio indispensável para que esse trabalho fosse realizado no instituto.

À Fabiana Gonçalves Bernardes e aos funcionários do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia Alberto Tadeu da Silva (Beto), Ana Lúcia dos Santos, Fernanda N. A. dos Santos e Marina Pereira Gomes, pela ajuda na seleção dos indivíduos.

Ao Dr. Carlos Eduardo dos Santos Ferreira, chefe do Laboratório Clínico do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia e aos funcionários, particularmente à bióloga líder do setor de Imunologia, Nívea Aparecida de Campos Salvarani, pela assistência na coordenação das análises laboratoriais.

Aos funcionários do setor de coleta de amostras de sangue, particularmente, Carlos Eduardo Pinto, Luiz Antônio de Lima (Índio) e D^a Ruth Campos de Oliveira de Lima pela colaboração indispensável.

Aos pacientes envolvidos neste estudo, que contribuíram de maneira anônima para o melhor entendimento dos mecanismos que levam à obesidade.

Ao Dr. Simão Augusto Lottenberg, por suas críticas e sugestões por ocasião do Exame de Qualificação, e ao Prof. Tit. Paulo Alberto Otto, do Instituto de Biociências, por sua inestimável ajuda na análise de dados.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Biologia Molecular aplicado ao Diagnóstico do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP: Adriana Natsue Ozaki, Alice Cristina Rodrigues, André Ducati Luchesi, Bety Chen, Carlos Eduardo de Melo, Carolina Costa Góis, Débora Moreira Pescarini, Érika Miguel de Souza, Fabiana Cristina Pereira dos Santos, Evelyn Anzai Kanto, Francisco José Forastiero, Ivanise Marina Moretti Rebecchi, Letícia Cecon, Marília Reis Gonçalves Rocha, Mustafa Hassan Issa, Patrícia Barco, Paulo Henrique Carbone, Raffaella Picciotti, Raimundo Antonio Gomes Oliveira, Sarah Aparecida Soares, Simone Cohen Sorkin e Vladimir Tavares.

Aos meus amigos que passaram pelo laboratório, Elizabeth Cecília Rodriguez Guzmán, Heluih Atta Abdallah, Hemerson Bertazoni, Leonardo de Oliveira Matsumoto, Juliana Alonso Uehara, Márcia Keila Nakamura, Marcos de Oliveira Machado, Rosilene Fressati Cardoso, Rozangela Verlengia, Silvério Teixeira dos Santos, Sun Ok Yoon, especialmente à Luis Antonio Salazar Navarrete, Maria Fernanda Pimentel de Carvalho e Selma Andréa Cavalli.

À uma pessoa muito especial que me ajudou muito no desenvolvimento deste trabalho: Regina de Sordi, do Laboratório Biomol.

Às funcionárias da secretaria do Departamento de Análises Clínicas da FCF-USP: Márcia Cristina Caramico, Sueli Providelo, Ana Maria Dantas e Maria Auxiliadora de Lima, pelo carinho, torcida e auxílio profissional.

Aos funcionários da Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Farmácia: Elaine Midory Ychico, Jorge Alves Lima e Benedita Espírito de Oliveira, pelo seu carinho e auxílio profissional.

Às funcionárias do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF/USP, Claudia Luciano dos Reis, Carmen Lúcia Moura e especialmente Maria Dorlei Moura, pelo seu carinho, atenção e incentivo.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esse trabalho se concretizasse.

*Àquele que nos dá força,
especialmente nos
momentos mais difíceis,
e faz com que tudo dê
certo no final.*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Epidemiologia da obesidade e doenças associadas.....	4
1.2. Fisiopatologia da obesidade.....	10
1.3. Componentes do balanço energético.....	13
1.4. Alterações genéticas que podem estar associadas à obesidade.....	19
1.4.1. <i>Genes da leptina e do receptor da leptina</i>	21
1.4.2. <i>Genes da via da melanocortina hipotalâmica</i>	25
2. OBJETIVOS	29
3. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1. Casuística.....	30
3.2. Material biológico.....	31
3.3. Métodos.....	31
3.3.1. <i>Determinação das medidas antropométricas</i>	31
3.3.2. <i>Determinação dos parâmetros bioquímicos</i>	32
3.3.3. <i>Extração do DNA genômico</i>	32
3.3.4. <i>Amplificação das HVR pela reação em cadeia pela polimerase</i>	33
3.3.5. <i>Análise dos alelos das HVR por sistema manual</i>	34
3.3.6. <i>Análise dos alelos da HVR D1S200 pelo sistema de detecção automatizado</i>	36
3.3.7. <i>Análise do polimorfismo G-2548A</i>	38
3.3.8. <i>Análise estatística</i>	39
4. RESULTADOS	41
4.1. Dados biodemográficos, bioquímicos e clínicos dos indivíduos.....	41
4.2. Estudo do polimorfismo <i>LEP</i> G-2548A.....	46
4.3. Estudo da região hipervariável 3'HVR.....	48
4.4. Estudo da região hipervariável D2S1788 (<i>POMC</i>).....	53
4.5. Estudo da região hipervariável D18S858 (<i>MC4R</i>).....	55
4.6. Estudo da região hipervariável D1S200 (<i>LEPR</i>).....	59
4.7. Estudo de haplótipos do <i>LEP</i>	62
5. DISCUSSÃO	66
6. CONCLUSÕES	77
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
ANEXOS	102
AI. Dados biodemográficos, bioquímicos e clínicos dos indivíduos.....	102

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	Via da Melanocortina Hipotalâmica.....	17
FIGURA 2A	Localização do gene da leptina (<i>OB</i> ou <i>LEP</i>) no cromossomo 7 humano.....	22
FIGURA 2B	Esquema do gene <i>OB</i> , incluindo o tamanho dos íntrons e a posição aproximada dos polimorfismos G-2548A e 3'HVR.....	22
FIGURA 3A	Localização do <i>LEPR</i> e do locus D1S200 no cromossomo 1 humano.....	24
FIGURA 3B	Esquema do gene <i>LEPR</i> , incluindo o tamanho dos íntrons, com exceção do íntron 2, de tamanho desconhecido.....	24
FIGURA 4A	Localização do gene <i>POMC</i> e do locus D2S1788 no cromossomo 2 humano.....	26
FIGURA 4B	Esquema do <i>POMC</i> . Estão indicadas as regiões correspondentes às proteínas originadas a partir da pró-proteína POMC.....	26
FIGURA 5	Representação gráfica da extremidade do braço longo do cromossomo 18, com indicação das posições aproximadas do <i>MC4R</i> e da microssatélite D18S858.....	27
FIGURA 6	Eletoforese de produtos de amplificação das regiões hipervariáveis 3' HVR, D2S1788 e D18S858.....	35
FIGURA 7	Eletoferograma do programa ALFwin Fragment Analyser v1.01, que foi utilizado na determinação dos tamanhos moleculares de fragmentos da HVR D1S200 pelo método automatizado.....	37
FIGURA 8	Eletoforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio dos produtos de restrição enzimática para genotipagem do polimorfismo G-2548A.....	39
FIGURA 9	Distribuição dos alelos da 3'HVR do gene da leptina (<i>LEP</i>) em indivíduos obesos (n = 100) e não-obesos (n = 110)	50
FIGURA 10	Comparação dos valores de índice de massa corporal (IMC) e de circunferência abdominal (CA) entre indivíduos portadores de alelos da classe I (genótipos I/I + I/II) e indivíduos com genótipo II/II.....	53
FIGURA 11	Distribuição dos alelos da região hipervariável D2S1788 (<i>POMC</i>) em indivíduos obesos (n = 100) e não-obesos (n = 110)	54
FIGURA 12	Distribuição dos alelos da região hipervariável D18S858 (<i>MC4R</i>) em indivíduos obesos (n = 100) e não-obesos (n = 110)	56
FIGURA 13	Distribuição dos alelos da região hipervariável D1S200 (<i>LEPR</i>) em indivíduos obesos (n = 96) e não-obesos (n = 87)	59
FIGURA 14	Distribuição das frequências das combinações entre genótipos do polimorfismo <i>LEP</i> G-2548A e da <i>LEP</i> 3'HVR, nos indivíduos obesos e não-obesos.....	64

ÍNDICE DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1	<i>Condições das reações de amplificação em cadeia pela polimerase (PCR), para as regiões hipervariáveis (HVR) D1S200, D2S1788 e D18S858.....</i>	34
QUADRO 2	<i>Seqüências utilizadas para a correção dos tamanhos moleculares das HVR estudadas.....</i>	36
TABELA 1	<i>Dados biodemográficos dos indivíduos classificados como obesos e não-obesos.....</i>	42
TABELA 2	<i>Dados biodemográficos dos indivíduos participantes do estudo classificados por sexo.....</i>	43
TABELA 3	<i>Freqüências de fatores de risco para Doença Cardiovascular (DCV) em indivíduos do grupo total com e sem DCV.....</i>	44
TABELA 4	<i>Dados das determinações bioquímicas dos indivíduos obesos e não-obesos.....</i>	45
TABELA 5	<i>Freqüências de genótipos e alelos do polimorfismo LEP G-2548A em indivíduos agrupados como obesos e não-obesos; de acordo com a distribuição de gordura corporal em indivíduos obesos; e de valores circunferência abdominal de risco para co-morbidades em obesos e não-obesos.....</i>	47
TABELA 6	<i>Comparação dos valores médios de índice de massa corporal, circunferência abdominal e relação cintura-quadril de acordo com os genótipos do polimorfismo LEP G-2548A em todos os indivíduos (obesos e não-obesos).....</i>	48
TABELA 7	<i>Freqüências dos alelos da LEP 3'HVR em indivíduos obesos e não-obesos.....</i>	49
TABELA 8	<i>Freqüências de genótipos e alelos do polimorfismo LEP 3'HVR em indivíduos agrupados como obesos e não-obesos; de acordo com a distribuição de gordura corporal em indivíduos obesos; e de valores circunferência abdominal de risco para co-morbidades em obesos e não-obesos.....</i>	51
TABELA 9	<i>Comparação dos valores médios de índice de massa corporal, circunferência abdominal e relação cintura-quadril de acordo com os genótipos do polimorfismo LEP 3'HVR em todos os indivíduos (obesos e não-obesos).....</i>	52
TABELA 10	<i>Freqüências dos alelos da HVR D2S1788 (POMC) em indivíduos obesos e não-obesos.....</i>	55

ÍNDICE DE QUADROS E TABELAS (continuação)

TABELA 11	<i>Freqüências dos alelos da HVR D18S858 (MC4R) em indivíduos obesos e não-obesos.....</i>	57
TABELA 12	<i>Freqüências de portadores dos alelos 41 ou 42 da HVR D18S858 (MC4R) entre indivíduos agrupados como obesos e não-obesos; de acordo com a distribuição de gordura corporal em indivíduos obesos; e de valores circunferência abdominal de risco para co-morbidades em obesos e não-obesos.....</i>	58
TABELA 13	<i>Valores de índice de massa corporal, circunferência abdominal e relação cintura-quadril de portadores de alelos 41 ou 42 da HVR D18S858 (MC4R), em indivíduos do grupo total (obesos e não-obesos).....</i>	58
TABELA 14	<i>Freqüências dos alelos da D1S200 (LEPR) em indivíduos obesos e não-obesos.....</i>	60
TABELA 15	<i>Freqüências de portadores do alelo 17 da HVR D1S200 (LEPR) entre indivíduos agrupados como obesos e não-obesos; de acordo com a distribuição de gordura corporal em indivíduos obesos; e de valores circunferência abdominal de risco para co-morbidades em obesos e não-obesos.....</i>	61
TABELA 16	<i>Valores de índice de massa corporal, circunferência abdominal e relação cintura-quadril de portadores do alelo 17 da HVR D1S200 (LEPR), em indivíduos do grupo total (obesos e não-obesos).....</i>	62
TABELA 17	<i>Freqüência das combinações entre os genótipos dos polimorfismos LEP G-2548A e LEP 3'HVR nos indivíduos do grupo total (obesos e não-obesos).....</i>	63
TABELA 18	<i>Freqüências de haplótipos entre os polimorfismos LEP G-2548A e LEP 3' HVR em indivíduos agrupados como obesos e não-obesos; de acordo com a distribuição de gordura corporal em indivíduos obesos; e de valores circunferência abdominal de risco para co-morbidades em obesos e não-obesos.....</i>	65
TABELA 19	<i>Valores de índice de massa corporal, circunferência abdominal e relação cintura-quadril de acordo com os haplótipos do polimorfismo LEP G-2548A e da LEP 3'HVR, em indivíduos do grupo total (obesos e não-obesos).....</i>	65

Abreviaturas

ACTH.....	Hormônio adrenocorticotrófico
AgRP.....	Proteína <i>Agouti</i>
α -MSH.....	Hormônio estimulador do melanócito- α
apo AI.....	Apolipoproteína AI
apo B.....	Apolipoproteína B
ARC.....	Núcleo arqueado
CART.....	Fator de transcrição regulado pela cocaína e anfetamina
CpE.....	Carboxipeptidase E
CRH.....	Hormônio liberador de corticotrofina
DCV.....	Doença Cardiovascular
GLP-1.....	Peptídeo semelhante ao glucagon-1
HDL.....	Lipoproteína de alta densidade
HDL-C.....	Colesterol da HDL
HVR.....	Região hipervariável
IC 95%.....	Intervalo de Confiança de 95%
IMC.....	Índice de massa corporal
LDL.....	Lipoproteína de baixa densidade
LDL-C.....	Colesterol da LDL
<i>LEP</i>	Gene da leptina
<i>LEPR</i>	Gene do receptor de leptina
MC4R.....	Receptor de melanocortina-4
<i>MC4R</i>	Gene do receptor de melanocortina-4
NCHS.....	National Center of Health Statistics
NIH.....	National Institutes of Health
NPY.....	Neuropeptídeo Y
NPY ₁ R.....	Receptor de neuropeptídeo-1
NPY ₅ R.....	Receptor de neuropeptídeo-5
<i>OB</i>	Gene da leptina
OB-R.....	Receptor de leptina
OMS.....	Organização Mundial de Saúde
OR.....	<i>Odds Ratio</i>
PC-1.....	Pró-hormônio convertase-1
PCR.....	Reação em cadeia pela polimerase
POMC.....	Pró-opiomelanocortina
<i>POMC</i>	Gene da pró-opiomelanocortina
PVN.....	Núcleo paraventricular
RCQ.....	Relação cintura-quadril
T ₄ livre.....	Tiroxina livre
TMR.....	Taxa metabólica de repouso
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
TSH.....	Hormônio estimulador da tireóide
VLDL.....	Lipoproteína de muito baixa densidade
VLDL-C.....	Colesterol da VLDL
VMN.....	Núcleo ventromedial

RESUMO

As variantes genéticas *LEP* G-2548A, *LEP* 3'HVR, D1S200 (*LEPR*), D18S858 (*MC4R*) e D2S1788 (*POMC*) foram avaliadas em 100 indivíduos obesos e 110 não-obesos brancos. A genotipagem desses indivíduos foi realizada por PCR e RFLP. As freqüências dos alelos *LEP* -2548G e *LEP* 3'HVR-Classe I no grupo de obesos foram maiores que de não-obesos ($P<0,05$). O haplótipo *LEP* G/I foi mais freqüente em obesos ($P=0,018$) e nos indivíduos com obesidade central ($P=0,047$). As freqüências dos alelos 41/42 da D18S858 e do alelo 17 da D1S200 foram maiores ($P<0,05$) em obesos. Os indivíduos com alelos *LEP* 3'HVR-Classe I, 41/42 da D18S858 e 17 da D1S200 apresentaram valores mais altos de índice de massa corporal (IMC) e circunferência abdominal ($P<0,05$). Em conclusão, as variantes *LEP* G-2548A, *LEP* 3'HVR, D18S858 e D1S200 estão associadas com a obesidade e com variações nos valores de IMC e circunferência abdominal em indivíduos brasileiros brancos.

ABSTRACT

The genetic variants *LEP* G-2548A, *LEP* 3'HVR, D1S200 (*LEPR*), D18S858 (*MC4R*) D2S1788 (*POMC*) were studied in groups of 100 obese and 110 non-obese white individuals. Genotyping were carried out by PCR and RFLP techniques. Alleles frequencies from *LEP* -2548G and Class I alleles from *LEP* 3'HVR were higher in obese group, when compared to non-obese group ($P<0,05$). The *LEP* G/I haplotype was more frequent in obese subjects ($P=0,018$) and in individuals with central obesity ($P=0,047$). Alleles 41/42 from D18S858 and allele 17 from D1S200 were more frequent ($P<0,05$) in obese subjects. Individuals carrying *LEP* 3'HVR-Class I, alleles 41/42 from D18S858 and allele 17 from have shown elevated body mass index (BMI) and waist circumference values ($P<0,05$). In conclusion, the *LEP* G-2548A, *LEP* 3' HVR, D1S200, and D18S858 genetic variants were found to be associated to obesity and variations in BMI and waist circumference in Brazilian white individuals.

1. INTRODUÇÃO

A obesidade pode ser definida como excesso de peso relacionado ao aumento do acúmulo de gordura corporal, quando associado a complicações metabólicas tais como resistência à insulina, hipertensão, diabetes e doenças cardiovasculares, particularmente quando o excesso de gordura corporal está localizado na cavidade abdominal (TREMBLAY e DOUCET, 2000).

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 a relação entre a medida de massa corporal total, em quilogramas, dividida pelo quadrado da medida da altura, em metros. O IMC é um parâmetro muito utilizado nos estudos de obesidade (WHO, 2000; NHLBI, 2000; JAMES *et al.*, 2001).

A circunferência abdominal representa a medida do perímetro da secção horizontal imediatamente acima da crista ilíaca, com uma fita métrica inextensível sobre a pele nua do indivíduo, iniciada a partir de uma linha vertical midi-axilar imaginária em seu lado direito. O indivíduo deve estar em pé, respirando normalmente (NHLBI, 2000).

A RCQ é também medida com fita métrica, sendo que, a medição da cintura deve ser realizada da mesma forma que a da circunferência abdominal e a medida do quadril, que corresponde ao maior perímetro na região glútea (MONTEIRO, 1998a).

Há também outros parâmetros de avaliação de distribuição e de acúmulo de gordura, como a plicometria, a medida da densidade corporal, a excreção urinária de creatinina e métodos comparativos por imagem (FLASO, 1998). A plicometria se baseia na medição da espessura de dobras (ou pregas) cutâneas com um plicômetro (ou calibre, um instrumento de medição em forma de pinça).

Existem outras formas de determinação da quantidade e distribuição de gordura corporal, que envolvem propriedades físicas (condutividade elétrica, impedância bioelétrica, ativação de nêutrons, absorciometria de fótons) e químicas (medição da água corporal, medição do potássio corporal), que, no entanto, não são práticas, são demoradas e/ou extremamente dispendiosas (MONTEIRO, 1998a).

Dentre todas as formas de medida da gordura corporal, o IMC é a de mais fácil aplicação e execução, e representa um parâmetro aceitável para avaliação e acompanhamento de alterações da massa corporal (NHLBI, 2000). A classificação de variações de massa do *National Center for Health Statistical* (NCHS) empregava os valores de IMC superiores a 27,3 kg/m² para mulheres e 27,8 kg/m² para homens, admitindo-se o sobrepeso como obesidade em menor grau, para classificar indivíduos obesos (MONTEIRO, 1998a). Atualmente, tanto o NCHS, quanto outros institutos de saúde, como o *National Heart, Lung and Blood Institute* (NHLBI) do *National Institutes of Health* (NIH) dos Estados Unidos adotaram os valores de IMC entre 25,0 e 29,9 kg/m² para indivíduos que exibem sobrepeso e acima de 30,0 kg/m² para indivíduos considerados obesos (WHO, 2000; NHLBI, 2000).

A distribuição da gordura corporal, na obesidade, pode ser classificada em andróide e ginóide. A obesidade andróide é também conhecida como superior ou central, na qual a gordura tende a se depositar em maior quantidade na parte superior do corpo, tanto na camada subcutânea, quanto na região intra-abdominal (MONTEIRO, 1998a). Para essa classificação, admite-se que os valores da RCQ sejam superiores a

0,95 para homens e 0,85 para mulheres (WAJCHENBERG, 2000). Na obesidade ginóide ou femoroglútea, observa-se um maior depósito de gordura abdominal e em áreas inferiores, com valores de RCQ menores a 0,85 e 0,75, para homens e mulheres, respectivamente (MONTEIRO, 1998a).

As medidas de IMC, circunferência abdominal ou RCQ podem ser utilizadas não somente para avaliação e classificação dos depósitos de gordura do indivíduo, como também, no acompanhamento de tratamentos de redução de peso e avaliação de riscos de co-morbididades (NHLBI, 2000). Esses valores devem ser avaliados de acordo com algumas características do indivíduo, como a idade, a constituição física, etnia e a presença de distúrbios que alterem a estrutura física do paciente. Essas características podem modificar os valores de IMC, de uma forma geral (MONTEIRO, 1998a).

No estudo multicêntrico *Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Diseases* (MONICA), coordenado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) realizado entre 1987 e 1992, foram coletados dados de IMC, RCQ e circunferência abdominal de indivíduos em 39 centros de pesquisa de 26 países (MOLARIUS *et al.*, 1999). Nesse trabalho, foi considerada a medida da circunferência abdominal para o estabelecimento da terapia de controle de peso sugerida por LEAN *et al.* (1995). A sensibilidade desse parâmetro foi reduzida para algumas populações que apresentaram medidas de circunferência abaixo dos valores de corte em indivíduos com elevados IMC e RCQ. Essas observações sugerem que os valores de IMC podem ser aplicáveis a quaisquer populações, enquanto que as medidas de corte para circunferência abdominal tendem a serem específicas para cada população (MOLARIUS *et al.*, 1999).

1.1. Epidemiologia da obesidade e doenças associadas

Atualmente, estima-se que 44,3 milhões de adultos nos EUA sejam obesos, sendo que, desse total, 21,4 milhões são homens e 22,9 milhões são mulheres (MOKDAD *et al.*, 2001). De acordo com os dados obtidos na página do NCHS na Internet (CDC, 2004), a prevalência do excesso de peso e da obesidade em adultos norte-americanos era de 56%, em 1999. Entre 1991 e 2001, essa taxa elevou-se de 45% para 58%. Em 2001, a prevalência de sobrepeso em homens e em mulheres foi de 65,9%, e 49,9%, respectivamente (MOKDAD *et al.*, 2001). Nos países desenvolvidos, a proporção de indivíduos que apresentam sobrepeso ou obesidade é alta, excetuando-se países como a Suécia e o Japão (MONTEIRO, 1998b).

No Brasil, os dados disponíveis entre as décadas de 80 e 90 indicam que 27% dos homens e 40% das mulheres apresentam IMC superior a 25 kg/m² (FLASO, 1998). De acordo com dados da OMS, a prevalência de obesidade no Brasil, em 1989, foi cerca de 6% em homens e de 13% em mulheres (WHO, 2000). Nos demais países da América Latina, mais de 30% de homens e mulheres apresentam valores elevados de IMC, sendo que o Uruguai exibe a maior prevalência (50%, tanto para homens quanto para mulheres) (FLASO, 1998).

Em estudo realizado com brasileiros residentes na cidade do Rio de Janeiro (RJ), entre 1995 e 1996, foi observado que 44,8% das mulheres e 44,9% dos homens exibiam sobrepeso (IMC $\geq$ 25 kg/m²). Quando comparado com dados da mesma região, em estudos anteriores, observou-se o aumento destes percentuais populacionais, aproximando-se aos de países como os EUA (MARINS *et al.*, 2001). Recentemente, em estudo com 10.522 indivíduos adultos, com mais de 20 anos de idade moradores das regiões nordeste e sudeste do Brasil, foi observado que 6,7% dos homens e 12,7% das mulheres eram obesos e 30,0% dos homens e 26,6% das mulheres apresentavam sobrepeso (ABRANTES *et al.*, 2003).

O excesso de massa corporal causa diversas anormalidades e complicações relativas à saúde dos portadores de obesidade. Em civilizações antigas, a obesidade era relacionada a traços de personalidade, como a preguiça e má índole. Atualmente, a obesidade é associada a diversos distúrbios respiratórios, doenças músculo-esqueléticas, doenças e alterações vasculares e cardiovasculares, além de disfunções metabólicas, hormonais e alterações morfofuncionais (REPETTO, 1998).

Com base em dados do *American Cancer Society*, MONTEIRO (1998a) observou que ocorre aumento da mortalidade relativa para valores de IMC abaixo de 20,0 kg/m² e acima de 25,0 kg/m². Em termos gerais se aceita que o menor risco de morbi-mortalidade corresponde ao IMC dentro do intervalo de 20 a 25 kg/m² para indivíduos adultos até 40 anos de idade. Acima desta idade, esta faixa estende-se até 27 kg/m². Estudos prospectivos recentes têm confirmado a elevação no risco de morte por causas diversas de acordo com o aumento do IMC a partir de 23 kg/m² (BAIK *et al.*, 2000; BENDER *et al.*, 2002; ENGELAND *et al.*, 2003). Por outro lado, risco de morte é também elevado em indivíduos com IMC inferiores a 18 kg/m² (THOROGOOD *et al.*, 2003).

O risco de co-morbidade aumenta para indivíduos com IMC superiores a 25 kg/m², quando o valor de circunferência abdominal é superior a 102 cm para os homens e acima de 88 cm para as mulheres (NHLBI, 2000).

Apesar do risco de morbi-mortalidade associado à obesidade ser similar em todas as populações, o risco específico de co-morbididades associado a diferentes medidas de sobrepeso ou obesidade pode variar de acordo com a etnia, idade, sexo e condições sociais da população estudada (MOLARIUS *et al.*, 1999).

Entre as co-morbididades relacionadas à obesidade, podemos destacar a diabetes tipo 2, a hipertensão arterial sistêmica, as dislipidemias e as doenças cardiovasculares, entre outras (LABIB, 2003).

A diabetes tipo 2 é considerada a principal co-morbidade associada à obesidade, (ISMAIL e GILL, 2000). Segundo os critérios da *American Diabetes Association* (ADA) e da OMS, a massa corporal acima de 20% e o IMC superior a 27 kg/m² são indicados como os principais fatores de risco para a diabetes (SAKURAI, 2000). O risco relativo estimado de diabetes tipo 2 é 12,7 vezes maior em mulheres obesas e 5,2 em homens obesos (NAO, 2001).

Como citado anteriormente, a hipertensão também está associada com a obesidade. Em estudo realizado nos Estados Unidos entre os anos de 1988 e 1991 (*Third National Health and Nutrition Examination Survey - NHANES III*), foi observado que, aproximadamente, 35% dos 14.997 indivíduos estudados apresentavam valores elevados de pressão arterial. Entre indivíduos obesos (21% dos homens e 27% das mulheres) a prevalência de pressão arterial elevada observada foi cerca de 52% (MUST *et al.*, 1999).

A partir de estudos epidemiológicos realizados em diversas populações, o *National Audit Office* (NAO) do Reino Unido estimou o risco relativo de hipertensão foi 4,2 vezes maior em mulheres obesas que em mulheres magras. Em homens, esse risco foi 2,6 vezes maior em obesos (NAO, 2001).

A partir de dados obtidos na Campanha Nacional de Alerta sobre o Colesterol Elevado (2002), realizado com 81.262 indivíduos de diversas cidades do Brasil, a prevalência de histórico familiar de hipertensão foi de 19% (MARTINEZ *et al.*, 2003). A prevalência de hipertensão pode variar de acordo com a localidade, como, por exemplo, 24,6% encontrados em indivíduos moradores da Ilha do Governador, Rio de Janeiro (RJ), ou 36,5% de hipertensos na população do vilarejo de Cavungé (Ipecaetá/BA) (KLEIN *et al.* 1995; MATOS e LADEIA, 2003). Em indivíduos idosos, ocorre elevação dessa prevalência. Entre 847 indivíduos com mais de 60 anos moradores de Londrina/PR, 70% dos homens e 53,8% das mulheres eram hipertensos (CABRERA e JACOB FILHO, 2001).

Outros estudos realizados entre as décadas de 80 a 90 em diferentes regiões do país, relataram que a prevalência de hipertensão variou entre 14% a 35,1% (CHOR, 1998; FUCHS *et al.*, 2001; FREITAS *et al.*, 2001). Essa variação foi associada a diversos fatores, tais como: sexo, idade, condições sociais, tipo de ocupação profissional e outros dados demográficos (FREITAS *et al.*, 2001). Indivíduos brasileiros obesos também apresentaram elevada prevalência de hipertensão arterial. Entre indivíduos com IMC superiores a 27,0 kg/m², moradores da cidade de Porto Alegre (RS), 22,6% dos homens e 20,9% das mulheres eram hipertensos (GUS *et al.*, 1998).

Outro estudo, realizado em Catanduva (SP) revelou que 55,8% dos indivíduos com IMC superior a 40,0 kg/m² apresentaram hipertensão, sendo que em indivíduos com IMC entre 20,0 e 24,9 kg/m² o percentual observado foi de 20,6% (FREITAS *et al.*, 2001). Valores semelhantes de prevalência foram observados em Fortaleza (CE). A prevalência da hipertensão observada em 317 indivíduos foi de 25,6%, sendo que, entre obesos esse valor se elevou para 57,4% (SABRY *et al.*, 2002).

HALL *et al.* (2003), revisaram diversos estudos e relacionaram os possíveis mecanismos pelos quais os indivíduos obesos poderiam desenvolver hipertensão. Foi observado, tanto em animais quanto em humanos, que ganhos de massa repentinos levam à alterações hemodinâmicas como o aumento do fluxo sanguíneo regional, por mecanismos ainda não elucidados, e do débito cardíaco, requerido para irrigação do tecido adiposo extra. Além disso, indivíduos obesos têm atividade simpática aumentada e maior retenção de sódio, causada pelo aumento de reabsorção tubular renal de sódio devido à ativação do sistema renina-angiotensina (HALL *et al.*, 2003).

As dislipidemias também podem estar associadas com a obesidade. Estudos longitudinais mostraram que a elevação do IMC, independentemente do sexo do indivíduo, estava relacionada com concentrações séricas aumentadas de colesterol total e triglicerídeos

(DENKE *et al.*, 1993; DENKE *et al.*, 1994) e concentrações reduzidas de colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL-C) (GLUECK *et al.*, 1980).

Um estudo realizado com gêmeos idênticos, em que apenas um deles apresentava obesidade, mostrou que o sobrepeso de 18 kg estava associado com 20% de aumento na concentração plasmática do colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL-C), 90% de aumento nos triglicerídeos, e 22% de redução no HDL-C (RÖNNEMAA *et al.*, 1998).

Estudos mais recentes mostram que a obesidade, particularmente a obesidade central, parece estar associada somente a concentrações mais altas de lipoproteínas ricas em triglicerídeos e menores concentrações de HDL-C (MACLEAN *et al.*, 2000; HU *et al.*, 2000). No *Strong Heart Study*, HU *et al.* (2000) observaram que o aumento de 60% no IMC (ou seja, de 25 para 40 kg/m²) estava associado à elevação de 6,1% na concentração de triglicerídeos e redução de 12,8% na concentração HDL-C, em mulheres. Em homens, os valores observados foram substancialmente maiores, 64,9% e 25,5%, respectivamente.

A análise comparativa das sub-populações de lipoproteínas, em mulheres brancas e negras norte-americanas, evidenciou que há correlação entre o aumento do IMC e o tamanho aumentado da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) e diminuído da lipoproteína de alta densidade (HDL), em brancas-americanas obesas. As mulheres obesas, brancas e negras, apresentaram ainda atividade aumentada da proteína de transferência de éster de colesterol (CETP) que é responsável pela transferência de éster de colesterol da LDL para a HDL e de triglicerídeos das VLDL para as HDL (MACLEAN *et al.*, 2000).

Em estudo recente, realizado com 1.039 habitantes da cidade de Campos de Goytacazes (RJ), foi detectada elevada prevalência de hipertrigliceridemia (30,6%) e de reduzidos valores de concentração de HDL-C (21,2%) em adultos obesos de ambos os sexos (SOUZA *et al.*, 2003).

A obesidade tem sido associada ao desenvolvimento precoce de aterosclerose, em indivíduos jovens (15 a 34 anos). Além disso, a obesidade, principalmente a obesidade visceral, tem sido relacionada com a doença cardiovascular (DCV), sobretudo na presença de fatores de risco para DCV, tais como diabetes tipo 2, hipertensão e dislipidemia (SOWERS, 2003).

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).

Como resultado da análise multivariada dos dados obtidos durante o acompanhamento de 5.209 indivíduos que participaram do *Framingham Heart Study*, considerando-se a presença de outros fatores de risco (idades, tabagismo, diabetes, hipercolesterolemia e hipertensão), foi observado que indivíduos obesos ($\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) apresentam risco relativo elevado para DCV (WILSON *et al.*, 2002). Foi observado em um estudo com 2.558 indivíduos brasileiros (1279 pares caso-controle) que a obesidade ($\text{IMC} > 30 \text{ kg/m}^2$) está associada ao aumento no risco ($\text{OR} = 1,58$) de infarto agudo do miocárdio (PIEGAS *et al.*, 2003).

A obesidade é um fator de risco independente para doenças relacionadas (diabetes, hipertensão, dislipidemia e DCV), que têm elevado custo de tratamento. Por isso a obesidade tem alto impacto econômico (KORTT *et al.*, 1998).

O custo total atribuído aos cuidados médicos para o tratamento da obesidade e das co-morbidades associadas tem elevado os gastos com saúde, em países industrializados. Nos EUA, esse custo chegou a 99,2 bilhões de dólares, em 1995, o que representou 5,7% das despesas nacionais com saúde (MONTEIRO, 1998b). Estima-se que esse percentual

poderia ter atingido até 7,0%, a partir de dados publicados entre 1999 e 2001 (THOMPSON *et al.*, 2001).

No Brasil, de acordo com dados fornecidos pelo DATASUS/Ministério da Saúde, (DATASUS, 2004), no período entre novembro de 2002 a outubro de 2003, foi registrada a média mensal de 308 internações, pelo Sistema Único de Saúde (SUS), de pacientes portadores de doenças endocrinológicas nutricionais e metabólicas relacionadas à obesidade. O gasto total do SUS com o tratamento desses pacientes durante esse período foi de R\$6.433.556,13.

Considerando os altos índices de sobrepeso e obesidade nas populações, há necessidade de se realizar o diagnóstico precoce, identificar os fatores de risco e estabelecer o tratamento preventivo, principalmente na infância e na adolescência, procurando minimizar o alto impacto econômico do tratamento da obesidade e das co-morbidades relacionadas.

1.2. Fisiopatologia da obesidade

A característica mais visível e inerente do indivíduo obeso é o acúmulo de gordura, o que leva a crer que o obeso ingere mais calorias do que seu organismo pode consumir (FLASO, 1998). O desequilíbrio entre a obtenção e gasto de energia favorecendo ao acúmulo da energia não consumida, da qual depende o estabelecimento da obesidade, pode resultar, não só da ingestão excessiva de alimentos, mas, também de reduzido gasto de energia. O acúmulo de valores pequenos de energia, tais com 10 kcal por dia, podem levar ao ganho de 0,45 kg de peso ao ano. Após décadas, esse acúmulo crônico de energia pode tornar-se clinicamente importante (RACETTE *et al.*, 2003; CUMMINGS e SCHWARTZ, 2003).

O processo biológico responsável pelo equilíbrio entre a energia adquirida e consumida é conhecido como homeostase energética. Apesar das variações na quantidade de energia ingerida na alimentação diária, o

gasto total de energia é regulado para que não haja uma diferença superior a 0,2% entre a energia ingerida e consumida (KAPLAN, 2003).

A homeostase energética é coordenada primariamente pelo hipotálamo, por meio de uma rede de sinalização hormonal e impulsos aferentes, recebidos de diversas fontes: fígado, pâncreas, trato gastrointestinal, córtex cerebral e tecido adiposo. Os sistemas regulatórios coordenados pelo hipotálamo são complexos e envolvem o controle de apetite e saciedade, o transporte de nutrientes e regulação do metabolismo, o gasto de energia em repouso (por meio do sistema nervoso simpático) e a atividade física (KAPLAN, 2003).

As células do tecido adiposo branco produzem e secretam leptina, um peptídeo de 16 kDa, que é liberado na corrente sanguínea e atua nos neurônios de regiões relacionadas ao apetite no hipotálamo, por meio de interação com receptores específicos. O aumento da concentração de leptina informa, dessa forma, ao hipotálamo, por meio de uma intrincada via de controle da saciedade sobre o acúmulo excessivo de energia, resultando em redução do apetite e aumento do dispêndio de energia.

O aumento do volume de tecido adiposo e do diâmetro dos adipócitos, observado em indivíduos obesos, tem sido relacionado ao aumento na concentração plasmática de leptina (BATES e MYERS, 2003). A hiperleptinemia deveria desencadear o aumento do consumo de energia e redução do tecido adiposo, porém isso não tem sido observado em obesos. Essa resistência à leptina parece levar ao desequilíbrio do balanço energético, favorecendo ao acúmulo de excesso de energia (KASTIN e PAN, 2000; BATES e MYERS, 2003).

O acúmulo excessivo de energia e a conseqüente hipertrofia do tecido adiposo levam a resistência à insulina por mecanismos ainda desconhecidos, com possível envolvimento da leptina, do fator de necrose tumoral- α (TNF- α), da adiponectina e do receptor de peroxissomo proliferativo ativado- γ (PPAR- γ), secretados por adipócitos, além dos ácidos graxos livres (ZIMMET *et al.*, 1999; HABER *et al.*, 2002;

KADOWAKI *et al.*, 2003). Um estudo em adipócitos isolados de ratos indicou que a leptina é um agente inibidor dos efeitos metabólicos da insulina, como o transporte de glicose, a lipogênese e a síntese de glicogênio e de proteínas (MÜLLER *et al.*, 1997). Por outro lado, existem indícios de que a insulina estaria diretamente envolvida no aumento de concentração de leptina circulante (FRIED *et al.*, 2000).

A resistência à insulina desencadeia o aumento da secreção de insulina, resultando no hiperinsulinismo compensatório, que estimula o sistema nervoso simpático, e pode estar vinculado ao surgimento de hipertensão em indivíduos obesos (ROCCHINI, 2000; HAFFNER e TAEGTMEYER, 2003).

O hipercortisolismo está associado à obesidade em disfunções hormonais que levam à hipersecreção do cortisol, como na Síndrome de Cushing. Certas características clínicas relacionadas ao hipercortisolismo, como a forma de distribuição central da gordura e a presença de hipertensão, resistência à insulina e dislipidemia, levou a se relacionar a obesidade a alterações no eixo hipotálamo-hipófise-supra-renal (BJÖRNTORP, 2000). Entretanto, essa associação não se confirmou, devido ao fato de indivíduos obesos apresentarem concentrações normais de cortisol. Por outro lado, a hipersensibilidade ao cortisol exibida por indivíduos portadores de obesidade visceral pode estar associada ao aparecimento de co-morbidades relacionadas à obesidade, por mecanismos ainda não estabelecidos (BJÖRNTORP, 2000; BJÖRNTORP e ROSMOND, 2000).

O aumento do volume do tecido adiposo leva também ao aumento da secreção de algumas citocinas produzidas pelos adipócitos, as adipocitocinas inibidor do ativador de plasminogênio-1 (PAI-1), *heparin binding EGF-like growth factor*, TNF- α , interleucina-6 (IL-6), resistina e a adiponectina, que estão associadas diretamente a doenças relacionadas à obesidade (SOWERS, 2003; MATSUZAWA *et al.*, 2003).

1.3. Componentes do balanço energético

No balanço energético existem dois componentes principais: a taxa de aquisição de energia, ou a energia obtida na alimentação; e a taxa de gasto energético.

A taxa de gasto de energia é o produto da somatória de três componentes: (1) taxa metabólica em repouso (TMR) que é a energia gasta por um indivíduo em repouso no leito pela manhã, em estado de jejum e sob condições ambientais confortáveis, incluindo-se o gasto com a manutenção dos sistemas metabólicos e da temperatura; (2) termogênese; e (3) atividade física (WALDER e RAVUSSIN, 1998).

A equação do balanço energético, definida pela diferença entre as taxas de aquisição e gasto de energia, tem como resultado a taxa de armazenamento de energia. A taxa de armazenamento de energia pode ser modificada pela ingestão de alimentos, controlada pelo apetite. O apetite depende de três níveis de regulação: 1) o nível de eventos psicológicos (percepção da fome, desejo de comer, sensações hedônicas) e operações comportamentais (refeições, lanches, ingestão de energia e macro-nutrientes); 2) o nível de eventos fisiológicos e metabólicos periféricos; e 3) o nível de interações metabólicas e de neurotransmissores no cérebro. Eventos neurais desencadeiam e orientam o comportamento, mas cada ato comportamental envolve uma resposta fisiológica periférica que se traduz por atividades cerebrais. As atividades cerebrais estabelecem tanto a motivação para comer quanto à disposição para abster-se da alimentação (saciedade) (BLUNDELL, 1998).

O trato gastrointestinal possui receptores que monitoram a atividade fisiológica e informam ao cérebro, principalmente através do nervo vago, sobre os tipos e quantidades de nutrientes ingeridos. Esses nutrientes, somados as enzimas digestivas secretadas durante o processo de digestão, agem sobre quimiorreceptores que, juntamente com estímulos mecânicos, como a distensão gástrica atuando em mecanorreceptores, fazem parte do controle de apetite pré-absortivo. A fase pós-absortiva se inicia quando os

nutrientes são digeridos e absorvidos pelo intestino para serem transportados pelo sistema circulatório.

Os nutrientes ou seus metabólitos são responsáveis pela sinalização neuronal, através da ligação a quimiorreceptores específicos do cérebro, e podem influenciar a síntese de neurotransmissores ou alterar algum aspecto do metabolismo neuronal (BLUNDELL, 1998). O balanço entre os sinais gerados pelos eventos pré e pós-absortivos são definidos como sinais de saciedade. Existem evidências de que a colecistocinina (CCK) (GUTZWILLER *et al.*, 2000), o peptídeo semelhante ao glucagon do tipo 1 (GLP-1) (LAVIN *et al.*, 1998; VAN DIJK e THIELE, 1999), o polipeptídeo inibidor gástrico (GIP) (LAVIN *et al.*, 1998), a bombesina (YAMADA *et al.*, 2002), a grelina (CUMMINGS *et al.*, 2002) e a somatostatina (LIEVERSE *et al.*, 1995; PERACCHI *et al.*, 1998) desempenham um papel importante no controle da saciedade (BLUNDELL, 1998; BRAY, 2000).

A regulação do apetite e da saciedade envolve a ação concomitante de diversos neurotransmissores e neuromoduladores, através de vias metabólicas e neuroendócrinas. Neuromoduladores circulantes, como, por exemplo, o TNF- α (KERN, 1997), juntamente com algumas outras citocinas (LANGHANS e HRUPKA, 1999), podem operar como sinalizadores periféricos, atuando sobre a depleção ou reposição das reservas de energia (BLUNDELL, 1998). Alguns peptídeos como a enterostatina (ERLANSON-ALBERTSSON e YORK, 1997; BRAY, 2000) e o GLP-1 (VAN DIJK e THIELE, 1999), podem apresentar esta mesma característica. Respostas do sistema nervoso central, mediadas pelos receptores de serotonina (5-HT_{1B} e 5-HT_{2C}), também podem estar ligadas à modulação do apetite (BLUNDELL, 1998; DE VRY e SCHREIBER, 2000).

As reservas energéticas do tecido adiposo atuam no controle da saciedade, através de um sinal lipostático desencadeado pela leptina. A leptina exibe, principalmente, um papel na regulação da saciedade, ou seja, diminuindo a intensidade do apetite e elevando o consumo energético

(BAILE *et al.*, 2000). Os efeitos da leptina são mediados pela síntese e liberação de neuropeptídeos efetores em áreas específicas do cérebro. Dentre os neuropeptídeos já identificados, podemos citar o hormônio estimulador do melanócito- α (α -MSH) e o neuropeptídeo Y (NPY) (COWLEY, 2003; PEDRAZZINI *et al.*, 2003).

A leptina circulante atravessa a barreira hemato-encefálica e exerce ação inibitória sobre o apetite e estimulatória no gasto de energia ao se ligar a isoforma b do receptor de leptina (OB-Rb), preferencialmente expressa nos núcleos ventromedial (VMN), arqueado (ARC) e paraventricular (PVN) do hipotálamo.

Seis diferentes isoformas do receptor da leptina (OB-Ra a OB-Rf) são produzidas por processamento alternativo do mRNA do gene do receptor de leptina (*LEPR*). A forma OB-Rb apresenta um domínio intracelular longo e é encontrada em maior quantidade no hipotálamo. As demais isoformas do OB-R, mais curtas, podem ser encontradas em outros tecidos, e principalmente, na barreira hemato-encefálica, onde, provavelmente, promovem o transporte da leptina, possivelmente por meio de transcitose (GOLDEN *et al.*, 1997).

Apesar de ainda não serem conhecidos os mecanismos de transporte da leptina através da barreira hemato-encefálica, estudos em ratos confirmam que as isoformas curtas do OB-R podem estar envolvidas na passagem da leptina através da barreira hemato-encefálica. Existem, entretanto, indícios da existência de outros mecanismos envolvidos no transporte através da barreira hemato-encefálica (KASTIN e PAN, 2000; BATES e MYERS, 2003).

O transporte de leptina através da barreira hemato-encefálica por meio de seus receptores parece ser um passo limitante da ação da leptina nos neurônios do hipotálamo. Em estudos com ratos foi observado que, a partir de concentrações de leptina periférica acima de 5 ng/mL nesses animais, não se mantinha a correlação entre as concentrações de leptina plasmática e no líquido cérebro-espinal (UNGER, 2000). Esta observação

concorda com outros achados, onde a administração de elevadas concentrações de leptina na circulação periférica de ratos levou, inclusive, à redução da concentração de leptina no líquido cérebro-espinhal. Isso poderia explicar um dos mecanismos de resistência à leptina, já que, em camundongos e macacos hiperfágicos obesos, foram observadas diferentes respostas, como a redução da alimentação e de peso, resultante da administração de leptina diretamente no líquido cérebro-espinhal (KASTIN e PAN, 2000).

A ligação da leptina ao OB-Rb, no hipotálamo, estimula a produção do polipeptídeo pró-ópiomelanocortina (POMC) nos neurônios do ARC (HESHKA e JONES, 2001; KRUEDE e GRÜTERS, 2000). A POMC recém-produzida sofre ação das enzimas pró-hormônio convertase-1 (PC1) e carboxipeptidase E (CpE) e dá origem a proteínas ativas, entre elas, o hormônio estimulador do melanócito (melanocortina) dos tipos α e γ (α -MSH e γ -MSH) (ZHANG *et al.*, 1999; KRUEDE e GRÜTERS, 2000).

O α -MSH liberado nas terminações dos neurônios do ARC, se liga a receptores de melanocortina, entre eles o receptor da melanocortina do tipo 4 (MC4R). O MC4R pertence à superfamília dos receptores acoplados à proteína G, e é expresso em diversas regiões do cérebro, principalmente no hipotálamo e no núcleo motor do nervo vago (ADAN e GISPEN, 1997). A ligação do α -MSH ao MC4R no hipotálamo estimula a secreção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH). O CRH estimula a produção de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela hipófise, que por sua vez estimula a produção de cortisol e outros glicocorticóides pelo córtex supra-renal (eixo hipotalâmico-hipofisário-supra-renal). Ocorre, então, a inibição da ingestão de alimentos e o estímulo do gasto de energia por meio de mecanismos ainda desconhecidos (LU *et al.*, 2003).

Essa via de ativação da taxa de consumo de energia, denominada via melanocortina hipotalâmica, desempenha um importante papel no controle do balanço energético mediando algumas respostas centrais a leptina, conforme ilustrado na **FIGURA 1** (SATOH *et al.*, 1998; KRUEDE e

GRÜTERS, 2000; BAILE *et al.*, 2000; RAHMOUNI e HAYNES, 2001; PRITCHARD *et al.*, 2002).

VIA DA MELANOCORTINA HIPOTALÂMICA

FIGURA 1. Via da melanocortina hipotalâmica. A leptina produzida nos adipócitos sinaliza, por meio de seus receptores, para a produção de pró-ópiomelanocortina (POMC) em neurônios do núcleo arqueado (ARC), no hipotálamo, que expressam POMC e o fator de transcrição regulado pela cocaína e anfetamina (CART), e para a inibição da expressão do NPY em neurônios do ARC que expressam neuropeptídeo Y (NPY) e proteína *Agouti* (AgRP). Após sofrer a ação da pró-enzima convertase (PC-1) e da carboxipeptidase E (CpE), a POMC adquire sua forma ativa, o hormônio estimulador do melanócito do tipo α (α -MSH) que, ligada ao receptor de melanocortina-4 (MC4R) aumenta a saciedade e estimula o gasto de energia. O NPY tem efeito oposto ao da leptina (inibição da saciedade e diminuição do gasto energético) quando ligado aos seus receptores NPY₁R e NPY₅R (adaptado de LOOS e BOUCHARD, 2003).

O NPY é um potente orexígeno produzido e liberado por neurônios do ARC possivelmente em resposta ao jejum prolongado (BERTILE *et al.*, 2003). O NPY se liga a receptores específicos tipos Y₁ (NPY1R) e Y₅ (NPY5R) expressos no núcleo paraventricular (PVN), estrutura hipotalâmica relacionada ao comportamento alimentar (**FIGURA 1**). O NPY estimula o aumento da ingestão de alimentos e a redução no gasto de energia (INUI, 1999a; INUI, 1999b).

A leptina inibe a produção de NPY pelos neurônios do ARC, no hipotálamo (**FIGURA 1**), conforme foi observado em estudo com camundongos obesos *knockout* para o gene da leptina (*OB*, *LEP*) (SCHWARTZ *et al.*, 1996). Esse achado destaca a importância da interação entre a leptina e o NPY sobre a regulação do balanço energético, muito embora o NPY não seja o único modulador dos efeitos da leptina sobre o controle da saciedade e o gasto energético. Estudos com camundongos obesos *knockout* para ambos os genes *LEP* e *NPY*, mostraram que os duplos-mutantes apresentaram expressões fenotípicas atenuadas em relação aos camundongos *knockout* para o gene *LEP* (*ob/ob*), demonstrando que a supressão do NPY não foi suficiente para reverter a obesidade nesse modelo experimental (INUI, 1999a; BAILE *et al.*, 2000).

A proteína *Agouti* (AgRP) é outro neuropeptídeo produzido nos neurônios do ARC que impede a ligação do α -MSH ao MC4R e bloqueia a via da melanocortina por meio de antagonismo competitivo (**FIGURA 1**) (HASKELL-LUEVANO e MONCK, 2001).

Outros neuropeptídeos também podem participar do controle energético. Alguns estimulam a ingestão de alimentos e o acúmulo de energia, como a noradrenalina, a galanina, a orexina, o fator de liberação do hormônio de crescimento (GHRF) e o hormônio concentrador da melanina (MCH) (STUBBS, 1999; NONOGAKI, 2000; SAITO *et al.*, 2000; GUNDLACH, 2002; CAI *et al.*, 2002). Outros, como serotonina, dopamina, CRH e fator de transcrição regulado pela cocaína e anfetamina (CART), inibem a ingestão de alimentos (STUBBS, 1999; KUHAR *et al.*, 2000).

Alguns estudos utilizando ratos e camundongos como modelos experimentais têm auxiliado na compreensão das funções e algumas interações entre esses neuropeptídeos. No entanto, seus mecanismos de ação em humanos não foram totalmente esclarecidos e permanecem sob investigação (LAWRENCE *et al.*, 1999; INUI, 2000).

1.4. Alterações genéticas que podem estar associadas à obesidade

Na origem da obesidade estão envolvidos fatores genéticos, metabólicos e endócrinos, psicossociais e culturais-nutricionais que conferem um caráter multifatorial a essa doença. Existe uma clara tendência de membros de uma família possuírem IMC similar, o que sugere que o ambiente familiar pode contribuir para o desenvolvimento da obesidade (FLASO, 1998).

Um estudo realizado com 1.974 pares de gêmeos monozigóticos e 2.097 dizigóticos acompanhou por 25 anos as variações dos valores de IMC desses indivíduos. Foi observada uma maior concordância entre os valores de IMC entre os pares de gêmeos monozigóticos (STUNKARD *et al.*, 1986a). 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 *et al.*, 1986b). Estima-se que a influência de fatores genéticos sobre o desenvolvimento da obesidade seja de 50-90% (MAES *et al.*, 1997; RACETTE *et al.*, 2003; CUMMINGS e SCHWARTZ, 2003).

O desenvolvimento da obesidade tem forte componente genético (MAES *et al.*, 1997; CUMMINGS e SCHWARTZ, 2003), porém ainda não se conseguiu constatar que mutações e polimorfismos de herança monogênica, recessiva ou dominante, sejam responsáveis pela determinação do fenótipo da obesidade. As bases genéticas da obesidade apontam para modelos de

herança poligênica, que incluem alterações em genes de proteínas envolvidas diretamente na regulação da ingestão, armazenamento e gasto de energia (VILLARES, 1998; ARNER, 2000; RANKINEN *et al.*, 2002), ou mesmo em outros genes relacionados a outros sistemas metabólicos, como o do receptor de LDL (MATTEVI, 2000; ARNER, 2000), e outros neuro-receptores (YUAN *et al.*, 2000; ARNER, 2001; LEINEWEBER *et al.*, 2004).

Experimentos em modelos animais (camundongos e ratos *knockout*) têm demonstrado que alterações em genes que codificam proteínas envolvidas no balanço energético são responsáveis pelo desenvolvimento da obesidade. Tais alterações são decorrentes de mutações na seqüência de nucleotídeos e podem produzir trocas de resíduos de aminoácidos na seqüência da proteína ou interrupção de sua decodificação, gerando proteínas truncadas.

As mutações também podem estar presentes em regiões regulatórias (promotoras ou intrônicas) ou em outras regiões não-codificadoras. Uma mutação que apresenta uma freqüência acima de 1% em determinada população é definida como polimorfismo (BEIGUELMAN, 1994).

Os tipos de mutações encontradas no genoma humano podem ser classificados como substituições, deleções, inserções, inserções-deleções, expansões repetitivas e rearranjos complexos (incluindo inversões) (COOPER *et al.*, 1998).

As mutações estáveis resultantes da substituição de um único nucleotídeo são denominadas *single nucleotide polymorphism* (SNP), e estão entre as formas mais comuns de alteração genética e podem estar contidas em seqüências codificadoras, intrônicas ou em regiões promotoras de genes. As SNP têm sido relacionadas a disfunções metabólicas, incluindo a obesidade, e variações na resposta à terapia farmacológica (TAYLOR *et al.*, 2001; IRIZARRY *et al.*, 2002; CHAGNON *et al.*, 2003).

Nas mutações das classes inserção, deleção ou inserção-deleção, os segmentos de DNA são inseridos e/ou subtraídos. Esses tipos

de mutações podem ser denominados micro-deleções ou micro-inserções quando o tamanho dos fragmentos inseridos ou deletados não ultrapassa 20 bp. Essas mutações foram descritas em diversos genes, como, por exemplo, a inserção/deleção do pentanucleotídeo CTTTA na região 3' não-codificante do *LEP*, que foi associada a elevadas concentrações de insulina em indivíduos finlandeses obesos (OKSANEN *et al.*, 1998).

As regiões hipervariáveis (HVR) encontradas em regiões não-codificadoras do genoma, são constituídas de repetições consecutivas de seqüências DNA. As unidades de repetição podem ser seqüências curtas (dois a quatro pares de bases) denominadas microssatélites ou *short tandem repeats* (STR), ou longas (acima de cinco pares de bases) denominadas minissatélites ou *variable number of tandem repeats* (VNTR) (RANKINEN *et al.*, 2002).

Na obesidade humana comum ocorre, provavelmente, uma interação de diversos genes de suscetibilidade, caracterizando a herança genética como poligênica (VILLARES, 1998). Os polimorfismos de microssatélites vêm sendo utilizados como ferramentas práticas na indicação de possíveis genes associados com fenótipos de doenças complexas, como a obesidade. Esses marcadores moleculares são denominados *Quantitative Trait Loci* (QTL) (THOMSON, 2001; RANKINEN *et al.*, 2002).

Foram observadas alterações em 71 genes, como os que codificam proteínas envolvidas na sinalização hipotalâmica da saciedade (*LEP*, *LEPR*, *POMC* e *MC4R*), que apresentavam associação com a obesidade (RANKINEN *et al.*, 2002). Dados atualizados a respeito de genes relacionados à obesidade podem ser encontrados na página da Internet "OBESITY Gene Map Database" (OBESITY, 2004).

1.4.1. Genes da leptina e do receptor da leptina

O gene da leptina (*OB* ou *LEP*) está localizado no braço longo do cromossomo 7 (7q31.3) e tem 3 éxons, sendo que as seqüências

codificadoras da proteína estão situadas nos éxons 2 (215 bp) e 3 (438 bp) (NIKI *et al.*, 1996). Os esquemas que ilustram a localização cromossômica e a estrutura do gene *LEP* encontram-se na **FIGURA 2**.

FIGURA 2. **A** – Localização do gene da leptina (*OB* ou *LEP*) no cromossomo 7 humano (GDB, 2004). **B** – Esquema do gene *OB*, incluindo o tamanho dos íntrons e a posição aproximada dos polimorfismos G-2548A e 3'HVR (modificado de KARVONEN *et al.*, 1998).

MAFFEI *et al.* (1996) detectaram a mutação silenciosa no códon 25 CAA/CAG (Gln25Gln) no *LEP* (*OB*) através da técnica do Polimorfismo de Conformação de Fita Simples (SSCP) em um único indivíduo entre 105 indivíduos obesos brancos e afro-americanos, concluindo que mutações na região codificadora do *OB* (*LEP*) seriam incomuns. Essa mesma alteração foi associada à obesidade mórbida em japoneses com IMC superior a 35 kg/m² (OHSHIRO *et al.*, 2000). Nesse estudo, a variante 25Gln *LEP*, como foi denominada, apresentou-se mais freqüente (8,5%) em um grupo de 53 japoneses com obesidade mórbida quando comparado com um grupo de indivíduos não-obesos (2,8%).

MAMMÈS *et al.* (1998) descreveram o polimorfismo *LEP* G-2548A, localizado na região promotora do *LEP* (*OB*) em 117

indivíduos franceses com sobrepeso. O alelo -2548A foi associado com maiores concentrações de leptina e menor redução de IMC, após dieta de baixo teor calórico, nas mulheres. Em estudo posterior, maior frequência do alelo -2548G foi observada em homens caucasianos franceses com sobrepeso (MAMMÈS *et al.*, 2000). Por outro lado, LE STUNFF *et al.* (2000) observaram que adolescentes obesas o genótipo homozigoto -2548AA tinham menores concentrações de leptina que as portadoras dos outros genótipos.

Ao estudar 15 regiões hipervariáveis próximas ao gene *LEP* em um grupo de 579 indivíduos pertencentes a 32 famílias de americanos-mexicanos, por meio de análise de ligação, DUGGIRALA *et al.* (1996) demonstraram uma forte ligação (*Logarithm of Odds*, LOD = 3,1) entre a HVR D7S514 e variações em fenótipos associados à obesidade (medidas de dobras cutâneas, concentrações de proinsulina e carboxipeptidase A1).

SHINTANI *et al.* (1996) descreveram uma HVR localizada na extremidade 3' do gene *LEP*, entre as regiões D7S514 e D7S530, que contém repetições da seqüência de nucleotídeos TTTC, denominada *LEP* 3'HVR (**FIGURA 2A**). Os autores observaram que os indivíduos japoneses com genótipos do polimorfismo *LEP* 3'HVR contendo alelos de menor tamanho (alelos de Classe I) tinham maior massa corporal que os portadores de alelos de maior tamanho (alelos de Classe II). Em estudo recente, observou-se que a frequência reduzida do alelo 226 bp (alelo da Classe II) foi associada com elevado IMC, em 181 americanos-samoanos (MCGARVEY *et al.*, 2002).

Outras regiões hipervariáveis próximas do gene *LEP* também foram estudadas em diferentes populações. A presença do alelo 7 da HVR D7S530 foi associada a elevadas concentrações séricas de leptina em indivíduos obesos mórbidos finlandeses, diferentemente dos indivíduos portadores do alelo 5, que exibiram menores concentrações de leptina sérica (OKSANEN *et al.*, 1997). Entretanto, esse marcador não foi associado a variações nos valores de IMC. ONIONS *et al.* (1998) revelaram, por meio de

análise de ligação, em 46 indivíduos afro-americanos hipertensos e seus irmãos, que a HVR D7S504 estava associada a variações nos valores de IMC. Por outro lado, os marcadores D7S1875; D7S635 e 3'HVR não apresentaram relação estatisticamente significativa com elevados valores de IMC (ONIONS *et al.*, 1998).

O **gene do receptor de leptina** (*LEPR* ou *OB-R*) é localizado no braço curto do cromossomo 1 (1p31). O *LEPR* é composto por 20 éxons, sendo que 18 deles são seqüências codificadoras que dão origem a uma molécula de mRNA com 3.800 bp (TARTAGLIA *et al.*, 1995). A representação gráfica da localização e da estrutura do *LEPR* é mostrada na **FIGURA 3**.

CLÉMENT *et al.* (1998), analisando uma família cujos membros apresentavam elevada prevalência de obesidade mórbida ($\text{IMC} \geq 50 \text{ kg/m}^2$), observaram que alterações no *LEPR* são co-segregadas com o fenótipo. A análise da região codificadora do *LEPR* por SSCP permitiu identificar uma substituição de G por A na junção entre o éxon 16 e o íntron 16, denominada IVS16+1G>A. Essa mutação foi associada com obesidade e disfunção pituitária nos indivíduos afetados.

FIGURA 3. A – Localização do *LEPR* e do locus D1S200 no cromossomo 1 humano (GDB, 2004). **B** – Esquema do gene *LEPR*, incluindo o tamanho dos íntrons, com exceção do íntron 2, de tamanho desconhecido (THOMPSON *et al.*, 1997).

Várias HVR próximas ao *LEPR* foram estudadas em diferentes populações. CHAGNON *et al.* (1997) estudaram os microssatélites D1S473, D1S200, D1S193 e D1S197, em um grupo de 137 indivíduos pertencentes a famílias da cidade de Quebec (Canadá). Por meio de análise de ligação, esses autores observaram que a HVR D1S200 (**FIGURA 3A**), que contém repetições da sequência de nucleotídeos CA, se correlacionou com variações nos valores de gordura corporal e IMC. As HVRs D1S198 e D1S515 também foram associadas com a obesidade em índios Pima do Arizona, EUA (THOMPSON *et al.*, 1997).

CHAGNON *et al.* (1999) estudaram duas HVR (repetições CA no íntron 3, e a microssatélite CTTT no íntron 16) e três polimorfismos do tipo SNP (K109R Q223R, K656N) do *LEPR*, em 679 indivíduos caucasianos moradores de Quebec (Canadá). Nesse estudo, o alelo 223Q do SNP Q223R foi associado com a redução na massa de gordura livre de indivíduos magros do sexo masculino. YIANNAKOURIS *et al.* (2001) observaram que o genótipo homozigoto 223RR do *LEPR* foi associado com o aumento de massa corporal (IMC > 25 kg/m²). Essa associação entre o genótipo homozigoto 223RR e valores aumentados de IMC foi também observada em indivíduos brasileiros caucasianos (MATTEVI *et al.*, 2002). A presença do alelo 223R foi relacionada à resistência a leptina em indivíduos holandeses (VAN ROSSUM *et al.*, 2003).

1.4.2. Genes da via da melanocortina hipotalâmica

O gene da **POMC** (*POMC*) está localizado no cromossomo 2p23, é composto por três éxons, e seu tamanho é de 7665 bp. O éxon 1 contém somente a região regulatória do gene. O éxon 3, de maior tamanho (833 bp) codifica para a α -MSH, entre outras proteínas (β -MSH e γ -MSH, ACTH, β -endorfina, entre outras) (RAFFIN-SANSON *et al.*, 2003). A localização cromossômica e a estrutura do *POMC* podem ser observadas na **FIGURA 4**.

FIGURA 4. A – Localização do gene *POMC* e do lócus D2S1788 no cromossomo 2 humano (GDB, 2004). **B** – Esquema do *POMC*. Os números indicam a posição dos nucleotídeos em relação início da sequência do gene. Estão indicadas as regiões correspondentes às proteínas originadas a partir da pró-proteína POMC (KRUE e GRÜTERS, 2000).

COMUZZIE *et al.* (1997) estudaram 191 microssatélites do *POMC* em 10 famílias (458 indivíduos) de origem americana-mexicana e demonstraram que a HVR D2S1788 (repetição GATA, **FIGURA 4A**) estava associada a 47% da variação na concentração sérica de leptina e 32% de variação na massa de gordura corporal desses indivíduos. Em estudo semelhante, realizado com 230 famílias de afro-americanos (720 indivíduos), foi observado que variação de até 56% na concentração plasmática de leptina foi associada a HVR D2S1788 (ROTIMI *et al.*, 1999).

HIXSON *et al.* (1999) realizaram um estudo no qual foram analisadas as freqüências dos haplótipos formados pela combinação dos polimorfismos *RsaI* da região promotora e C7566T (éxon 3) do *POMC*, em 337 indivíduos americanos-mexicanos participantes do *San Antonio Family Study* (SAFHS). Nesse estudo, foi observado que a presença do haplótipo R2/7566T estava associada a maiores concentrações de leptina sérica nesses indivíduos.

O **gene do receptor de melanocortina-4 (*MC4R*)** localiza-se no cromossomo 18p22, e é composto de um único éxon com 999 bp (LUBRANO-BERTHELIER *et al.*, 2003). Na **FIGURA 5**, está representado o braço longo do cromossomo 18, onde está localizado o *MC4R*.

Quatro mutações localizadas na região codificante do *MC4R* (Val50Met, Ser58Cys, Ile102Ser, e Ile170Val) foram identificadas em quatro crianças sem vínculo familiar que apresentavam obesidade grave (DUBERN *et al.*, 2001). No entanto, a expressão do fenótipo da obesidade revelou-se variável entre os familiares dessas crianças e que eram portadores dessas mutações.

FIGURA 5. Representação gráfica da extremidade do braço longo do cromossomo 18, com indicação das posições aproximadas do *MC4R* e da microsatélite D18S858 (GDB, 2004).

ÖHMAN *et al.* (1999) estudaram mais de 30 marcadores moleculares localizados em diversos genes envolvidos no balanço energético, em 105 irmãos finlandeses obesos provenientes de 92 famílias. Dentre as HVR próximas ao *MC4R* (D18S851, D18S487, D18S858, D18S849, D18S1155, D18S64 e D18S38), a D18S858 (**FIGURA 5**) foi associada a variações de IMC nesses indivíduos.

Como visto anteriormente, foram demonstradas associações entre diversas variantes genéticas e a obesidade ou variações no IMC. Entretanto, essas associações não se mostraram consistentes entre diferentes grupos populacionais. Frente aos escassos dados existentes sobre os componentes genéticos da obesidade em nossa população, o presente estudo visou estudar regiões hipervariáveis próximas de genes relacionados ao controle da saciedade e à regulação do gasto de energia e sua possível associação com a obesidade, em indivíduos brancos brasileiros.

2. OBJETIVOS

- 2.1. Avaliar a frequência relativa de alelos das regiões hipervariáveis próximas aos genes *LEP* (*LEP* 3'HVR), *LEPR* (D1S200), *POMC* (D2S1788), *MC4R* (D18S858) e do polimorfismo *LEP* G-2548A em indivíduos obesos e não-obesos.
 - 2.2. Avaliar a influência das regiões hipervariáveis *LEP* 3'HVR, D1S200, D2S1788, D18S858 e do polimorfismo *LEP* G-2548A sobre o índice de massa corporal, a circunferência abdominal, e a relação cintura/quadril em indivíduos obesos e não-obesos.
 - 2.3. Estudar a possível associação entre regiões hipervariáveis *LEP* 3'HVR, D1S200, D2S1788, D18S858 e do polimorfismo *LEP* G-2548A e a obesidade em indivíduos brasileiros.
-

3. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Casuística:

Para o grupo de indivíduos obesos, foram selecionados 100 indivíduos brasileiros sem vínculo genético, de cor branca, de ambos os sexos (28 homens e 72 mulheres), com idade entre 20 e 82 anos e obesos. Para a seleção desses indivíduos, foram utilizados os critérios estabelecidos pela OMS ($IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$) (WHO, 2000; JAMES *et al.*, 2001). Indivíduos com obesidade secundária a hipogonadismo em homens, como nas síndromes de Prader-Willi e Bardet-Biedl; ou hiperandrogenismo em mulheres que apresentam síndrome do ovário policístico; disfunções hormonais como a síndrome de Cushing ou hipotireoidismo; ou que foram submetidos à terapia ou cirurgias que possam induzir ao desenvolvimento da obesidade, não foram incluídos do presente estudo.

Para o grupo de indivíduos não-obesos, foram selecionados 110 indivíduos brasileiros sem vínculo genético, de cor branca, de ambos os sexos (37 homens e 73 mulheres), com idade entre 20 e 73 anos, e classificados como não-obesos de acordo com os critérios estabelecidos pela OMS ($IMC < 30 \text{ kg/m}^2$) (WHO, 2000; JAMES *et al.*, 2001). Indivíduos diabéticos ou com alterações nas concentrações plasmáticas de TSH e de T_4 livre não foram incluídos no estudo.

Os indivíduos foram selecionados e avaliados por médicos cardiologistas do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia de São Paulo. Esses indivíduos foram entrevistados e informados do teor do estudo e, antes de qualquer procedimento, assinaram do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido concordando em participar do mesmo. O estudo foi

aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia de São Paulo (CEP-IDPC) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEP-FCF/USP).

3.2. Material biológico:

Amostras de sangue periférico (4,5 mL) foram colhidas em EDTA (1 mg/mL de K₃EDTA por mL de sangue), para extração de DNA genômico e com fluoreto de sódio para a determinação da concentração plasmática de glicose.

Amostras de sangue periférico (10,0 mL) foram colhidas sem anticoagulante para obtenção de soro, utilizado nas determinações das concentrações de colesterol total e frações, triglicerídeos, apolipoproteínas AI (apo AI) e B (apo B), hormônio estimulador da tireóide (TSH) e tiroxina livre (T₄ livre).

3.3. Métodos:

3.3.1. *Determinação das medidas antropométricas*

O peso e a altura dos indivíduos participantes foi medido em uma balança mecânica para pesagem de humanos (Filizola S.A., São Paulo, Brasil). As medidas de circunferência abdominal e de quadril foram obtidas utilizando uma fita métrica flexível comum. Todos os indivíduos tiveram o peso e a altura medidos com o mínimo de roupas possível e descalços, na forma recomendada (MONTEIRO, 1998a; NHLBI, 2000).

3.3.2. Determinação dos parâmetros bioquímicos

A determinação das concentrações séricas de colesterol total (ROESCHLAU *et al.*, 1974), HDL-C (SUGIUCHI *et al.*, 1995), triglicerídeos (WAHLEFELD e BERGMEYER, 1974) e de glicose plasmática (TRINDER, 1969) foram realizadas por ensaios enzimático-colorimétricos. As concentrações séricas de apo B e apo AI foram determinadas por imunoturbidimetria (RIFAI e KING, 1986). Esses ensaios foram realizados no equipamento Roche-Hitachi 912 (Hitachi, Nakakojo, Japão) empregando-se conjuntos de reagentes comerciais (Roche, Mannheim, Alemanha). As concentrações de colesterol da LDL (LDL-C) e VLDL-C foram obtidas pela aplicação da fórmula de Friedewald (FRIEDEWALD *et al.*, 1972).

As dosagens de TSH e T₄ livre foram determinadas por meio de ensaios de imunoquimioluminescência, empregando o equipamento automático IMMULITE® (DPC, Los Angeles/CA, EUA) onde são utilizadas micropartículas sensibilizadas, específicas para cada hormônio e detecção por quimioluminescência enzimática (WITHERSPOON *et al.*, 1988; BABSON, 1991).

3.3.3. Extração do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído a partir de sangue anticoagulado com EDTA, pelo método da precipitação salina otimizado em nosso laboratório (SALAZAR *et al.*, 1998). A integridade do DNA extraído foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 0,8%, corado com brometo de etídio e analisado em transiluminador de emissão ultravioleta (SAMBROOK e RUSSELL, 2001c,d). A concentração e o grau de pureza do DNA foram determinados por espectrofotometria na região do ultravioleta, utilizando o equipamento Beckman DU 640 (Beckman, Fullerton/CA, EUA) (SAMBROOK e RUSSELL, 2001a).

3.3.4. Amplificação das HVR pela reação em cadeia pela polimerase (PCR)

As HVR 3'HVR (*LEP*), D1S200 (*LEPR*), D2S1788 (*POMC*) e D18S858 (*MC4R*) foram amplificadas empregando-se a reação em cadeia pela polimerase (PCR). Os iniciadores foram sintetizados pela Life Technologies (São Paulo/SP, Brasil), de acordo com as seqüências descritas em trabalhos anteriores (SHINTANI *et al.*, 1996) e em informações que constam no endereço da Internet *Genome Database* (GDB, 2004), após confirmação das seqüências dos iniciadores por meio do banco de dados BLAST, contido no *site* do *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) do NIH (BLAST, 2004).

Os parâmetros dos ensaios de amplificação por PCR das quatro HVR em estudo foram otimizados. Em volume final de 50µL, foi aplicada uma unidade da enzima polimerase *Taq* DNA Polymerase 1U/µL (Biotools, Madri, Espanha), tampão da reação de PCR [Tris-HCl a 75 mM; MgCl₂ a 2 mM; KCl a 50 mM e (NH₄)₂SO₄ a 20 mM, pH 9,0], desoxinucleotídeos (dNTP) na concentração de 0,2 mM cada (Amersham Bioscience, Piscataway/NJ, EUA), cada oligonucleotídeo nas concentrações finais de 0,20 µM para a *LEP* 3'HVR e 0,15 µM para as demais HVR, e 30 ng de DNA genômico. Os parâmetros: tempos de hibridação e extensão, temperaturas de desnaturação, hibridação e extensão, e o número de ciclos, foram testados e otimizados no termociclador PTC 200™ (M&J Research, Watertown/MA, EUA).

As condições para amplificação da *LEP* 3'HVR (tempos e temperaturas de cada ciclo, o número de ciclos e os reagentes e suas concentrações) foram descritos no trabalho publicado por SHINTANI *et al.* (1996).

Para a amplificação das demais HVR, foram seguidas as condições descritas no **QUADRO 1**. Todas essas reações foram precedidas por um ciclo de desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos, e encerradas com ciclo único de extensão final de 72°C por 10 minutos.

QUADRO 1. Condições das reações de amplificação em cadeia pela polimerase (PCR), para as regiões hipervariáveis (HVR) D1S200, D2S1788 e D18S858.

HVR	Seqüência repetitiva	Número de ciclos	Desnaturação temperatura / tempo	Hibridação temperatura / tempo	Extensão temperatura / tempo
D1S200	CA	29	94°C / 30 s	55°C / 30 s	72°C / 60 s
D2S1788	GATA	27	94°C / 30 s	55°C / 75 s	72°C / 15 s
D18S858	TAA	27	94°C / 30 s	57°C / 60 s	72°C / 30 s

3.3.5. Análise dos alelos das HVR por sistema manual

Os produtos de amplificação das HVR *LEP* 3'HVR, D2S1788 e D18S858 foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida à 8% com proporção acrilamida/N,N'-metileno-*bis*-acrilamida 19:1 (SAMBROOK e RUSSELL, 2001b), juntamente com os padrões de tamanho molecular de DNA de 50 pares de base (Amersham Bioscience, Piscataway/NJ, EUA) e ϕ X174 digerido com *Hae*III (PROMEGA, San Luis Obispo/CA, EUA). O tampão utilizado foi o Tris-Borato-EDTA (TBE, Tris a 45 mM; ácido bórico a 45 mM; EDTA a 1 mM; pH 8,0). As eletroforeses foram realizadas sob uma diferença de potencial de 120V por 4 h e 30 min. Os produtos de PCR separados foram corados por precipitação com prata (PORRO *et al.*, 1982).

Os tamanhos dos produtos de PCR das HVR foram identificados por digitalização da imagem das bandas geradas na eletroforese em gel de poliacrilamida. As imagens foram analisadas pelo programa Chemilmager™ 4400 v5.5 (AlphaInnotech, San Leandro/CA, EUA) que compara as distâncias de migração eletroforética dos fragmentos obtidos pela PCR e dos padrões de tamanho molecular. O programa Chemilmager™ 4400 faz parte do sistema de digitalização de imagens Multimage™ Light Cabinet (AlphaInnotech, San Leandro/CA, EUA), composto de uma câmera digital de 8 *bits* acoplada a uma câmara escura.

Uma reprodução das imagens de géis de poliacrilamida das HVR *LEP* 3'HVR, D2S1788 e D18S858 pode ser encontrada na **FIGURA 6**.

FIGURA 6. Eletroforese de produtos de amplificação das regiões hipervariáveis 3' HVR (linhas de 1 a 4), D2S1788 (linhas de 5 a 7) e D18S858 (linhas de 9 a 12). M, marcadores moleculares ϕ X174/*Hae*III (PROMEGA, San Luis Obispo/CA, EUA) e 50 bp ladder (Amersham Bioscience, Piscataway/NJ, EUA). Estão indicadas as bandas de migração dos padrões (11 bandas, de 72 a 350 bp) utilizadas para estabelecer os tamanhos moleculares dos produtos de PCR.

Para a correção dos tamanhos moleculares fornecidos pelo programa Chemilmager™ 4400 foram utilizadas as seqüências de cada uma das HVR estudadas, publicadas no banco de dados GenBank, disponibilizado na página da Internet "NCBI: Entrez Nucleotide". No **QUADRO 2**, estão relacionados as seqüências e os números de acesso de cada seqüência utilizada na correção dos tamanhos moleculares das HVR estudadas por meio de detecção manual (GENBANK, 2004).

QUADRO 2. Sequências utilizadas para a correção dos tamanhos moleculares das HVR estudadas.

HVR	Nº ACESSO	NOME DO ARQUIVO
D1S200	<u>Z16550</u>	<i>H.sapiens</i> (D1S200) DNA segment containing (CA) repeat; clone AFM093xf3; single read
D2S1788	<u>NT 022184</u>	<i>Homo sapiens</i> chromosome 2 genomic contig
LEP 3' HVR	<u>D63710</u>	Human ob gene, éxon 3 and complete cds
D18S858	<u>AC090208</u>	<i>Homo sapiens</i> chromosome 18, clone RP11-660C14, complete sequence

Para o controle de qualidade dos resultados obtidos pelo método manual de análise de fragmentos das HVR LEP 3'HVR, D2S1788 e D18S858, realizamos em cada novo ensaio a repetição de uma amostra cujos valores de tamanhos moleculares já haviam sido determinados em ensaios anteriores. Foram realizadas, também, as medidas das bandas de 100, 200 e 300 bp da eletroforese do padrão de tamanhos moleculares em escala de 50 bp aplicados nas linhas internas da eletroforese. Além disso, foram repetidas as eletroforeses de, no mínimo, 10% das amostras para comparação dos resultados obtidos e validação do método.

3.3.6. Análise dos alelos da HVR D1S200 por sistema de detecção automatizado

A identificação dos alelos da HVR D1S200 foi realizada por eletroforese automatizada em gel de seqüenciamento (ReproGel™, Amersham Bioscience, Piscataway/NJ, EUA), utilizando o equipamento ALFexpress™ (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia) que detecta a passagem dos fragmentos durante a eletroforese por meio de fluorescência induzida por laser do fluoróforo incorporado à esses produtos de PCR.

Para amplificação da HVR D1S200 foram utilizados oligonucleotídeos marcados com o fluoróforo carbocianina (Cy5™ Amidite, Amersham Bioscience, Piscataway/NJ, EUA). Os resultados obtidos das migrações eletroforéticas dos produtos amplificados e dos padrões internos ALFexpress™ Sizer™ 50 e 200, e o padrão de escala alélica 50 bp ladder, marcados com Cy5™ foram comparados e analisados pelo programa de análise de fragmentos ALFwin Fragment Analyser v1.01 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia). Os tamanhos moleculares das amostras são corrigidos por meio do uso padrões internos de tamanhos conhecidos (ALFexpress™ Sizer™ 50 e 200, de 50 e 200 bp, respectivamente), aplicados juntamente com cada amostra. Esse sistema de análise de fragmentos confere maior exatidão e precisão na determinação de tamanhos dos produtos de PCR. Na **FIGURA 7**, pode ser observado um eletroferograma da análise automática dos produtos de PCR da HVR D1S200 marcados com Cy5™ (Synthegen LLC, Houston/TX, EUA).

FIGURA 7. Eletroferograma do programa ALFwin Fragment Analyser v1.01, que foi utilizado na determinação dos tamanhos moleculares de fragmentos da HVR D1S200 pelo método automatizado. Na Linha 1, temos os picos de 150 e 200 bp do padrão de 50 a 500 bp em escala de 50 bp. Nas linhas 2, 3 e 4, os picos à direita correspondem ao padrão interno de 200 bp. Os picos à esquerda correspondem à detecção automática das bandas de eletroforese.

3.3.7. Análise do polimorfismo *LEP* G-2548A

O polimorfismo *LEP* G-2548A, localizado na região promotora do *LEP*, foi identificado pela PCR seguida da técnica do polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP), descrita previamente por MAMMÈS *et al.* (2000).

Com o intuito de garantir a qualidade das reações envolvidas, os oligonucleotídeos iniciadores foram modificados de forma a gerar produtos amplificados de 427 bp, contendo dois sítios de reconhecimento para a enzima de restrição *A/w44I* (Fermentas, Vilnius, Lituânia). Um dos sítios é denominado constitutivo, pois está presente em todos os produtos amplificados, que, após a digestão enzimática, dá origem a dois fragmentos, um de 95 bp e outro de 332 bp. O outro sítio, designado polimórfico é reconhecido pela enzima *A/w44I* somente na presença do alelo -2548A, sendo gerados dois fragmentos, um de 25 bp e outro de 307 bp.

A identificação dos genótipos foi realizada após separação dos fragmentos de restrição por eletroforese em gel de agarose a 2%, juntamente com um padrão de tamanhos moleculares de DNA de 100 bp, corados com brometo de etídio (SAMBROOK e RUSSELL, 2001c,d). A **FIGURA 8** mostra a imagem de uma eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR-RFLP de indivíduos homozigotos **GG** (linha 1) e **AA** (linha 3), e heterozigoto **GA** (linha 2) para o polimorfismo *LEP* G-2548A.

FIGURA 8. Eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio dos produtos de restrição enzimática para genotipagem do polimorfismo G-2548A. Linha 1, genótipo **GG**. Linha 2, genótipo **GA**. Linha 3, genótipo **AA**. Linha 4, produto da PCR. M, marcador de tamanhos molecular em escala de 100 bp.

3.3.8. *Análise estatística*

Os resultados obtidos foram analisados pelo programa SigmaStat para Windows, versão 2.03 (SPSS Inc., Chicago/IL EUA) e apresentados na forma gráfica por utilização do *Software Excel* (Microsoft, Redmond/WA, EUA). Para o cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg e da análise de desequilíbrio de ligação foi utilizado o programa ARLEQUIN Ver 2.000 (SCHNEIDER *et al.*, 2000).

Inicialmente, todas as variáveis foram analisadas descritivamente. Para as variáveis contínuas, a análise foi realizada por observação dos valores mínimos e máximos, cálculo de médias e desvios-padrão. Para as variáveis classificatórias foram calculadas as frequências absolutas e relativas.

As comparações entre dois ou mais grupos foram realizadas pelo teste *t* de student ou análise de variância, sendo as comparações múltiplas analisadas pelo teste de Tukey. Nos casos em que as variáveis não apresentaram distribuição normal foram aplicados testes não-paramétricos. A comparação entre proporções foi avaliada pelo teste de qui-quadrado (χ^2)

ou teste exato de Fisher. As comparações das frequências dos alelos entre dois grupos foram realizadas pelo método de análise não-paramétrica de Kolmogorov-Smirnov (FISHER e VAN BELLE, 1993). A análise de haplótipos foi realizada pelo método Markov-Chain Monte Carlo (GUO e THOMPSON, 1992). Foram considerados estatisticamente significantes os resultados cujos níveis descritivos (valores de P) forem inferiores a 0,05.

4. RESULTADOS

4.1. Dados biodemográficos, bioquímicos e clínicos dos indivíduos

Os dados biodemográficos e medidas antropométricas dos indivíduos obesos e não-obesos estão descritos na **TABELA 1**. Três mulheres não-obesas recusaram-se em informar suas idades. Não obtivemos as medidas circunferência abdominal e quadril de um homem obeso e de uma mulher não-obesa.

Os indivíduos obesos apresentaram média de idade mais elevada que não-obesos (Obesos: 52 ± 13 anos vs. Não-obesos: 45 ± 15 anos, $P < 0,001$). Entretanto, essa diferença foi observada apenas no grupo de mulheres (Obesos: 53 ± 13 ; Não-obesos: 44 ± 15 ; $P < 0,001$). Como esperado, os indivíduos obesos tiveram valores de IMC, circunferência abdominal e RCQ significativamente superiores aos não-obesos (**TABELA 1**).

A frequência de hipertensão em indivíduos obesos foi significativamente maior que em não-obesos (Obesos: 72% vs. Não-obesos: 9%, $P < 0,001$) (**TABELA 1**).

Ao se avaliar todos os indivíduos selecionados, obesos e não-obesos, verificou-se que a frequência de hipertensão estava elevada (60%) naqueles com medida de circunferência abdominal de risco para co-morbidades (superior a 88 cm para mulheres e 102 cm para homens).

Em indivíduos obesos, foi verificado que 73% dos indivíduos com obesidade central (valor de RCQ superior a 0,85 para mulheres e 0,95 para homens) eram hipertensos. Essa frequência foi similar à observada em indivíduos com obesidade ginóide ($P = 0,527$).

A frequência de DCV também foi maior entre os indivíduos obesos (17%), quando comparada à frequência observada entre indivíduos não-obesos (3%) ($P < 0,001$) (**TABELA 1**). Observa-se que a presença de co-morbididades relacionadas à obesidade (hipertensão, DCV e diabetes) tem frequência maior (72%) entre os indivíduos obesos, em relação aos não-obesos (11%) ($P < 0,001$).

TABELA 1. *Dados biodemográficos dos indivíduos classificados como obesos e não-obesos.*

Parâmetros	OBESOS (n = 100)	NÃO-OBESOS (n = 110)	
Idade (anos)*	52 ± 13 [20 - 82]	45 ± 15 [18 - 83]	$P < 0,001^a$
IMC (kg/m ²)*	35,59 ± 4,68 [30,18 - 52,35]	24,24 ± 3,08 [18,64 - 29,75]	$P < 0,001^b$
Circunf. Abdom. (cm)*	109,6 ± 11,4 [88 - 144]	87,3 ± 10,8 [67 - 111]	$P < 0,001^a$
RCQ*	0,92 ± 0,06 [0,76 - 1,10]	0,87 ± 0,07 [0,72 - 1,04]	$P < 0,001^a$
Sexo (F / M)	72 / 28	73 / 37	$\chi^2 = 0,537$; 1 g.l., $P = 0,464$
Hipertensos (%)	72 (72%)	10 (9%)	$\chi^2 = 84,476$; 1 g.l., $P < 0,001$
Fumantes (%)	43 (43%)	33 (30%)	$\chi^2 = 3,291$; 1 g.l., $P = 0,070$
DCV (%)	17 (17%)	3 (3%)	$\chi^2 = 10,782$; 1g.l., $P = 0,001$
Co-morbididades (%)	72 (72%)	12 (11%)	$\chi^2 = 78,929$; 1 g.l., $P < 0,001$

***Média ± DP**; valores mínimo e máximo entre colchetes; **n**, número de indivíduos; **g.l.**, graus de liberdade; **IMC**, índice de massa corporal; **Circunf. Abdom.**, circunferência abdominal; **RCQ**, relação cintura-quadril; **DCV**, doença cardiovascular. ^a teste *t*; ^b teste de Mann-Whitney.

Na **TABELA 2**, são descritas as características de todos os indivíduos separados por sexo. Podemos observar que as médias das idades e dos valores de IMC foram semelhantes entre homens e mulheres. Diferenças de valores médios de circunferência abdominal e RCQ entre homens e mulheres estão relacionadas a variações na distribuição dos depósitos de gordura inerentes ao sexo (HAN *et al.*, 1995; LEAN *et al.*, 1995).

No grupo de mulheres, foi encontrada correlação entre o aumento da idade e a presença menopausa ($R^2 = 0,572$; $P < 0,05$). Entretanto, a análise de regressão linear múltipla revelou que há correlação entre maiores valores de IMC e aumento da idade ($R^2 = 0,147$; $P < 0,05$), independente do estado de menopausa.

TABELA 2. *Dados biodemográficos dos indivíduos participantes do estudo classificados por sexo.*

Parâmetros	MULHERES (n = 145)	HOMENS (n = 65)	
Idade (anos)*	49 ± 15 [18 – 83]	49 ± 14 [20 – 73]	$P = 0,674^a$
IMC (kg/m ²)*	29,50 ± 6,93 [18,64 – 52,35]	29,97 ± 6,88 [20,09 – 48,44]	$P = 0,683^b$
Circunf. Abdom. (cm)*	95,6 ± 14,8 [67 – 128]	103,2 ± 16,6 [79 – 144]	$P = 0,001^a$
RCQ*	0,88 ± 0,07 [0,72 – 1,05]	0,93 ± 0,06 [0,82 – 1,10]	$P < 0,001^a$
Hipertensos (%)	59 (41%)	23 (35%)	$\chi^2 = 0,331$; 1 g.l., $P = 0,565$
Fumantes (%)	45 (31%)	31 (48%)	$\chi^2 = 4,696$; 1 g.l., $P = 0,030$
DCV (%)	11 (8%)	9 (14%)	$\chi^2 = 1,379$; 1 g.l., $P = 0,240$
Co-morbidades (%)	60 (41%)	24 (37%)	$\chi^2 = 0,209$; 1 g.l., $P = 0,648$

***Média ± DP**; valores mínimo e máximo entre colchetes; **n**, número de indivíduos; **g.l.**, graus de liberdade; **IMC**, índice de massa corporal; **Circunf. Abdom.**, circunferência abdominal; **RCQ**, relação cintura-quadril; **DCV**, doença cardiovascular. ^a teste *t*; ^b teste de Mann-Whitney.

A frequência de fumantes foi maior nos homens (48%) que nas mulheres (31%, $P = 0,030$) (**TABELA 2**). Entretanto, a hipertensão, a DCV e as co-morbidades relacionadas com a obesidade apresentaram frequências semelhantes entre homens e mulheres ($P > 0,05$).

A frequência dos fatores de risco individuais para DCV foi maior no grupo de indivíduos com DCV (**TABELA 3**). A hipertensão apresentou-se como principal fator de risco de DCV, sendo a razão de probabilidade (OR) de 14,761 (IC 95%: 3,143 - 69,332; $P < 0,001$). O tabagismo, analisado em conjunto com a hipertensão, resultou em um OR de 3,176 (IC 95%: 1,097 – 9,139; $P = 0,033$).

TABELA 3. *Frequências de fatores de risco para Doença Cardiovascular (DCV) em indivíduos do grupo total com e sem DCV.*

Fatores de risco	Doença Cardiovascular		
	Presente (n = 20)	Ausente (n = 190)	
Hipertensão	18 (90%)	64 (33%)	$\chi^2 = 21,804$; 1 g.l., $P < 0,001$
Tabagismo	13 (65%)	63 (33%)	$\chi^2 = 6,626$; 1 g.l., $P = 0,010$
Diabete	6 (30%)	10 (5,2%)	$\chi^2 = 12,413$; 1 g.l., $P < 0,001$
V.R. Circunf. Abdom.	20 (100%)	111 (58%)	$\chi^2 = 11,618$; 1 g.l., $P < 0,001$
Obesidade central	13 (65%)	72 (38%)	$\chi^2 = 4,450$; 1 g.l., $P = 0,035$

n, número de indivíduos; g.l., graus de liberdade; V.R. Circunf. Abdom., valores de risco de circunferência abdominal.

Indivíduos com valores de circunferência abdominal de risco para co-morbidades ou obesidade central também foram mais frequentes no grupo com DCV ($P < 0,05$) (**TABELA 3**). Indivíduos obesos revelaram uma probabilidade 6,205 vezes maior de apresentarem DCV (IC 95%: 1,668 – 23,076; $P = 0,006$). Os indivíduos classificados por distribuição de gordura corporal não mostraram valores de OR significantes, quando foram

ajustados por idade ($P = 0,274$). Todos os indivíduos com DCV apresentaram valores de circunferência abdominal de risco para co-morbidades ($P < 0,001$), impossibilitando o cálculo de OR para este parâmetro.

Na **TABELA 4**, são exibidos os dados bioquímicos dos indivíduos obesos e não-obesos. Duas mulheres, uma obesa e outra não-obesa, tiveram dosagens de triglicerídeos superiores a 400 mg/dL o que não permitiu o cálculo de LDL-C e VLDL-C pela equação de Friedewald (FRIEDEWALD *et al.*, 1972). Outra mulher obesa não teve o HDL-C determinado, o que impediu o cálculo de LDL-C.

TABELA 4. *Dados das determinações bioquímicas dos indivíduos obesos e não-obesos.*

Parâmetros (mg/dL)*	OBESOS (n= 100)	NÃO-OBESOS (n= 110)	Valor de <i>P</i>
Glicose	114,5 ± 15,9 [74 – 273]	92,5 ± 9,6 [69 – 123]	< 0,001 ^b
Triglicerídeos	170,0 ± 65,8 [50 – 405]	118,2 ± 62,6 [34 – 419]	< 0,001 ^b
Colesterol total	218,0 ± 45,3 [142 – 347]	203,8 ± 40,4 [124 – 319]	0,017 ^a
HDL-C	49,9 ± 11,4 [31 – 97]	58,4 ± 15,9 [33 – 107]	< 0,001 ^b
LDL-C	134,4 ± 38,6 [61 – 254]	121,1 ± 32,7 [51 – 223]	0,008 ^a
VLDL-C	33,5 ± 12,3 [10 – 69]	23,3 ± 11,3 [7 – 72]	< 0,001 ^b
APO AI	134,7 ± 22,1 [102 – 221]	137,8 ± 31,7 [11 – 228]	0,592 ^b
APO B	116,2 ± 26,1 [61 – 176]	98,8 ± 23,4 [49 – 164]	< 0,001 ^a

***Média ± DP**; valores mínimo e máximo entre colchetes; **n**, número de indivíduos; **HDL-C**, colesterol da HDL; **LDL-C**, colesterol da LDL; **VLDL-C**, colesterol da LDL; **apo AI**, apolipoproteína AI; **apo B**, apolipoproteína B.

^a teste *t*; ^b teste de Mann-Whitney.

Os indivíduos obesos apresentaram valores de glicose, triglicerídeos, colesterol total, LDL-C, VLDL-C e apo B superiores, e de HDL-C inferiores aos dos indivíduos não-obesos (**TABELA 4**). Indivíduos obesos apresentaram a probabilidade cerca de 3 vezes maior (OR = 3,323; IC 95%: 1,424 – 7,758; $P = 0,005$) de exibirem valores de triglicerídeos superiores a 150 mg/dL que os indivíduos não-obesos.

4.2. Estudo do polimorfismo *LEP* G-2548A

As frequências dos genótipos e alelos do polimorfismo *LEP* G-2548A em indivíduos obesos e não-obesos estão descritas na **TABELA 5**. Também são apresentadas as frequências alélicas e genotípicas de indivíduos obesos separados de acordo com o tipo de distribuição de gordura corporal e de indivíduos obesos e não-obesos com e sem valores de circunferência abdominal de risco para co-morbididades.

As frequências dos genótipos do polimorfismo *LEP* G-2548A de indivíduos obesos foram similares as de não-obesos. Quando se avaliou a frequência alélica, entretanto, o alelo **G** foi mais freqüente em indivíduos obesos que em não-obesos (Obesos vs. Não-obesos, 0,65 vs. 0,54; $P = 0,039$). Portanto, o polimorfismo *LEP* G-2548A parece estar associado com a obesidade, nos indivíduos do nosso estudo.

As frequências de genótipos e alelos comparadas entre os grupos de indivíduos classificados por valores de risco de circunferência abdominal e por tipo de obesidade (central e ginóide) se apresentaram similares. Portanto, não foi observada associação entre o polimorfismo *LEP* G-2548A e o risco de co-morbididades relacionadas à obesidade, nem com a distribuição de gordura corporal em indivíduos obesos.

TABELA 5. *Freqüências de genótipos e alelos do polimorfismo LEP G-2548A em indivíduos agrupados como obesos e não-obesos; de acordo com a distribuição de gordura corporal em indivíduos obesos; e de valores circunferência abdominal de risco para co-morbididades em obesos e não-obesos.*

Grupos	Genótipos			Alelos	
	GG	GA	AA	G	A
Obesos (n=100)	41 (41%)	47 (47%)	12 (12%)	0,65	0,35
Não-obesos (n=110)	31 (28%)	57 (52%)	22 (20%)	0,54	0,46
	$\chi^2 = 4,826$; 2 g.l.; $P = 0,090$			$\chi^2 = 4,273$; 1 g.l.; $P = 0,039$	
Obesidade Central (n=85)	38 (45%)	36 (42%)	11 (13%)	0,66	0,34
Obesidade Ginóide (n=14)	3 (21%)	10 (71%)	1 (7%)	0,64	0,43
	$\chi^2 = 4,093$; 2 g.l.; $P = 0,129$			$\chi^2 = 0,172$; 1 g.l.; $P = 0,678$	
CA $\geq$ V.R. (n=131)	49 (37%)	60 (46%)	22 (17%)	0,60	0,40
CA < V.R. (n=77)	23 (30%)	43 (56%)	11 (14%)	0,58	0,42
	$\chi^2 = 1,975$; 2 g.l.; $P = 0,372$			$\chi^2 = 0,160$; 1 g.l.; $P = 0,689$	

n, número de indivíduos, g.l., graus de liberdade; CA, circunferência abdominal; V.R., valor de risco. Equilíbrio de Hardy-Weinberg: $P = 0,77588 \pm 0,00087$.

Os valores de IMC, de circunferência abdominal e de RCQ foram comparados entre todos os indivíduos, obesos e não-obesos, com diferentes genótipos do polimorfismo LEP G-2548A, não foram encontradas diferenças significantes ($P > 0,05$, TABELA 6). Esse mesmo resultado foi observado quando analisados os indivíduos obesos e não-obesos separadamente. Portanto, esse polimorfismo não parece estar associado a variações nos valores de IMC, de circunferência abdominal e de RCQ nos indivíduos estudados.

TABELA 6. Comparação dos valores médios de índice de massa corporal, circunferência abdominal e relação cintura-quadril de acordo com os genótipos do polimorfismo *LEP* G-2548A em todos os indivíduos (obesos e não-obesos).

Parâmetros	Genótipos					
	GG (n=72)	GA (n=104)	AA (n=34)	P	GA+AA (n=176)	P
IMC (kg/m ²)	30,7 ± 6,9	29,4 ± 6,9	28,2 ± 6,7	0,173 ^a	29,1 ± 6,9	0,091 ^c
CA (cm)	100,5 ± 15,8	96,4 ± 15,1	96,9 ± 17,1	0,213 ^b	96,5 ± 15,6	0,079 ^d
RCQ	0,91 ± 0,07	0,89 ± 0,07	0,90 ± 0,08	0,217 ^b	0,89 ± 0,07	0,097 ^d

Média ± DP; IMC, índice de massa corporal; **CA**, circunferência abdominal; **RCQ**, relação cintura-quadril. Comparações entre os genótipos **GG**, **GA** e **AA** (^aKruskal-Wallis; ^bANOVA); entre os genótipos **GG** e **GA+AA** (^cMann-Whitney; ^dteste t).

4.3. Estudo da região hipervariável *LEP* 3'HVR

Os produtos de amplificação do polimorfismo *LEP* 3'HVR nas amostras estudadas apresentaram alelos com tamanhos moleculares que variaram entre 150 bp (11 repetições) e 270 bp (41 repetições). Esses tamanhos moleculares foram semelhantes aos observados por MOFFETT *et al.* (2002) em diferentes populações (brancos americanos, afro-americanos, ingleses, africanos, chineses, samoanos, entre outros), porém diferentes dos encontrados em japoneses (121 e 221 bp) por SHINTANI *et al.* (1996).

Como pode ser observado, na **TABELA 7**, os alelos *LEP* 3'HVR com 14 (162 bp) e 31 repetições (230 bp) foram os mais freqüentes tanto em indivíduos obesos quanto em não-obesos. O alelo contendo 28 repetições (218 bp) apresentou maior diferença ($D = 0,11$) de freqüências acumulativas encontradas entre os alelos de indivíduos obesos e de não-obesos. A diferença entre as freqüências dos alelos do *LEP* 3'HVR de indivíduos obesos e não-obesos não foi, no entanto, estatisticamente significativa ($KS = 1,12$; $P > 0,05$).

TABELA 7. *Frequências dos alelos da LEP 3'HVR em indivíduos obesos e não-obesos.*

Alelos (nº de repetições)	FREQUÊNCIAS*	
	Obesos (n = 100)	Não-obesos (n = 110)
11	0,010	0
12	0,030	0,018
13	0,080	0,045
14	0,185	0,132
15	0,095	0,109
16	0,045	0,059
17	0,020	0,027
18	0,005	0,005
19	0,010	0,018
20	0,015	0,014
22	0,020	0
23	0,005	0
27	0,005	0
28	0,010	0
29	0,030	0,041
30	0,065	0,086
31	0,110	0,123
32	0,110	0,123
33	0,065	0,082
34	0,055	0,068
35	0,010	0,036
36	0,020	0,005
40	0	0,005
41	0	0,005

n, número de indivíduos; * teste de Kolmogorov-Smirnov: $KS = 1,1212$; $P > 0,05$.
Equilíbrio de Hardy-Weinberg: $P = 0,13198 \pm 0,00625$

Na **FIGURA 9**, é apresentado o gráfico da distribuição das frequências dos alelos da *LEP* 3'HVR nos indivíduos obesos e não-obesos, de acordo com os resultados da eletroforese em gel de poliacrilamida. Observa-se que ocorre uma distribuição bimodal, concordando com a forma

de distribuição de freqüências observada em outras populações (SHINTANI *et al.*, 1996; MCGARVEY *et al.*, 2002; MOFFETT *et al.*, 2002).

De acordo com a classificação de SHINTANI *et al.* (1996), os alelos da *LEP* 3'HVR foram agrupados em alelos menores (de tamanhos 150 a 198 bp, com 11 a 23 repetições), denominados alelos da Classe I, e alelos maiores (de tamanhos 214 a 270 bp, com 27 a 41 repetições), denominados alelos da Classe II.

FIGURA 10. Distribuição dos alelos da 3'HVR do gene da leptina (*LEP*) em indivíduos obesos (n = 100) e não-obesos (n = 110).

Na **TABELA 8**, encontram-se descritas as freqüências alélicas e dos genótipos da *LEP* 3'HVR, de acordo com as classes de alelos. As freqüências alélicas foram semelhantes entre esses grupos ($\chi^2 = 3,252$; $P = 0,071$). Foi encontrada diferença na distribuição de genótipos ($\chi^2 = 6,293$; $P = 0,043$) entre indivíduos obesos e não-obesos, sendo que a freqüência dos genótipos que contém pelo menos um alelo de Classe I

(genótipos **I/I** e **I/II**) foi significativamente maior nos indivíduos obesos ($\chi^2 = 5,452$; $P = 0,020$).

Foram encontradas freqüências similares de genótipos e alelos da *LEP* 3'HVR entre os grupos de indivíduos classificados por valores de circunferência abdominal de risco para co-morbidades. As freqüências de genótipos e de alelos entre os indivíduos com obesidade central e ginóide também não apresentaram diferenças significantes. Portanto, não foi observada associação entre a *LEP* 3'HVR e a presença de obesidade central ou a risco de co-morbidades.

TABELA 8. *Freqüências de genótipos e alelos do polimorfismo LEP 3'HVR em indivíduos agrupados como obesos e não-obesos; de acordo com a distribuição de gordura corporal em indivíduos obesos; e de valores circunferência abdominal de risco para co-morbidades em obesos e não-obesos.*

Grupos	Genótipos			Alelos	
	I/I	I/II	II/II	I	II
Obesos (n=100)	24 (24%)	56 (56%)	20 (20%)	0,52	0,48
Não-obesos (n=110)	23 (21%)	48 (44%)	39 (35%)	0,43	0,57
	$\chi^2 = 6,293$; 2 g.l.; $P = 0,043$			$\chi^2 = 3,252$; 1 g.l.; $P = 0,071$	
Obesidade Central (n=85)	22 (26%)	45 (53%)	18 (21%)	0,52	0,48
Obesidade Ginóide (n=14)	2 (14%)	11 (79%)	1 (7%)	0,54	0,46
	$\chi^2 = 3,296$; 2 g.l.; $P = 0,192$			$\chi^2 = 0,00715$; 1 g.l.; $P = 0,933$	
CA $\geq$ V.R. (n=131)	30 (23%)	69 (53%)	32 (24%)	0,49	0,51
CA < V.R. (n=77)	17 (22%)	34 (44%)	26 (34%)	0,44	0,56
	$\chi^2 = 2,241$; 2 g.l.; $P = 0,326$			$\chi^2 = 0,811$; 1 g.l.; $P = 0,368$	

n, número de indivíduos, **g.l.**, grau de liberdade; **CA**, circunferência abdominal; **V.R.**, valor de risco

Ao avaliar o efeito dos genótipos da *LEP* 3'HVR sobre os valores dos parâmetros de massa corporal, não se observou diferenças significantes entre indivíduos com diferentes genótipos no grupo total, obesos e não-obesos (**TABELA 9**). Esses mesmos resultados foram, também, obtidos quando analisados os indivíduos obesos e não-obesos separadamente.

Quando os indivíduos portadores de genótipos **I/I** e **I/II** foram agrupados, constituindo o grupo de portadores de alelos da Classe **I**, observou-se que apresentavam maiores valores de IMC (**I/I+I/II**: $30,3 \pm 7,0$ kg/m² vs. **II/II**: $27,9 \pm 6,3$ kg/m²) e de circunferência abdominal (**I/I+I/II**: $99,4 \pm 16,0$ cm vs. **II/II**: $94,2 \pm 14,3$ cm) que os indivíduos com genótipo **II/II** ($P < 0,05$), mas não de RCQ (**TABELA 9** e **FIGURA 11**). Essas diferenças foram observadas no grupo total, mas não em indivíduos agrupados como obesos e não-obesos, separadamente.

TABELA 9. Comparação dos valores médios de índice de massa corporal, circunferência abdominal e relação cintura-quadril de acordo com os genótipos do polimorfismo *LEP* 3'HVR em todos os indivíduos (obesos e não-obesos).

Parâmetros	Genótipos					
	I/I (n=47)	I/II (n=104)	II/II (n=59)	P	I/I + I/II (n=151)	P
IMC (kg/m ²)	$30,6 \pm 7,6$	$30,3 \pm 6,8$	$27,9 \pm 6,3$	0,050 ^a	$30,3 \pm 7,0^a$	0,015 ^c
CA (cm)	$101,1 \pm 16,9$	$98,6 \pm 15,7$	$94,2 \pm 14,3$	0,066 ^b	$99,4 \pm 16,0^b$	0,032 ^d
RCQ	$0,91 \pm 0,07$	$0,89 \pm 0,07$	$0,89 \pm 0,07$	0,183 ^b	$0,90 \pm 0,07$	0,472 ^d

Média ± DP; **n**, número de indivíduos; **IMC**, índice de massa corporal; **CA**, circunferência abdominal; **RCQ**, relação cintura-quadril.

Comparações entre os genótipos **I/I**, **I/II** e **II/II** (^aKruskal-Wallis; ^bANOVA); entre os genótipos **II/II** e **I/I+I/II** (^cMann-Whitney; ^dteste t).

FIGURA 11. Comparação dos valores de índice de massa corporal (IMC) e de circunferência abdominal (CA) entre indivíduos portadores de alelos da classe I (genótipos I/I + I/II) e indivíduos com genótipo II/II.

4.4. Estudo da região hipervariável D2S1788 (POMC)

O gráfico de distribuição das freqüências dos alelos da HVR D2S1788, próxima ao *POMC*, pode ser encontrado na **FIGURA 11**. Foram observados fragmentos contendo entre 4 (158 bp) e 20 (222 bp) repetições da sequência GATA. Os alelos mais freqüentes foram alelos que continham 15 repetições (202 bp), entre os indivíduos obesos, e 14 repetições (198 bp) entre os indivíduos não-obesos.

Os resultados das freqüências dos alelos da HVR D2S1788, nos indivíduos obesos e não-obesos, encontram-se na **TABELA 10**. Observa-se que as freqüências dos alelos dessa HVR se distribuem de forma variável, com maiores freqüências na faixa de tamanhos que vão de 13 a 15 repetições (194 a 202 bp), em ambos os grupos.

As freqüências alélicas da HVR D2S1788 em indivíduos obesos foram semelhantes às de não-obesos ($KS = 1,18$; $P > 0,05$), não ocorrendo, portanto, nenhum alelo ou grupo de alelos que estejam associados à

obesidade. A maior diferença entre freqüências acumulativas de alelos encontradas entre indivíduos obesos e não-obesos foi de $D=0,12$ para o alelo com 15 repetições (202 bp).

FIGURA 11. Distribuição dos alelos da região hipervariável D2S1788 (POMC) em indivíduos obesos ($n = 100$) e não-obesos ($n = 110$).

As freqüências dos alelos da HVR D2S1788 dos indivíduos do grupo total com valores de circunferência abdominal de risco de co-morbidades foram semelhantes a valores sem risco ($P > 0,05$). No grupo de obesos, também não foram observadas diferenças significantes de freqüência desses alelos entre os indivíduos com obesidade central e obesidade ginóide ($P > 0,05$).

TABELA 10. *Freqüências dos alelos da HVR D2S1788 (POMC) em indivíduos obesos e não-obesos.*

Alelos (nº de repetições)	FREQUÊNCIAS*	
	Obesos (n = 100)	Não-obesos (n = 110)
4	0,005	0
5	0,040	0,041
6	0,065	0,045
7	0,040	0,045
8	0,035	0,023
9	0,025	0,018
10	0,010	0,032
11	0,050	0,036
12	0,080	0,032
13	0,115	0,127
14	0,155	0,186
15	0,245	0,164
16	0,085	0,114
17	0,050	0,100
18	0	0,014
19	0	0,018
20	0	0,005

n, número de indivíduos; * teste de Kolmogorov-Smirnov: KS = 1,18; $P > 0,05$.
Equilíbrio de Hardy-Weinberg: $P = 0,32390 \pm 0,00752$

4.5. Estudo da região hipervariável D18S858 (MC4R)

O gráfico da distribuição de freqüências dos alelos da HVR D18S858 encontra-se ilustrado na **FIGURA 12**. Foram observados alelos contendo de 38 a 50 repetições da sequência TAA (tamanhos moleculares entre 192 e 228 bp). Os alelos mais freqüentes foram os com 42 repetições (203 bp), entre os indivíduos obesos, e com 43 repetições (206 bp) entre os indivíduos não-obesos.

FIGURA 12. Distribuição dos alelos da região hipervariável D18S858 (*MC4R*) em indivíduos obesos ($n = 100$) e não-obesos ($n = 110$).

Na **TABELA 11**, estão descritas as frequências dos alelos da HVR D18S858. As frequências alélicas desse locus nos indivíduos obesos foram semelhantes às de não-obesos ($KS = 1,33$; $P > 0,05$). Entretanto, pode ser observada a maior frequência dos alelos contendo 41 e 42 repetições (alelo 41 e alelo 42, tamanhos moleculares de 200 e 203 bp, respectivamente) nos indivíduos obesos.

Quando os indivíduos portadores de alelos 41 ou 42 foram separados dos não-portadores, observou-se maior frequência de portadores de alelos 41 ou 42 entre obesos ($P < 0,001$) (**TABELA 12**). Observou-se também que os portadores desses alelos tiveram maior frequência de valores de circunferência abdominal de risco para co-morbidades ($P = 0,003$), no grupo total (obesos e não-obesos). Por outro lado, não se observou diferença de frequência de obesidade central entre os portadores e não-portadores de alelos 41 ou 42 (**TABELA 12**).

TABELA 11. *Freqüências dos alelos da HVR D18S858 (MC4R) em indivíduos obesos e não-obesos.*

Alelos (nº de repetições)	FREQÜÊNCIAS*	
	Obesos (n = 100)	Não-obesos (n = 110)
38	0	0,032
39	0,005	0,036
40	0,010	0,077
41	0,180	0,073
42	0,200	0,123
43	0,155	0,209
44	0,180	0,123
45	0,120	0,068
46	0,100	0,136
47	0,040	0,095
48	0,010	0,018
49	0	0,005
50	0	0,005

n, número de indivíduos; * teste de Kolmogorov-Smirnov: KS = 1,33; $P > 0,05$.

Indivíduos do grupo total (obesos e não-obesos), portadores de alelos 41 ou 42 da HVR D18S858, apresentaram valores de IMC e circunferência abdominal superiores ($P < 0,05$) e de RCQ similares ($P = 0,775$) aos dos indivíduos não-portadores (**TABELA 13**). Essas diferenças não foram observadas nos indivíduos obesos e não-obesos, quando analisados separadamente.

TABELA 12. *Frequências de portadores dos alelos 41 ou 42 da HVR D18S858 (MC4R) entre indivíduos agrupados como obesos e não-obesos; de acordo com a distribuição de gordura corporal em indivíduos obesos; e de valores circunferência abdominal de risco para co-morbidades em obesos e não-obesos.*

Genótipos D18S858			
Grupos	Portadores de alelos 41 ou 42	Não-portadores	
Obesos (n=100)	57 (57%)	43 (43%)	$\chi^2 = 14,509$; 1 g.l., $P < 0,001$
Não-obesos (n=110)	33 (30%)	77 (70%)	
Obesidade Central (n=85)	46 (54%)	39 (46%)	$\chi^2 = 0,846$; 1 g.l., $P = 0,358$
Obesidade Ginóide (n=14)	10 (71%)	4 (29%)	
CA $\geq$ V.R. (n=131)	66 (50%)	65 (50%)	$\chi^2 = 8,579$; 1 g.l., $P = 0,003$
CA < V.R. (n=77)	22 (29%)	55 (71%)	

n, número de indivíduos, g.l., grau de liberdade; CA, circunferência abdominal; V.R., valor de risco.

TABELA 13. *Valores de índice de massa corporal, circunferência abdominal e relação cintura-quadril de portadores de alelos 41 ou 42 da HVR D18S858 (MC4R), em indivíduos do grupo total (obesos e não-obesos).*

Genótipos D18S858			
Parâmetros	Portadores de alelos 41 ou 42 (n=90)	Não-portadores (n=120)	P
IMC (kg/m ²)	31,4 $\pm$ 6,7	28,4 $\pm$ 6,8	0,002 ^a
CA (cm)	100,5 $\pm$ 14,8	96,0 $\pm$ 16,1	0,040 ^b
RCQ	0,90 $\pm$ 0,06	0,89 $\pm$ 0,07	0,775 ^b

Média $\pm$ DP; n, número de indivíduos; IMC, índice de massa corporal; CA, circunferência abdominal; RCQ, relação cintura-quadril. ^a teste de Mann-Whitney; ^b teste t.

4.6. Estudo da região hipervariável D1S200 (LEPR)

O gráfico da distribuição de freqüências dos alelos da HVR D1S200 encontra-se ilustrado na **FIGURA 13**. Foram observados alelos contendo de 13 a 27 repetições da seqüência CA (tamanhos moleculares entre 152 e 180 bp). Os alelos mais freqüentes foram os com 17 repetições (160 bp), entre os indivíduos obesos, e com 18 repetições (162 bp) entre os indivíduos não-obesos.

FIGURA 13. Distribuição dos alelos da região hipervariável D1S200 (LEPR) em indivíduos obesos (n = 96) e não-obesos (n = 87).

Na **TABELA 14** estão descritas as freqüências dos alelos da HVR D1S200. Para esta HVR foram genotipados 96 indivíduos obesos e 87 indivíduos não-obesos. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre as freqüências dos alelos de indivíduos obesos e não-obesos ($KS = 1,01$; $P > 0,05$). A maior diferença entre as freqüências acumulativas dos alelos, detectada entre esses grupos, foi de $D=0,11$ para o alelo com 17 repetições (alelo 17). Pode-se observar que a freqüência desse alelo foi significativamente maior no grupo de indivíduos obesos em

comparação com o grupo de indivíduos não-obesos (Obesos: 0,203 e Não-obesos: 0,075). Em função disso, os indivíduos portadores de pelo menos um alelo 17 foram separados dos demais (não-portadores).

TABELA 14. *Freqüências dos alelos da D1S200 (LEPR) em indivíduos obesos e não-obesos.*

Alelos (nº de repetições)	FREQUÊNCIAS*	
	Obesos (n = 96)	Não-obesos (n = 87)
13	0,005	0
14	0,010	0
15	0,031	0,011
16	0,063	0,121
17	0,203	0,075
18	0,151	0,184
19	0,099	0,115
21	0,188	0,167
22	0,063	0,144
23	0,130	0,103
23	0,031	0,057
24	0,005	0,011
25	0,016	0
26	0,005	0,006
27	0	0,006

n, número de indivíduos; * teste de Kolmogorov-Smirnov: KS = 1,01; $P > 0,05$.

Como se observa na **TABELA 15**, a freqüência dos portadores do alelo 17 entre indivíduos obesos foi significativamente maior que a dos não-portadores ($P = 0,003$). Além disso, indivíduos portadores do alelo 17 tiveram maior freqüência de valores de circunferência abdominal de risco para co-morbidades ($P = 0,046$), no grupo total (obesos e não-obesos). Por outro lado, a freqüência de obesidade central no grupo de portadores do alelo 17 foi semelhante a dos não-portadores.

TABELA 15. *Freqüências de portadores do alelo 17 da HVR D1S200 (LEPR) entre indivíduos agrupados como obesos e não-obesos; de acordo com a distribuição de gordura corporal em indivíduos obesos; e de valores circunferência abdominal de risco para co-morbididades em obesos e não-obesos.*

Genótipos D1S200		
Grupos	Portadores do alelo 17	Não-portadores
Obesos (n=96)	31 (32%)	65 (68%)
Não-obesos (n=87)	11 (13%)	76 (87%)
Obesidade Central (n=82)	27 (33%)	55 (67%)
Obesidade Ginóide (n=13)	3 (23%)	10 (77%)
CA $\geq$ V.R. (n=120)	33 (28%)	87 (72%)
CA < V.R. (n=61)	8 (13%)	53 (87%)

$\chi^2 = 8,883$;
1 g.l., $P = 0,003$

$P = 0,749^a$

$\chi^2 = 3,991$;
1 g.l. $P = 0,046$

n, número de indivíduos, g.l., graus de liberdade; CA, circunferência abdominal; V.R., valor de risco.

^a teste exato de Fisher.

Indivíduos do grupo total (obesos e não-obesos), portadores do alelo 17 da HVR D1S200 apresentaram valores mais elevados de IMC, circunferência abdominal e RCQ ($P < 0,05$) que os indivíduos não-portadores (**TABELA 16**). No grupo de obesos, entretanto, os valores de IMC, de circunferência abdominal e de RCQ dos portadores do alelo 17 foram semelhantes aos dos não-portadores ($P > 0,05$). Resultados semelhantes foram observados no grupo de não-obesos.

TABELA 16. Valores de índice de massa corporal, circunferência abdominal e relação cintura-quadril de portadores do alelo 17 da HVR D1S200 (LEPR), em indivíduos do grupo total (obesos e não-obesos).

Parâmetros	Genótipos D1S200		valor de <i>P</i>
	Portadores do alelo 17 (n=42)	Não-portadores (n=141)	
IMC (kg/m ²)	32,5 ± 5,9	29,3 ± 7,3	0,009 ^a
CA (cm)	104,5 ± 14,6	96,4 ± 15,8	0,004 ^b
RCQ	0,92 ± 0,07	0,89 ± 0,07	0,004 ^b

Média ± DP; n, número de indivíduos; IMC, índice de massa corporal; CA, circunferência abdominal; RCQ, relação cintura-quadril. ^a teste de Mann-Whitney; ^b teste *t*.

4.7. Estudo de haplótipos do LEP

Com a finalidade de avaliar a possível associação entre o polimorfismo *LEP* G-2548A e a região hipervariável *LEP* 3'HVR, foi realizado o estudo de distribuição de haplótipos formados pela combinação dos genótipos das duas variantes genéticas.

As freqüências das combinações entre os genótipos do polimorfismo *LEP* G-2548A e da *LEP* 3'HVR, nos indivíduos do grupo total (obesos e não-obesos), podem ser observadas na **TABELA 17**. A análise de desequilíbrio de ligação mostra que as distribuições dos genótipos dos polimorfismos *LEP* G-2548A e da *LEP* 3'HVR não são aleatórias ($\chi^2 = 77,3486$; $P < 0,0001$), apontando para uma possível associação entre as variantes estudadas.

Na **FIGURA 14**, encontra-se o gráfico de distribuição de freqüências das combinações entre os genótipos do polimorfismo *LEP* G-2548A e da *LEP* 3'HVR nos indivíduos obesos e não-obesos, separadamente. O haplótipo heterozigoto -2548GA/3'HVRI/II (**GA/I/II**) foi o mais freqüente em ambos os grupos (Obesos: 0,32 e Não-obesos: 0,35). A freqüência do haplótipo -2548GG/3'HVRI/II (**GG/I/II**) foi maior no grupo de

obesos, enquanto que o haplótipo -2548**AA**/3'HVR**II/II** (**AA/II/II**) foi mais freqüente entre não-obesos.

TABELA 17. *Freqüência das combinações entre os genótipos dos polimorfismos LEP G-2548A e LEP 3'HVR nos indivíduos do grupo total (obesos e não-obesos).*

Genótipos LEP G-2548A			
Genótipos LEP 3'HVR	GG	GA	AA
I/I	33 (15,71%)	13 (6,19%)	1 (0,48%)
I/II	29 (13,81%)	71 (33,81%)	4 (1,90%)
II/II	10 (4,76%)	20 (9,52%)	29 (13,81%)
Desequilíbrio de ligação: $\chi^2 = 77,3486$; 1 g.l., $P < 0,0001$			

Na **TABELA 18**, são apresentadas as freqüências dos haplótipos formados pelos genótipos do polimorfismo **LEP G-2548A** e da **LEP 3'HVR**: **haplótipo G/I** (genótipos **GG/I/I**, **GG/I/II**, e **GA/I/I**), **haplótipo A/II** (genótipos **AA/II/II**, **AA/I/II** e **GA/II/II**) e **demais haplótipos** (genótipos **GG/II/II**, **GA/I/II** e **AA/I/I**), em indivíduos obesos e não-obesos. A freqüência do haplótipo **G/I** foi significativamente maior entre obesos, enquanto que a freqüência do haplótipo **A/II** foi maior em indivíduos não-obesos ($\chi^2 = 8,007$; $P = 0,018$). O haplótipo **G/I** também foi mais freqüente nos indivíduos com obesidade central ($\chi^2 = 6,136$; $P = 0,047$). Por outro lado, não se observaram diferenças estatisticamente significantes de freqüência de valores de circunferência abdominal de risco para co-morbidades entre os diferentes haplotipos.

FIGURA 14. Distribuição das frequências das combinações entre genótipos do polimorfismo *LEP* G-2548A e da *LEP* 3'HVR, nos indivíduos obesos e não-obesos.

Os valores de IMC, circunferência abdominal e RCQ também foram avaliados entre os indivíduos do grupo total portadores de diferentes haplótipos (**TABELA 19**). Embora os valores de IMC, circunferência abdominal e RCQ dos indivíduos com haplótipo **G/I** tenham sido maiores e os dos com haplótipo **A/II** menores, as diferenças não foram estatisticamente significantes ($P > 0,05$). Resultados similares foram observados para os indivíduos agrupados como obesos e não-obesos, analisados separadamente.

TABELA 18. *Freqüências de haplótipos entre os polimorfismos LEP G-2548A e LEP 3' HVR em indivíduos agrupados como obesos e não-obesos; de acordo com a distribuição de gordura corporal em indivíduos obesos; e de valores circunferência abdominal de risco para co-morbidades em obesos e não-obesos.*

Haplótipos				
Grupos	G/I	Outros	A/II	
Obesos (n=100)	45 (45%)	36 (36%)	19 (19%)	$\chi^2 = 8,007$; 2 g.l., $P = 0,018$
Não-obesos (n=110)	30 (27%)	46 (43%)	34 (30%)	
Obesidade Central (n=85)	42 (49%)	26 (31%)	17 (20%)	$\chi^2 = 6,136$; 2 g.l., $P = 0,047$
Obesidade Ginóide (n=14)	3 (21%)	9 (65%)	2 (14%)	
CA $\geq$ V.R. (n=131)	54 (41%)	45 (34%)	32 (25%)	$\chi^2 = 4,579$; 2 g.l., $P = 0,101$
CA < V.R. (n=77)	21 (27%)	36 (47%)	20 (26%)	

n, número de indivíduos, g.l., graus de liberdade; CA, circunferência abdominal; V.R., valor de risco
Haplótipo G/I: GG/I/I, GG/I/II, e GA/I/I; Haplótipo A/II: AA/II/II, AA/I/II e GA/II/II;
Outros: GG/II/II, GA/I/II e AA/I/I.

TABELA 19. *Valores de índice de massa corporal, circunferência abdominal e relação cintura-quadril de acordo com os haplótipos do polimorfismo LEP G-2548A e da LEP 3'HVR, em indivíduos do grupo total (obesos e não-obesos).*

Haplótipos				
Parâmetros	G/I (n=75)	Outros (n=82)	A/II (n=53)	valor de P
IMC (kg/m ²)	30,9 $\pm$ 6,9	29,5 $\pm$ 7,1	28,1 $\pm$ 6,4	0,076 ^b
CA (cm)	101,3 $\pm$ 15,5	96,4 $\pm$ 15,5	95,3 $\pm$ 15,7	0,056 ^b
RCQ	0,91 $\pm$ 0,07	0,88 $\pm$ 0,07	0,89 $\pm$ 0,07	0,081 ^b

Média $\pm$ DP; n, número de indivíduos; IMC, índice de massa corporal; CA, circunferência abdominal; RCQ, relação cintura-quadril. ^a teste de Kruskal-Wallis (ANOVA on Ranks); ^b ANOVA.
Haplótipo G/I: GG/I/I, GG/I/II, e GA/I/I; Haplótipo A/II: AA/II/II, AA/I/II e GA/II/II;
Outros haplótipos: GG/II/II, GA/I/II e AA/I/I.

5. DISCUSSÃO

Ao analisarmos os dados biodemográficos da casuística de nosso estudo, observamos nos indivíduos obesos, todas as características já estabelecidas e inerentes à presença de obesidade, como elevados valores de IMC, circunferência abdominal e RCQ. Observamos, também, idades mais elevadas entre as mulheres obesas. A associação entre o aumento da idade e a obesidade já foi relatada em americanos brancos, negros e mexicanos-americanos (FLEGAL *et al.*, 2002), poloneses (JANKOWSKA *et al.*, 2000) e em indivíduos brasileiros, brancos e negros, habitantes de Pelotas (RS) (GIGANTE *et al.*, 1997) e das regiões nordeste e sudeste do Brasil (ABRANTES *et al.*, 2003).

A diferença acentuada entre médias das idades de mulheres obesas e não-obesas, já foi descrita por HUBERT *et al.* (1983) quando compararam os valores percentuais da razão entre o peso do indivíduo e o peso estabelecido como ideal para cada sexo pela *Metropolitan Life Insurance Co.*, denominado *Metropolitan Relative Weight* (MRW), modelo para classificação da obesidade em indivíduos que participaram do estudo Framingham (*Framingham Heart Study*), entre 1949 e 1950. Foi observado que havia diferenças entre as distribuições dos valores de MRW entre mulheres de diferentes faixas etárias, com destaque para valores médios próximos do ideal na faixa de idades entre 28 e 39 anos. Indivíduos do sexo masculino apresentaram distribuições de MRW similares em todas as faixas etárias (HUBERT *et al.*, 1983). Estudos mais recentes realizados nos Estados Unidos mostraram que mulheres apresentaram maior prevalência de obesidade em idades acima de 50 anos (SCHOENBORN *et al.*, 2002; FLEGAL *et al.*, 2002).

A idade média para o aparecimento de sintomas associados à transição para a menopausa (perimenopausa) encontra-se entre 45 e 47 anos (BURGER *et al.*, 2002). Portanto, a menopausa poderia estar relacionada aos valores de IMC mais elevados encontrados entre as mulheres obesas (LOVEJOY, 2003). Entretanto, apesar de termos encontrado correlação entre a elevação da idade e a menopausa, a presença da menopausa parece não estar associada ao aumento dos valores de IMC no grupo de mulheres do nosso estudo. Outros estudos obtiveram resultados similares, onde a menopausa apresenta pouca ou nenhuma influência sobre alterações nos valores de IMC (BLÜMEL *et al.*, 2001; DAVIES *et al.*, 2001; MATTHEWS *et al.*, 2001; LINS e SICHIERI, 2001).

Além de alta freqüência de hipertensão, nos indivíduos obesos foi também observada alta freqüência de diabetes, doença cardiovascular (DCV) e co-morbidades associadas com a obesidade.

A hipertensão tem sido extensamente associada à obesidade. Um estudo realizado com diferentes grupos étnicos encontrou associação entre a elevação do IMC e a freqüência de hipertensão, principalmente, em indivíduos americanos brancos não-hispânicos (COLIN BELL *et al.*, 2002).

As elevadas freqüência e risco de hipertensão em indivíduos obesos observadas em nosso estudo estão de acordo com resultados epidemiológicos obtidos de outros estudos realizados nas regiões sul, sudeste e nordeste do Brasil que encontraram elevada freqüência de obesidade entre indivíduos hipertensos (GUS *et al.*, 1998; CABRERA e JACOB FILHO, 2001; SABRY *et al.*, 2002).

Em nosso estudo, a hipertensão e o tabagismo foram os principais fatores de risco de DCV. A hipertensão e o tabagismo, associadas às outras co-morbidades e à própria obesidade, principalmente a obesidade central, são conhecidos fatores de risco para a DCV (SOWERS, 2003).

Também observamos alta freqüência de diabetes e de obesidade central nos indivíduos com DCV. A hiperglicemia e resistência à insulina, e a diabetes tipo 2, estão intimamente associados à obesidade por mecanismos

que ainda não se encontram totalmente esclarecidos (HABER *et al.*, 2002; NAUCK *et al.*, 2003; NESTO, 2003).

A hiperglicemia observada em indivíduos obesos pode estar associada às concentrações séricas mais elevadas de triglicerídeos obtidas nesses indivíduos. A análise logística com múltiplos fatores exibiu uma chance em torno de três vezes maior dos indivíduos obesos apresentarem valores elevados de triglicerídeos. Além disso, foram observadas diferenças significantes entre os valores de todos os outros parâmetros bioquímicos mensurados (colesterol total, LDL-C, VLDL-C, apo B), excetuando-se a apo A1 que, apesar de apresentar um valor médio menor entre indivíduos obesos, tal diferença não foi estatisticamente significativa.

KAHN e VALDEZ (2003) observaram, a partir de um estudo com 9.183 indivíduos americanos brancos, negros, hispânicos e de outras etnias, que indivíduos 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 ácido úrico, e maior risco para diabetes tipo 2, como foi também observado em nosso estudo.

Considerando a obesidade uma doença multifatorial e poligênica, foram avaliados marcadores moleculares localizados em genes que codificam proteínas envolvidas no controle da saciedade.

As frequências do alelo **G** do polimorfismo *LEP* G-2548A observadas nos indivíduos obesos (0,65), são semelhantes às frequências observadas em indivíduos franceses com sobrepeso (0,64) (MAMMÈS *et al.*, 2000) e em mulheres brancas americanas com IMC superior a 40 kg/m² (0,65) (LI *et al.*, 1999).

A associação entre o alelo **G** do polimorfismo *LEP* G-2548A e a obesidade observada em nosso estudo, foi também demonstrada em mulheres americanas (LI *et al.*, 1999) e em franceses (MAMMÈS *et al.*, 2000). Entretanto, não pudemos estabelecer relação entre a obesidade e o genótipo **GG**, na nossa população, diferentemente do que foi observado por esses autores.

Li *et al.* (1999), ao compararem as freqüências alélicas do polimorfismo *LEP* G-2548A em mulheres caucasianas americanas, encontraram maior freqüência do alelo **G** e de genótipo **GG** em 100 mulheres com IMC maior a 40 kg/m², quando comparada a de 55 mulheres com valores IMC inferiores a 27 kg/m².

Em estudo realizado por MAMMÈS *et al.* (2000) com indivíduos franceses com valores de IMC superiores ou inferiores a 27 kg/m², também foi observada maior freqüência do alelo **G** e genótipo **GG** em indivíduos com valores de IMC superiores a 27 kg/m² (n = 109), em comparação com os indivíduos cujo IMC era inferior a 27 kg/m² (n = 314).

Nos trabalhos anteriores, foi utilizado o valor de corte de IMC de 27 kg/m², para separar obesos/sobrepeso e não-obesos, enquanto que no nosso estudo empregamos o valor de IMC de 30 kg/m², de acordo com a classificação da OMS (WHO, 2000; NHLBI, 2000), para separar os indivíduos obesos de não-obesos. É possível que a diferença entre os de valores de corte de IMC tenham contribuído para a falta de relação entre o genótipo **GG** do polimorfismo *LEP* G-2548A e a obesidade observada em nosso estudo.

Pela primeira vez, foram estudadas as freqüências dos genótipos e alelos do polimorfismo *LEP* G-2548A, entre indivíduos brasileiros portadores de obesidade central e ginoide, e entre indivíduos com e sem presença de valores de circunferência abdominal de risco para co-morbidades. Também, pela primeira vez, foi estudada a influência desse polimorfismo sobre variações nos valores de IMC, circunferência abdominal e RCQ nos indivíduos do grupo total, e de indivíduos obesos e não-obesos, separadamente. Entretanto, não foram encontradas associações entre o polimorfismo *LEP* G-2548A e a obesidade central, ou a presença de valores de circunferência abdominal de risco para co-morbidades, ou influência desse polimorfismo sobre variações nos valores de IMC, circunferência abdominal e RCQ.

Quando se avaliou a região hipervariável *LEP* 3'HVR foram observados tamanhos moleculares semelhantes aos encontrados em

indivíduos representantes de diversas populações, como americanos de origem européia, afro-americanos, europeus britânicos e de outras regiões da Europa, africanos, chineses de Hong Kong e Taiwan, habitantes da Samoa Americana, entre outros (MOFFETT *et al.*, 2002; MCGARVEY *et al.* 2002). Por outro lado, a faixa de alelos encontrada em nosso estudo foi diferente da descrita em indivíduos japoneses (SHINTANI *et al.*, 1996). Considerando que, nos três estudos, a detecção dos alelos foi realizada por PCR, utilizando os mesmos iniciadores descritos por SHINTANI *et al.* (1996), os diferentes tamanhos moleculares encontrados entre indivíduos japoneses e de outras populações podem ser explicadas por diferenças étnicas.

A análise de freqüências dos alelos da *LEP* 3'HVR em indivíduos provenientes de diferentes etnias revelou que indivíduos americanos de descendência européia apresentaram maior freqüência do alelo de tamanho 154 bp (0,19), entre os alelos da Classe I, e de 230 e 234 bp (0,10 para ambos), entre os alelos da Classe II (MOFFETT *et al.*, 2002). Indivíduos ingleses apresentam baixa freqüência dos alelos da Classe II (a maior freqüência encontrada foi de 0,05 para alelos de 226 bp). Os alelos de maior freqüência encontrados em nosso estudo (162 bp: 0,185; e 230/234 bp: 0,10) têm freqüências similares aos encontrados em indivíduos americanos de origem européia, diferindo somente com relação ao tamanho molecular do alelo da Classe I mais freqüente (MOFFETT *et al.*, 2002).

Em nosso estudo, análise das freqüências dos alelos da *LEP* 3'HVR revelou que não há diferenças entre a distribuição de alelos de indivíduos obesos e não-obesos.

MCGARVEY *et al.* (2002) encontraram maior freqüência do alelo de tamanho molecular 226 bp (30 repetições da seqüência TTTC), em habitantes da Samoa Americana com baixos valores de IMC (88 indivíduos com valores de IMC entre 18,7 e 26,1 kg/m²; freqüência do alelo 226: 0,16), quando comparados aos indivíduos com IMC elevado (93 indivíduos com valores de IMC entre 38,4 e 67,4 kg/m²; freqüência do alelo 226: 0,04).

Em nosso estudo observamos freqüências similares desse alelo entre indivíduos obesos e não-obesos (Obesos: 0,065 e Não-obesos: 0,085). No entanto, indivíduos da Samoa Americana apresentaram maiores freqüências dos alelos de maiores tamanhos moleculares (entre 230 e 238 bp ou, de 31 a 33 repetições), diferentemente do observado nos indivíduos de nosso estudo (MCGARVEY *et al.*, 2002).

MOFFETT *et al.* (2002) também observaram diferença entre as freqüências do alelo 226 entre indivíduos americanos de descendência européia (0,09) e habitantes da Samoa Americana (0,16). Quando os genótipos da *LEP* 3' HVR foram agrupados de acordo com as classes de alelos, observamos que a freqüência de portadores de pelo menos um alelo da Classe I (genótipos **I/I** + **I/II**) foi maior (0,80) entre indivíduos obesos quando comparado aos não-obesos (0,65, $p = 0,020$). Esse resultado parece indicar que os alelos da Classe I estão associados com a obesidade na nossa população.

SHINTANI *et al.* (1996) encontraram tendência de peso corporal elevado, em indivíduos japoneses portadores genótipo **I/I** do *LEP* 3'HVR ($P = 0,050$). Em estudo posterior, SHINTANI *et al.* (2002), apesar de terem observado valores mais elevados de peso corporal e IMC em indivíduos japoneses com genótipo **I/I**, essas diferenças não foram estatisticamente significantes.

O genótipo **I/I** parece, portanto, ter um efeito sobre os valores de IMC e circunferência abdominal dos indivíduos do grupo total, pois foram observados maiores valores médios dessas medidas em indivíduos portadores de pelo menos um alelo da Classe I.

Ao analisarmos separadamente os indivíduos agrupados como obesos e não-obesos, a associação entre o genótipo **I/I** e a obesidade não é observada, possivelmente devido ao menor número de indivíduos nesses grupos quando estudados separadamente. Além disso, a análise das freqüências dos genótipos e dos alelos não revelou associação do *LEP* 3'HVR com a obesidade central ou com a presença de valores de circunferência abdominal de risco para co-morbididades.

No nosso estudo foi possível observar que o polimorfismo *LEP* G-2548A e a *LEP* 3'HVR estavam em desequilíbrio de ligação. Com isso foi possível formar haplótipos pela combinação dos genótipos desses polimorfismos e estudar a associação entre a obesidade e os haplótipos formados. A maior frequência da combinação entre os genótipos homozigotos **GG/I/I** e **AA/II/II** indicam a possível ligação entre os alelos **G** e **I**, e entre os alelos **A** e **II**.

O desequilíbrio de ligação é definido pela associação não-aleatória de alelos pertencentes a loci adjacentes (ARDLIE *et al.*, 2002). Estudos de desequilíbrio de ligação têm sido utilizados para se determinar regiões localizadas entre alelos em desequilíbrio e que possam estar associadas a doenças, além de ser usado em estudos de filogenia (ROGERS *et al.*, 2000; ARDLIE *et al.*, 2002; AZEVEDO *et al.*, 2002).

Ao analisar as frequências dos haplótipos formados entre os polimorfismos *LEP* G-2548A e 3'HVR, foi observada maior frequência do haplótipo **G/I** em obesos e do haplótipo **A/II** em não-obesos. Além disso, a frequência do haplótipo **G/I** foi maior nos indivíduos com obesidade central. Esses resultados indicam uma possível associação entre o haplótipo **G/I** com o desenvolvimento da obesidade e a presença de obesidade central.

Em nosso estudo, parece ser importante a determinação da fase gamética (haplótipos proveniente de um mesmo gameta) dos haplótipos identificados, pois podem ser observadas tendências em valores mais elevados de IMC, circunferência abdominal e RCQ, em indivíduos portadores do haplótipo **G/I** no grupo total. Infelizmente, nosso modelo de estudo não permitiu a combinação de alelos em indivíduos duplos heterozigotos para os polimorfismos *LEP* G-2548A e *LEP* 3'HVR (**GA/I/II**). A classificação desses indivíduos em um terceiro grupo de haplótipos ("outros haplótipos"), juntamente com indivíduos que são portadores das combinações **GG/II/II** e **AA/I/I**, pode estar influenciando no resultado da análise.

SUVIOLAHTI *et al.* (2003) encontraram evidências da associação entre os haplótipos formados por três polimorfismos do gene *SLC6A14*, que

codifica para a proteína transportadora de aminoácidos neutros e catiônicos B⁰⁺ Na- e Cl- dependente, e a obesidade em homens finlandeses. Esse gene está localizado no cromossomo Xq24, de cópia única no genoma de indivíduos do sexo masculino, o que permitiu o conhecimento da fase gamética nesses indivíduos.

Outros estudos detectaram a associação entre haplótipos localizados em genes que foram associados à obesidade, a adiponectina e a apolipoproteína AIV (apoAIV), em estudos que, apesar de não terem sido estabelecidas as fases gaméticas dos haplótipos estudados, envolveram maior número de indivíduos, o que permitiu a avaliação da influência desses haplótipos na obesidade. MENZAGHI *et al.* (2003) estudaram polimorfismos T45G e G276T do gene da adiponectina em 413 indivíduos italianos e observaram que as combinações de genótipos 45TT e 45TG, com os genótipos 276GG e 276GT eram mais freqüentes em indivíduos com maior peso corporal ($P = 0,03$). A combinação de genótipos dos polimorfismos *Xba*I (genótipos X^*1 e X^*2), Thr347Ser e Gln360His do gene da apoAIV, foi estudada em 391 indivíduos brasileiros do Rio Grande do Sul (FIEGENBAUM e HUTZ, 2003). Esse estudo mostrou uma associação entre a presença dos haplótipos X^*2 -347Ser-360Gln e X^*1 -347Thr-360His e a obesidade.

Com base nesses estudos, a genotipagem dos progenitores para estabelecer a fase gamética dos haplótipos *LEP* de indivíduos heterozigotos, ou o aumento do número de indivíduos estudados, possibilitaria avaliação mais precisa da influência do haplótipo **G/I** sobre o desenvolvimento da obesidade.

Em nosso estudo, verificamos que as freqüências de alelos da HVR D2S1788 (próxima ao *POMC*), foram similares entre obesos e não-obesos; entre os indivíduos obesos com distribuição de gordura central ou ginóide; e entre indivíduos do grupo total que apresentavam ou não valores de circunferência abdominal de risco para co-morbidades. Não foram detectadas diferenças entre freqüências de alelos que pudessem indicar qual, ou quais desses alelos poderiam estar associados com variações nos

valores de IMC, circunferência abdominal e RCQ. Não foi possível comparar os tamanhos moleculares dos fragmentos obtidos e as frequências dos alelos da HVR D2S1788, pois os estudos anteriores com essa HVR não descreveram os tamanhos moleculares e frequências alélicas nas populações estudadas (COMUZZIE *et al.*, 1997; ROTIMI *et al.*, 1999; MCGARVEY *et al.* 2002).

Embora a HVR D2S1788 ter sido fortemente associada com variações na concentração de leptina e na massa de gordura corporal em estudos de análise de ligação (COMUZZIE *et al.*, 1997; ROTIMI *et al.*, 1999), não foi possível estabelecer a sua relação com a obesidade na nossa população.

As HVR D18S858 (próxima ao *MC4R*) e D1S200 (próxima ao *LEPR*) também foram utilizadas em estudos de análise de ligação (CHAGNON *et al.*, 1997a; ÖHMAN *et al.*, 1999; CHAGNON *et al.*, 1997b). Até o momento, nenhum estudo foi realizado na tentativa de avaliar a influência dessas HVR sobre a obesidade, os valores de circunferência abdominal de risco para co-morbidades, a obesidade central, nem sobre alterações nos valores de IMC, circunferência abdominal e RCQ.

Observamos maior frequência de indivíduos portadores de pelo menos um alelo 41 ou 42 da HVR D18S858 no grupo de indivíduos obesos em comparação com os não-obesos ($P < 0,001$). Foi também observado que indivíduos com esses alelos tinham maior frequência de medidas de circunferência abdominal superiores às de risco para co-morbidades ($P = 0,003$).

Além disso, indivíduos com alelos 41 ou 42 da D18S858 apresentaram maiores valores de IMC e circunferência abdominal que os portadores dos demais alelos ($P < 0,05$). Esses achados apontam para uma possível influência dos alelos 41 e 42 da HVR D18S858 no desenvolvimento de obesidade e da presença de medidas de circunferência abdominal com elevado risco de co-morbidades.

Quanto à análise de frequência de alelos da HVR D1S200, o alelo 17 apresentou maior frequência nos indivíduos não-obesos. A análise da

distribuição dos genótipos que contém, ao menos, um alelo 17 revelou forte influência sobre a obesidade e a presença de medidas acima dos valores de risco para circunferência abdominal, além de estar associado à elevados valores de IMC, circunferência abdominal e RCQ. Esses resultados apontam para a possível influência do alelo 17 da HVR D1S200 sobre fenótipos da obesidade.

Entretanto, no estudo das HVR D18S858 e D1S200, ao analisarmos os valores de IMC, circunferência abdominal e RCQ dos indivíduos obesos e não-obesos, separadamente, não encontramos as diferenças que foram observadas no grupo total. Esse mesmo resultado foi observado na análise dos valores de IMC, circunferência abdominal e RCQ dos polimorfismos *LEP* 3'HVR e dos haplótipos do *LEP*. Esse efeito pode ser devido ao pequeno número de indivíduos resultantes da divisão em grupos menores. Portanto, a confirmação da influência desses genes sobre variações nos valores de IMC, circunferência abdominal e RCQ depende de uma amostragem populacional com um número maior de indivíduos.

Marcadores moleculares, como as microssatélites, têm sido muito utilizados em estudos de análise de ligação para a determinação de regiões dos genes que podem estar associadas a doenças (BENNETT, 2000), como foi observado nos estudos da obesidade (RANKINEN *et al.*, 2002). Além dessa aplicação, as microssatélites podem estar envolvidas diretamente na regulação de genes, como é o caso da *HUMTH01*, uma repetição do tetranucleotídeo TCAT, que está envolvida na regulação transcricional do gene da tirosina hidroxilase (ALBANESE *et al.*, 2001).

O caráter multifatorial e poligênica da obesidade torna importante a avaliação de um grande número de genes que codificam para proteínas que estejam associadas à obesidade. Um grande número de *Quantitative Trait Loci* (QTL), mutações e polimorfismos já foram descritos, e quantidades crescentes de genes e marcadores, associados ou ligados ao fenótipo da obesidade, são relatados (RANKINEN *et al.*, 2002; CHAGNON *et al.*, 2002; OBESITY, 2004). No entanto, ainda não foi possível estabelecer os

mecanismos pelos quais os genes influenciam no desenvolvimento da obesidade.

A identificação das combinações entre genes e mutações que contribuem para a predisposição à obesidade e o estabelecimento das interações entre o fator genético e os demais fatores, culturais e ambientais, permanecem entre os principais esforços para o controle da obesidade e das co-morbidades a ela relacionadas (RANKINEN *et al.*, 2002; CUMMINGS e SCHWARTZ, 2003).

Em nosso estudo, foram selecionadas HVR que foram fortemente associadas aos fenótipos relacionados à obesidade, em estudos de análise de ligação. Entre essas HVR, somente o polimorfismo *LEP* 3'HVR já havia sido estudado com relação a sua possível influência sobre fenótipos da obesidade em diferentes populações (SHINTANI *et al.*, 1996; MCGARVEY *et al.*, 2002).

A análise dos resultados deste estudo sugere que as HVR D1S200, D18S858, *LEP* 3'HVR e os polimorfismos *LEP* G-2548A e *LEP* 3'HVR estão associados com o fenótipo da obesidade, na nossa população.

Em nosso estudo, identificamos possível influência dessas HVR sobre variações nos valores de IMC, circunferência abdominal e RCQ, apesar dessa influência não ter sido observada nos indivíduos agrupados em obesos e não-obesos, separadamente. Esses resultados sugerem à busca de mais evidências que confirmem os resultados obtidos nas análises do grupo total. Portanto, mais estudos são necessários para elucidar o papel dessas HVR no desenvolvimento da obesidade.

6. CONCLUSÕES

6.1. Os genótipos e haplótipos das variantes G-2548A e 3'HVR do gene da leptina estão associados com a obesidade em indivíduos brasileiros brancos.

6.2. A região hipervariável *LEP* 3'HVR do gene da leptina está associada à variação nos valores de índice de massa corporal e de circunferência abdominal de indivíduos brasileiros brancos.

6.3. As regiões hipervariáveis D18S858 (*MC4R*) e D1S200 (*LEPR*) estão associadas com a obesidade e com variações nos valores de índice de massa corporal e de circunferência abdominal de indivíduos brasileiros brancos.

6.4. A região hipervariável D2S1788 (*POMC*) não está associada à obesidade em indivíduos brasileiros brancos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- ABRANTES, M.M.; LAMOUNIER, J.A.; COLOSIMO, E.A. Overweight and obesity prevalence in Northeast and Southeast Regions of Brazil. **Rev Assoc Med Bras**, São Paulo/SP, Brasil, v. 49, n.2, p.162-6, 2003.
- ADAN, R.A.H.; GISPEN, W.H. Brain melanocortin receptors: from cloning to function. **Peptides**, Nova Iorque/NY, EUA, v.18, n.8, p.1279-1287, 1997.
- ALBANESE, V., BIGUET, N.F., KIEFER, H., BAYARD, E., MALLET, J., MELONI, R. Quantitative effects on gene silencing by allelic variation at a tetranucleotide microsatellite. **Hum Mol Genet**, Oxford, RU, v10, n.17, p.1785-1792, 2001.
- ARDLIE, K.G.; KRUGLYAK, L.; SEIELSTAD, M. Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. **Nat Rev Genet**, Londres, RU, v.3, n.4, p.299-309, 2002.
- ARNER, P. Genetic variance and lipolysis regulation: implications for obesity. **Ann Med**, Londres, RU, v.33, n.8, p.542-546, 2001.
- ARNER, P. Obesity – a genetic disease of adipose tissue? **Br J Nutr**, Wallingford, RU, v.83, suppl.1, p.S9-S16, 2000.
- AZEVEDO, L.; CALAFELL, F.; VILARINHO, L.; AMORIM, A. Haplotype analysis and phylogeny of ornithine transcarbamylase polymorphisms. **Ann Hum Genet**, Cambridge, RU, v.66, n.Pt 5-6, p.379-385, 2002.
- BABSON, A.L.; OLSON, D.R.; PALMIERI, T.; ROSS, A.F.; BECKER, D.M.; MULQUEEN, P.J. The IMMULITE assay tube: a new approach to heterogeneous ligand assay. **Clin Chem**, Washington/DC, EUA, v.37, n.9, p.1521-2, 1991.
- BAIK, I.; ASCHERIO, A.; RIMM, E.B.; GIOVANNUCCI, E.; SPIEGELMAN, D.; STAMPFER, M.J.; WILLETT, W.C. Adiposity and mortality in men. **Am J Epidemiol**, Baltimore/MD, EUA, v.152, n.3, p.264-71, 2000.
- BAILE, C.A.; DELLA-FERA, M.A.; MARTIN, R.J. Regulation of metabolism and body fat mass by leptin. **Annu Rev Nutr**, Palo Alto/CA, EUA, v.20, p.105-127, 2000.

* De acordo com a norma NBR 6032/89, preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o *Journals Database* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

- BATES, S.H.; MYERS, M.G.Jr. The role of leptin receptor signaling in feeding and neuroendocrine function. **Trends Endocrinol Metab**, Nova Iorque/NY, EUA, v.14, n.10, p.447-52, 2003.
- BEIGUELMAN, B. Dinâmica dos genes nas famílias e nas populações. **Sociedade Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto/SP, Brasil, cap.2, 1994, 212p
- BENDER, R., JOCKEL, K.H., RICHTER, B., SPRAUL, M., BERGER, M. Body weight, blood pressure, and mortality in a cohort of obese patients. **Am J Epidemiol**, Baltimore/MD, EUA, v.156, n.3, p.239-245.
- BENNETT, P. Demystified ... microsatellites. **Mol Pathol**. Londres, RU ; v.53, n.4, p.177-183, 2000.
- BERTILE, F.; OUDART, H.; CRISCUOLO, F.; MAHO, Y.L.; RACLOT, T. Hypothalamic gene expression in long-term fasted rats: relationship with body fat. **Biochem Biophys Res Commun**, San Diego/CA, EUA, v.303, n.4, p.1106-13, 2003.
- BJORNTORP, P.; ROSMOND, R. Neuroendocrine abnormalities in visceral obesity. **Int J Obes Relat Metab Disord**, Londres, RU, v. 24 Suppl 2:S80-S85, 2000.
- BJORNTORP, P.; ROSMOND, R. Obesity and cortisol. **Nutrition**, Burbank/CA, EUA, v.16, n.10, p.924-936, 2000
- BLAST, National Center for Biotechnology Information, BLAST, Nucleotide-nucleotide BLAST (blastn), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, 2004.
- BLUMEL, JE.; CASTELO-BRANCO, C.; ROCANGLIOLO, M. E.; BIFA, L.; TACLA, X.; MAMANI, L. Changes in body mass index around menopause: a population study of Chilean woman. **Menopause**, Nova Iorque/NY, EUA, v.8, n.4, p.239-244, 2001.
- BLUNDELL, J.E. A fisiologia do controle do apetite. In:HALPERN, A.; MATOS, A.F.G.; SUPLCY, H.L.; MANCINI, M.C.; ZANELLA, M.T. **Obesidade**. São Paulo/SP, Brasil: Lemos Editorial, 1998, p.103-114.
-

- BRAY, G.A. Afferent signals regulating food intake. **Proc Nutr Soc**, Wallingford, RU, v.59, n.3, p.373-384, 2000
- BURGER, H. G.; DUDLEY, E.C.; ROBERTSON, D.M.; DENNERSTEIN, L. Hormonal changes in the menopause transition. **Recent Prog Horm Res**. Nova Iorque/NY, EUA, v.57, p.257-275, 2002
- CABRERA, M.A.S.; JACOB FILHO, W. Obesidade em idosos: Prevalência, distribuição e Associação com Hábitos e co-morbidades. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, Rio de Janeiro/RJ, Brasil, v.45, n.5, p.494-501, 2001.
- CAI, X.J.; XIAO, H.L.; EVANS, M.; CLAPHAM, J.C.; WILSON, S.; ARCH, J.R.S.; MORRIS, R.; WILLIAMS, G. Orexins and feeding: special occasions or everyday occurrence? **Regul Pept**, Amsterdã, Holanda, v.104, n.1-3, p.1-9, 2002.
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention, Centers, Institutes & Offices, National Center for Health Statistics (NCHS), FASTATS A to Z, Overweight Prevalence, Prevalence of overweight and obesity among adults: United States, 1999-2000. <http://www.cdc.gov/nchs/products/pubs/pubd/hestats/obese/obse99.htm>, 2004.
- CHAGNON, Y.C.; RANKINEN, T.; SNYDER, E. E.; WEISNAGEL, S. J.; PERUSSE, L.; BOUCHARD, C. The human obesity gene map: the 2002 update. **Obes Res**. Silver Spring/MD, EUA, v.11, n.3, p.313-367, 2003.
- CHAGNON, Y.C.; CHUNG, W.K.; PERUSSE, L.; CHAGNON, M.; LEIBEL, R.L.; BOUCHARD, C. Linkages and associations between the leptin receptor (LEPR) gene and human body composition in the Quebec Family Study. **Int J Obes Relat Metab Disord**, Londres, RU, v.23, n.3, p.278-286, 1999.
- CHAGNON, Y.C.; PERUSSE, L.; LAMOTHE, M.; CHAGNON, M.; NADEAU, A.; DIONNE, F.T.; GAGNON, J.; CHUNG, W.K.; LEIBEL, R.L.; BOUCHARD, C. Suggestive linkages between markers on human 1p32-
-

- p22 and body fat and insulin levels in the Quebec Family Study. **Obes Res**, Silver Spring/MD, EUA, v.5, n.2, p.115-121, 1997.
- CHOR, D. Hipertensão arterial entre funcionários de banco estatal no Rio de Janeiro. Hábitos de vida e tratamento. **Arq Bras Cardiol**, São Paulo/SP, Brasil, v.71, n.5, p.653-660, 1998.
- CLÉMENT, K.; VAISSE, C.; LAHLOU, N.; CABROL, S.; PELLOUX, V.; CASSUTO, D.; LACORTE, J.M.; BASDEVANT, A.; BOUGNÈRES, P.; LEBOU, Y.; FROGUEL, P.; GUY-GRAND, B. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. **Nature**, Londres, RU, v.392, n.26, p.398-401, 1998.
- COLIN BELL, A., ADAIR, L.S., POPKIN, B.M. Ethnic differences in the association between body mass index and hypertension. **Am J Epidemiol**, Baltimore/MD, EUA, v.155, n.4, p.346-353, 2002.
- COMUZZIE, A.G.; HIXSON, J.E.; ALMASY, L.; MITCHELL, B.D.; MAHANEY, M.C.; DYER, T.D.; STERN, M.P.; MACCLUER, J.W.; BLANGERO, J. A major quantitative trait locus determining serum leptin levels and fat mass is located on human chromosome 2. **Nat Genet**, Nova Iorque/NY, EUA, v.15, n.3, p.273-6, 1997.
- COOPER, D.N.; BALL, E.V.; KRAWCZAK, M. The human gene mutation database. **Nucleic Acids Res**, Oxford, RU, v.26, n.1, p.285-287, 1998.
- COWLEY, M.A. Hypothalamic melanocortin neurons integrate signals of energy state. **Eur J Pharmacol**, Amsterdã, Holanda, v.480, n.1/3, p.3-11, 2003.
- CUMMINGS, D.E.; SCHWARTZ, M.W. Genetics and pathophysiology of human obesity. **Annu Rev Med**, Palo Alto/CA, EUA, v.54, p.453-71, 2003.
- CUMMINGS, D.E.; WEIGLE, D.S.; FRAYO, R.S.; BREEN, P.A.; MA, M.K.; DELLINGER, E.P.; PURNELL, J.Q. Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. **N Engl J Med**, Waltham/MA, EUA, v.346, n.21, p.1623-1630, 2002.
-

- DATASUS, Informações de Saúde, Morbidade, Informações Epidemiológicas, MORBIDADE, HOSPITALIZAÇÕES POR LOCAL DE INTERNAÇÃO – desde 1984, região e UF, <http://www.datasus.gov.br>, 2004.
- DAVIES, K. M.; HEANEY, R. P.; RECKER, R. R.; BARGER-LUX, M. J.; LAPPE, J. M. Hormones, weight change and menopause. **Int J Obes Relat Metab Disord**, Londres, RU, v.25, n.6, p.874-879, 2001
- DE VRY, J.; SCHREIBER, R. Effects of selected serotonin 5-HT₁ and 5-HT₂ receptor agonists on feeding behavior: possible mechanisms of action. **Neurosci Biobehav Rev**, Oxford, RU, v.24, n.3, p.341-53, 2000.
- DENKE, M.A.; SEMPOS, C.T.; GRUNDY, S.M. Excess body weight. An under-recognized contributor to dyslipidemia in white American women. **Arch Intern Med**, Chicago/IL, EUA, v.154, n.4, p.401-410, 1994.
- DENKE, M.A.; SEMPOS, C.T.; GRUNDY, S.M. Excess body weight. An underrecognized contributor to high blood cholesterol levels in white American men. **Arch Intern Med**, Chicago/IL, EUA, v.153, n.9, p.1093-1103, 1993.
- DUBERN, B.; CLÈMENT, K.; PELLOUX, V.; FROGUEL, P.; GIRARDET, J.P.; GUY-GRAND, B.; TOUNIAN, P. Mutational analysis of melanocortin-4 receptor, agouti-related protein, and alpha-melanocyte-stimulating hormone genes in severely obese children. **J Pediatr**, Orlando/FL, EUA, v.139, n.2, p.204-209, 2001.
- DUGGIRALA, R.; STERN, M.P.; MITCHELL, B.D.; REINHART, L.J.; SHIPMAN, P.A.; URESANDI, O.C.; CHUNG, W.K.; LEIBEL, R.L.; HALES, C.N.; O'CONNELL, P.; BLANGERO, J. Quantitative variation in obesity-related traits and insulin precursors linked to the OB gene region on human chromosome 7. **Am J Hum Genet**, Chicago/IL, EUA, v.59, n.3, p.694-703, 1996.

- ENGELAND, A.; BJORGE, T.; SELMER, R.M.; TVERDA, A. Height and body mass index in relation to total mortality. **Epidemiology**, Cambridge, RU, v.14, n.3, p.293-9, 2003.
- ERLANSON-ALBERTSSON, C.; YORK, D. Enterostatin – a peptide regulating fat intake. **Obes Res**, Silver Spring/MD, EUA, v.5, n.4, p.360-372, 1997.
- FIEGENBAUM, M.; HUTZ, M. H. Further evidence for the association between obesity-related traits and the apolipoprotein A-IV gene. **Int J Obes Relat Metab Disord**, Londres, RU, v.27, n.4, p.484-490, 2003
- FISHER, L.D.; VANBELLE, G. Biostatistics: a methodology for the health sciences. John Wiley – Interscience, Nova Iorque/NY, EUA, 1993, 991p.
- FLASO: Federación Latinoamericana de Sociedades de Obesidad - *Consenso Latino Americano Sobre Obesidade* - IV Congreso Latinoamericano de Obesidad Y Transtornos Alimentários - Montevideu (Uruguai), agosto, 1998, 8º Congresso Internacional Sobre Obesidade - Paris (França), setembro, 1998.
- FLEGAL, K. M.; CARROLL, M. D.; OGDEN, C. L.; JOHNSON, C. L. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2000. **JAMA**, Chicago/IL, EUA, v.288, n.14, p.1723-1727, 2002
- FREITAS, O.C.; CARVALHO, F.R.; NEVES, J.M.; VELUDO, P.K.; PARREIRA, R.S.; GONÇALVES, R.M.; LIMA, S.A.; BESTELLI, R.B. Prevalence of hypertension in the urban population of Catanduva, in the State of São Paulo, Brazil. **Arq Bras Cardiol**, São Paulo/SP, Brasil, v.77, n.1, p.16-21, 2001.
- FRIED, S.K.; RICCI, M.R.; RUSSELL, C.D.; LAFERRERE, B. Regulation of leptin production in humans. **J Nutr**, Bethesda/MD, EUA, v.130, suppl.12, p.3127S-3131S, 2000.
- FRIEDEWALD, W.T.; LEVY, R.I.; FREDRICKSON, D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use
-

- of the preparative ultracentrifuge. **Clin Chem**, Washington/DC, EUA, v.18, n.6, p.499-502, 1972.
- FUCHS, S.C.; PETTER, J.G.; ACCORDI, M.C.; ZEN, V.L.; PIZZOL-JR, A.D.; MOREIRA, L.B.; FUCHS, F.D. Establishing the prevalence of hypertension. Influence of sampling criteria. **Arq Bras Cardiol**, São Paulo/SP, Brasil, v.76, n.6, p.449-452, 2001.
- GDB, The Genome Database, Search/genomic segments/by/Name/GDB ID, <http://www.gdb.org/>, 2004.
- GENBANK, National Center for Biotechnology Information, Search/nucleotide/for/, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, 2004.
- GIGANTE, D. P.; BARROS, F. C.; POST, C. L.; OLINTO, M. T. Prevalence and risk factors of obesity in adults. **Rev Saude Publica**, São Paulo/SP, Brasil, v.31, n.3, p.236-246, 1997.
- GLUECK, C.J. Detection of risk factors for coronary artery disease in children: Semmelweis revisited? **Pediatrics**, Elk Grove Village/IL, EUA, v.66, n.6, p.834-837, 1980.
- GOLDEN, P.L.; MACCAGNAN, T.J.; PARDRIDGE, W.M. Human Blood-Brain Barrier Leptin Receptor. **J Clin Invest**, Ann Arbor/MI, EUA, v.99, n.1, p.14-18, 1997.
- GUNDLACH, A.L. Galanin/GALP and galanin receptors: role in central control of feeding, body weight/obesity and reproduction? **Eur J Pharmacol**, Amsterdã, Holanda, v.440, n.2/3, p.255-268, 2002.
- GUO, S.W.; THOMPSON, E.A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**, Washington/DC, EUA, v.48, n.2, p.361-72, 1992.
- GUS, M.; MOREIRA, L.B.; PIMENTEL, M.; GLEISNER, A.L.; MORAES, R.S.; FUCHS, F.D. Association of various measurements of obesity and the prevalence of hypertension. **Arq Bras Cardiol**, São Paulo/SP, Brasil, v.70, n.2, p.111-4, 1998.
-

- GUTZWILLER, J.P.; DREWE, J.; KETTERER, S.; HILDEBRAND, P.; KRAUTHEIM, A.; BEGLINGER, C. Interaction between CCK and a preload on reduction of food intake is mediated by CCK-A receptors in humans. **Am J Physiol Regularory Integr Comp Physiol**, Bethesda/MD, EUA, v.279, n.1, p.R189-R195, 2000.
- HABER, E.P.; XIMENES, H.M.; PROCÓPIO, J.; CARVALHO, C.R.; CURI, R.; CARPINELLI, A.R. Pleiotropic effects of fatty acids on pancreatic beta-cells. **J Cell Physiol**, Nova Iorque/NY, EUA, v.194, n.1, p.1-12, 2003.
- HAFFNER, S.; TAEGTMEYER, H. Epidemic obesity and the metabolic syndrome. **Circulation**, Filadélfia/PA, EUA, v.180, n.13, p.1541-5, 2003.
- HALL, J.E.; KUO, J.J.; SILVA, A.A.; PAULA, R.B.; LIU, J.; TALLAM, L. Obesity-associated hypertension and kidney disease. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, Filadélfia/PA, EUA, v.12, p.195-200, 2003.
- HAN, T. S.; VAN LEER, E. M.; SEIDELL, J. C.; LEAN, M. E. Waist circumference action levels in the identification of cardiovascular risk factors: prevalence study in a random sample. **Br Med J**, Londres, RU, v.311, n.7017, p.1401-1405, 1995
- HASKELL-LUEVANO, C.; MONCK, E.K. Agouti-related protein functions as an inverse agonist at a constitutively active brain melanocortin-4 receptor. **Regul Pept**, Amsterdã, Holanda, v.99, n.1, p.1-7, 2001.
- HESHKA, J.; JONES, P.J.H. A role for dietary fat in leptin receptor, OB-Rb, function. **Life Sci**, Oxford, RU, v.69, n.9, p.987-1003, 2001.
- HIXSON, J.E.; ALMASY, L.; COLE, S.; BIRNBAUM, S.; MITCHELL, B.D.; MAHANEY, M.C.; STERN, M.P.; MACCLUER, J.W.; BLANGERO, J.; COMUZZIE, A.G. Normal Variation in Leptin Levels Is Associated with Polymorphisms in the Proopiomelanocortin Gene, *POMC*. **J Clin Endocrinol Metab**, Bethesda/MD, EUA, v.84, n.9, p.3187-3191, 1999.
- HU, D.; HANNAH, J.; GRAY, R.S.; JABLONSKI, K.A.; HENDERSON, J.A.; ROBBINS, D.C.; LEE, E.T. WELTY, T.K.; HOWARD, B.V. Effects of obesity and body fat distribution on lipids and lipoproteins in nondiabetic
-

- American Indians: The Strong Heart Study. **Obes Res**, Silver Spring/MD, EUA, v.8, n.6, p.411-421, 2000.
- HUBERT, H.B.; FEINLEIB, M.; MCNAMARA, P.M.; CASTELLI, W.P. Obesity as na independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. **Circulation** Filadélfia/PA, EUA, v.67,n.5,p.968-977, 1983.
- INUI, A. Feeding and body-weight regulation by hypothalamic neuropeptides – mediation of the actions of leptin. **Trends Neurosci**, Oxford, RU, v.22, n.2, p.62-67, 1999a.
- INUI, A. Neuropeptide Y feeding receptors: are multiple subtypes involved? **Trends Pharmacol Sci**, Oxford, RU, v.20, n.2, p.43-46, 1999b.
- INUI, A. Transgenic approach to the study of body weight regulation. **Pharmacol Rev**, Bethesda/MD, EUA, v.52, n.1, p.35-61, 2000.
- IRIZARRY, K.; HU, G.; WONG, M.L.; LICINIO, J.; LEE, C.J. Single nucleotide polymorphism identification in candidate gene systems of obesity. **Pharmacogenomics J**, Hampshire, RU, v.1, n.3, p.193-203, 2001.
- ISMAIL, A.A.; GILL G.V. The epidemiology of type 2 diabetes and its current measurement. **Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, Bristol, RU, v.13, n.2, p.197-220, 2000.
- JAMES, P.T.; LEACH, R.; KALAMARA, E.; SHAYEGHI, M. The worldwide obesity epidemic. **Obes Res**, Silver Spring/MD, EUA, v.9, suppl 4, p.228S-233S, 2001.
- JANKOWSKA, E. A.; ROGUCKA, E.; MEDRAS, M.; WELON, Z. Relationships between age-related changes of sex steroids, obesity and body fat distribution among healthy Polish males. **Med Sci Monit**, Varsóvia, Polônia, v.6, n.6, p.1159-1164, 2000.
- KADOWAKI, T.; HARA, K.; YAMAUCHI, T.; TERAUCHI, Y.; TOBE, K.; NAGAI, R. Molecular mechanism of insulin resistance and obesity. **Exp Biol Med**, Nova Iorque/NY, EUA, v.228, n.10, p.1111-7, 2003.
-

- KAHN, H. S.; VALDEZ, R. Metabolic risks identified by the combination of enlarged waist and elevated triacylglycerol concentration. **Am J Clin Nutr**, Bethesda/MD, EUA, v.78, n.5, p.928-934, 2003.
- KAPLAN, L.M. Body weight regulation and obesity. **J Gastrointest Surg**, St. Louis/MO, EUA, v.7, n.4, p.443-51, 2003.
- KARVONEN, M. K.; PESONEN, U.; HEINONEN, P.; LAAKSO, M.; RISSANEN, A.; NAUKKARINEN, H.; VALVE, R.; UUSITUPA, M. I.; KOULU, M. Identification of new sequence variants in the leptin gene. **J Clin Endocrinol Metab**, Bethesda/MD, EUA, v.83, n.9, p.3239-3242, 1998.
- KASTIN, A.J.; PAN, W. Dynamic regulation of leptin entry into brain by blood-brain barrier. **Regul Pept**, Amsterdã, Holanda, v.92, n.1-3, p.37-43, 2000.
- KERN, P.A. Potential role of TNF α and lipoprotein lipase as candidate genes for obesity. **J Nutr**, Bethesda/MD, EUA, v.127, suppl.9, p.1917S-1922S, 1997.
- KLEIN, C.H.; SILVA, N.A.; NOGUEIRA, A.D.A.; BLOCH, K.V.; CAMPOS, L.H. Arterial hypertension in Ilha do Governador, Rio de Janeiro, Brazil: II. Prevalence. **Cad Saude Publica**, Rio de Janeiro/RJ, Brasil, v.11, n.3, p.389-394, 1995.
- KORTT, M.A.; LANGLEY, P.C.; COX, E.R. A review of cost-of-illness studies on obesity. **Clin Ther**, Princeton/ NJ, EUA, v.20, n.4, p.772-9, 1998.
- KRUDE, H.; GRÜTERS, A. Implications of proopiomelanocortin (POMC) mutations in humans: The POMC Deficiency Syndrome, **Trends Endocrinol Metab**, Nova Iorque/NY, EUA, v.11, n.1, p.15-22, 2000.
- KUHAR, M.J.; ADAMS, L.D.; HUNTER, R.G.; DALL VECHIA, S.; SMITH, Y. CART peptides. **Regul Pept**, Amsterdã, Holanda, v.89, n.1-3, p.1-6, 2000.
- LABIB, M. The investigation and management of obesity. **J Clin Pathol**, Londres, RU, v.56, n.1, p.17-25, 2003.
-

- LANGHANS, W.; HRUPKA, B. Interleukins and tumor necrosis factor as inhibitors of food intake. **Neuropeptides**, Kent, RU, v.33, n.5, p.415-424, 1999.
- LAVIN, J.H.; WITTERT, G.A.; ANDREWS, J.; YEAP, B.; WISHART, J.M.; MORRIS, H.A.; MORLEY, J.E.; HOROWITZ, M.; READ, N.W. Interaction of insulin, glucagon-like peptide 1, gastric inhibitory polypeptide, and appetite in response to intraduodenal carbohydrate. **Am J Clin Nutr**, Bethesda/MD, EUA, v.68, n.3, p.591-598, 1998.
- LAWRENCE, C.B.; TURNBULL, A.V.; ROTHWELL, N.J. Hypothalamic control of feeding. **Curr Opin Neurob**, Londres, RU, v.9, n.6, p.778-783, 1999.
- LE STUNFF, C.; LE BIHAN, C.; SCHORK, N.J.; BOUGNÈRES, P. A common promoter variant of the leptin gene is associated with changes in the relationship between serum leptin and fat mass in obese girls. **Diabetes**, Alexandria/VA, EUA, v.49, n.12, p.2196-2200, 2000.
- LEAN, M.E.J.; HAN, T.S.; MORRISON, C.E. Waist circumference as a measure for indicating need for weight management. **Br Med J**, Londres, RU, v.311, n.6998, p.158-161, 1995.
- LEINEWEBER, K.; BUSCHER, R.; BRUCK, H.; BRODDE, O.E. beta-Adrenoceptor polymorphisms. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, Berlim, Alemanha, v.369, n.1, p.1-22, 2004.
- LI, W. D.; REED, D. R.; LEE, J. H.; XU, W.; KILKER, R. L.; SODAM, B. R.; PRICE, R. A. Sequence variants in the 5' flanking region of the leptin gene are associated with obesity in women. **Ann Hum Genet**, Cambridge, RU, v.63, n.Pt 3, p.227-234, 1999.
- LIEVERSE, R.J.; JANSEN, J.B.; MASCLÉE, A.M.; LAMERS, C.B. Effects of somatostatina on human satiety. **Neuroendocrinology**, Basel, Suíça, v.61, n.2, p.112-116, 1995.
-

- LINS, A.P.M.; SICHIERI, R. Influência da menopausa no índice de massa corporal. **Arq Bras Endocrinol Metab**, São Paulo/ SP, Brasil, v.45, n.3, p.265-270, 2001.
- LOOS, R. J.; BOUCHARD, C. Obesity--is it a genetic disorder? **J Intern Med**, Oxford, RU, v.254, n.5, p.401-425, 2003.
- LOVEJOY, J. C. The menopause and obesity. **Prim Care**, Filadélfia/PA, EUA, v.30, n.2, p.317-325, 2003.
- LU, X. Y.; BARSH, G. S.; AKIL, H.; WATSON, S. J. Interaction between alpha-melanocyte-stimulating hormone and corticotropin-releasing hormone in the regulation of feeding and hypothalamo-pituitary-adrenal responses. **J Neurosci**, Baltimore/MD, EUA, v.23, n.21, p.7863-7872, 2003.
- LUBRANO-BERTHELIER, C.; CAVAZOS, M.; DUBERN, B.; SHAPIRO, A.; STUNFF, C.L.; ZHANG, S.; PICART, F.; GOVAERTS, C.; FROGUEL, P.; BOUGNERES, P.; CLEMENT, K.; VAISSE, C. Molecular genetics of human obesity-associated MC4R mutations. **Ann N Y Acad Sci**, Nova Iorque/NY, EUA, v.997, n.49-57, 2003.
- MACLEAN, P.S.; BOWER, J.F.; VADLAMUDI, S.; GREEN, T.; BARAKAT, H.A. Lipoprotein subpopulation distributions in lean, obese, and type 2 diabetic women: a comparison of African and White Americans. **Obes Res**, Silver Spring/MD, EUA, v.8, n.1, p.62-70, 2000.
- MAES, H.H.; NEALE, M.C.; EAVES, L.J. Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity. **Behav Genet**, Nova Iorque/NY, EUA, v.27, n.4, p.325-51, 1997.
- MAFFEI, M.; STOFFEL, M.; BARONE, M.; MOON, B.; DAMMERMAN, M.; RAVUSSIN, E.; BOGARDUS, C.; LUDWIG, D.S.; FLIER, J.S.; TALLEY, M.; AUERBACH, S.; FRIEDMAN, J.M. Absence of Mutation in the Human *OB* Gene in Obese/Diabetic Subjects. **Diabetes**, Alexandria/VA, EUA, v.45, n.5, p.679-682, 1996.
-

- MAMMÈS, O.; BETOULLE, D.; AUBERT, R.; GIRAUD, V.; TUZET, S.; PETIET, A.; COLAS-LINHART, N.; FUMERON, F. Novel polymorphisms in the 5' region of the LEP gene: association with leptin levels and response to low-calorie diet in human obesity. **Diabetes**, Alexandria/VA, EUA, v.47, n.3, p.487-9, 1998.
- MAMMÈS, O.; BETOULLE, D.; AUBERT, R.; HERBETH, B.; SIEST, G.; FUMERON, F. Association of the G-2548A polymorphism in the 5' region of the *LEP* gene with overweight. **Ann Hum Genet**, Cambridge, RU, v.64, n.Pt5, p.391-394, 2000.
- MARINS, V.M.R.; ALMEIDA, R.M.R.V.; PEREIRA, R.A.; BARROS, M.B.A. Factors associated with overweight and central body fat in the city of Rio de Janeiro: results of a two-stage random sampling survey. **Public Health**, Londres, RU, v.115, n.3, p.236-242, 2001.
- MARTINEZ, T.L.; SANTOS, R.D.; ARMAGANIJAN, D.; TORRES, K.P.; LOURES-VALE, A.; MAGALHAES, M.E.; LIMA, J.C.; MORIGUCHI, E.; AMODEO, C.; ORTIZ, J. National alert campaign about increased cholesterol: determination of cholesterol levels in 81,262 Brazilians. **Arq Bras Cardiol**, São Paulo/SP, Brasil, v.80, n.6, p.635-8, 631-4, 2003.
- MATOS, A.C.; LADEIA, A.M. Assessment of cardiovascular risk factors in a rural community in the Brazilian state of Bahia. **Arq Bras Cardiol**, São Paulo/SP, Brasil, v.83, n.3, p.291-302, 2003.
- MATSUZAWA, Y.; SHIMOMURA, I.; KIHARA, S.; FUNAHASHI, T. Importance of adipocytokines in obesity-related diseases. **Horm Res**, Basel, Suíça, v.60, suppl.3, p.56-9, 2003.
- MATTEVI, V.S.; COIMBRA JR.; C.F.A.; SANTOS, R.V.; SALZANO, F.M.; HUTZ, M.H. Association of the low-density lipoprotein receptor gene with obesity in Native American populations. **Hum Genet**, Berlin, Alemanha, v.106, n.5, p.546-552, 2000.
-

- MATTEVI, V.S.; ZEMBRZUSKI, V.M.; HUTZ, M.H. Association analysis of genes involved in the leptin-signaling pathway with obesity in Brazil. **Int J Obes Relat Metab Disord**, Londres, RU, v.26, n. 9, p.1179-85, 2002.
- MATTHEWS, K. A.; ABRAMS, B.; CRAWFORD, S.; MILES, T.; NEER, R.; POWELL, L. H.; WESLEY, D. Body mass index in mid-life women: relative influence of menopause, hormone use, and ethnicity. **Int J Obes Relat Metab Disord**, Londres, RU, v.25, n.6, p.863-873, 2001
- MCGARVEY, S.T.; FORREST, W.; WEEKS, D.E.; SUN, G.; SMELSER, D.; TUFA, J.; VIALI, S.; DEKA, R. Human leptin locus (LEP) alleles and BMI in Samoans. **Int J Obes Relat Metab Disord**, Londres, RU, v.26, n.6, p.783-8, 2002.
- MENZAGHI, C.; ERCOLINO, T.; DI PAOLA, R.; BERG, A. H.; WARRAM, J. H.; SCHERER, P. E.; TRISCHITTA, V.; DORIA, A. A haplotype at the adiponectin locus is associated with obesity and other features of the insulin resistance syndrome. **Diabetes**, Alexandria/VA, EUA, v.51, n.7, p.2306-2312, 2002.
- MOFFETT, S.; MARTINSON, J.; SHRIVER, M. D.; DEKA, R.; MCGARVEY, S. T.; BARRANTES, R.; FERRELL, R. E. Genetic diversity and evolution of the human leptin locus tetranucleotide repeat. **Hum Genet**, Basel, Suíça, v.110, n.5, p.412-417, 2002.
- MOKDAD, A.H.; BOWMAN, B.A.; FORD, E.S.; VINICOR, F.; MARKS, J.S.; KOPLAN, J.P. The continuing epidemics of obesity and diabetes in the United States. **JAMA**, Chicago/IL, EUA, v.286, n.10, p.1195-200, 2001.
- MOLARIUS, A.; SEIDELL, J.C.; SANS, S.; TUOMILEHTO, J.; KUULASMAA, K. Varying sensitivity of waist action levels to identify subjects with overweight or obesity in 19 population of the WHO MONICA Project. **J Clin Epidemiol**, Oxford, RU, v.52, n.12, p.1213-1224, 1999.
- MONTEIRO, J.C. Obesidade: diagnóstico, métodos e fundamentos. In:HALPERN, A.; MATOS, A.F.G.; SUPLICY, H.L.; MANCINI, M.C.;
-

- ZANELLA, M.T. **Obesidade**. São Paulo/SP, Brasil: Lemos Editorial, 1998a, p.31-54.
- MONTEIRO, C.A. Epidemiologia da obesidade. In:HALPERN, A.; MATOS, A.F.G.; SUPLICY, H.L.; MANCINI, M.C.; ZANELLA, M.T. **Obesidade**. São Paulo/SP, Brasil: Lemos Editorial, 1998b, p.15-30.
- MÜLLER, G, ERTL, J, GERL, M.; PREIBISCH, G Leptin impairs metabolic actions of insulin in isolated rat adipocytes. **J Biol Chem**, Bethesda/MD, EUA, v.272, n.16, p.10585-10593, 1997.
- MUST, A.; SPADANO, J.; COAKLEY, E. H.; FIELD, A. E.; COLDITZ, G.; DIETZ, W. H. The disease burden associated with overweight and obesity. **JAMA**, Chicago/IL, EUA, v.282, n.16, p.1523-1529, 1999.
- NAO: National Audit Office – International Health Comparisons. Londres/RU, 2001, 50p.
- NAUCK, M. A.; MEIER, J. J.; WOLFERSDORFF, A. V.; TILLIL, H.; CREUTZFELDT. W.; KOBBERLING, J. A 25-year follow-up study of glucose tolerance in first-degree relatives of type 2 diabetic patients: association of impaired or diabetic glucose tolerance with other components of the metabolic syndrome. **Acta Diabetol**, Berlim, Alemanha, v.40, n.4. p.163-172, 2003.
- NESTO, R. W. The relation of insulin resistance syndromes to risk of cardiovascular disease. **Rev Cardiovasc Med**, Mercer Island/WA, EUA. v.4, Supl.6, p.S11-S18, 2003.
- NHLBI: National Heart, Lung and Blood Institute - Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation and Treatment of Overweight and Obesity in Adults, 2000, 80p
- NIKI, T.; MORI, H.; TAMORI, Y.; KISHIMOTO-HASHIRAMOTO, M.; UENO, H.; ARAKI, S.; MASUGI, J.; SAWANT, N.; MAJITHIA, H.R.; RAIS, N.; HASHIRAMOTO, M.; TANIGUCHI, H.; KASUGA, M. Human obese gene: molecular screening in Japanese and Asian Indian NIDDM patients
-

- associated with obesity. **Diabetes**, Alexandria/VA, EUA, v.45, n.5, p.675-678, 1996.
- NONOGAKI, K. New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism. **Diabetologia**, Berlin, Alemanha, v.43, n.5, p.533-49, 2000.
- OBESITY: Obesity Gene Map Database, ENTER, Table 6: Evidence for the presence of an association between markers of candidate genes with BMI, body fat, and other obesity-related phenotypes, <http://obesitygene.pbrc.edu>, 2004.
- ÖHMAN, M.; OKSANEN, L.; KAINULAINEN, K.; JÄNNE, O.A.; KAPRIO, J.; KOSKENVUO, M.; MUSTAJOKI, P.; KONTULA, K.; PELTONEN, L. Testing of human homologues of murine obesity genes as candidate regions in Finnish obese sib pairs. **Eur J Hum Genet**, Basel, Suíça, v.7, n.2, p.117-124, 1999.
- OHSHIRO, Y.; UEDA, K.; NISHI, M.; ISHIGAME, M.; WAKASAKI, H.; KAWASHIMA, H.; FURUTA, H.; SASAKI, H.; SANKE, T.; TAKASU, N.; NANJO, K. A polymorphic marker in the leptin gene associated with Japanese morbid obesity. **J Mol Med**, Berlin, Alemanha, v.78, n.9, p.516-520, 2000.
- OKSANEN, L.; KAPRIO, J.; MUSTAJOKI, P.; KONTULA, K. A common pentanucleotide polymorphism of the 3'-untranslated part of the leptin receptor gene generates a putative stem-loop motif in the mRNA and is associated with serum insulin levels in obese individuals. **Int J Obes Relat Metab Disord**, Londres, RU, v.22, n.7, p.634-40, 1998.
- OKSANEN, L.; ÖHMAN, M.; HEIMAN, M.; KAINULAINEN, K.; KAPRIO, J.; MUSTAJOKI, P.; KOIVISTO, V.; KOSKENVUO, M.; JANNE, O.A.; PELTONEN, L.; KONTULA, K. Markers for the gene ob and serum leptin levels in human morbid obesity. **Hum Genet**, Basel, Suíça, v.99, n.5, p.559-64, 1997.
- ONIONS, K.L.; HUNT, S.C.; RUTKOWSKI, M.P.; KLANKE, C.A.; SU, Y.R.; REIF, M.; MENON, A.G. Genetic markers at the leptin (*OB*) loci are not
-

- significantly linked to hypertension in African Americans. **Hypertension**, Dallas/TX, EUA, v.31, n.6, p.1230-1234, 1998.
- PEDRAZZINI, T.; PRALONG, F.; GROUZMANN, E. Neuropeptide Y: the universal soldier. **Cell Mol Life Sci**, Boston/MA, EUA, v.60, n.2, p.350-77, 2003.
- PERACCHI, M.; CAROLA, F.; CAVAGNINI, F.; BENTI, R.; BAREGGI, B.; BACCALARO, G.; BASILLISCO, G. Plasma somatostatin-like immunoreactivity and somatostatin-28 levels in obese men. **J Endocrinol Invest**, Milão, Itália, v.21, n.1, p.20-23, 1998.
- PIEGAS, L.S.; AVEZUM, A.; PEREIRA, J.C.; NETO, J.M.; HOEPFNER, C.; FARRAN, J.A.; RAMOS, R.F.; TIMERMAN, A.; ESTEVES, J.P.; AFIRMAR Study Investigators. Risk factors for myocardial infarction in Brazil. **Am Heart J**, St. Louis/MO, EUA, v.146, n.2, p.331-8, 2003.
- PORRO, M.; VITI, S.; ANTONI, G.; SALETTI, M. Ultrasensitive silver-stain method for the detection of proteins in polyacrilamide gels and immunoprecipitates on agarose gels. **Anal Biochem**, Orlando/FL, v.127, n.2, p.316-321, 1982.
- PRITCHARD, L.E.; TURNBULL, A.V.; WHITE, A. Pro-opiomelanocortin processing in the hypothalamus: impact on melanocortin signalling and obesity. **J Endocrinol**, Bristol, RU, v.172, n.3, p.411-421, 2002.
- RACETTE, S.B.; DEUSINGER, S.S.; DEUSINGER, R.H. Obesity: overview of prevalence, etiology, and treatment. **Phys Ther**, Alexandria/VA, EUA, v.83, n.3, p.276-88, 2003.
- RAFFIN-SANSON, M.L.; DE KEYZER, Y.; BERTAGNA, X. Proopiomelanocortin, a polypeptide precursor with multiple functions: from physiology to pathological conditions. **Eur J Endocrinol**, Bristol, RU, v.149, n.2, p.79-90, 2003.
- RAHMOUNI, K.; HAYNES, W.G. Leptin signaling pathways in the central nervous system: interactions between neuropeptide Y and melanocortins. **Bioessays**, Cambridge, RU, v.23, n.12, p.1095-9, 2001.
-

- RANKINEN, T.; PERUSSE, L.; WEISNAGEL, S. J.; SNYDER, E. E.; CHAGNON, Y. C.; BOUCHARD, C. The human obesity gene map: the 2001 update. **Obes Res**, Silver Spring/MD, EUA, v.10, n.3, p.196-243, 2002.
- REPETTO, G. Histórico da obesidade In:HALPERN, A.; MATOS, A.F.G.; SUPPLY, H.L.; MANCINI, M.C.; ZANELLA, M.T. **Obesidade**. São Paulo/SP, Brasil: Lemos Editorial, 1998, p.3-14.
- RIFAI, N.; KING, M.E. Immunturbidimetric assays of apolipoproteins A, AI, AII, and B in serum. **Clin Chem**, Washington/DC, EUA, v.32, n.6, p.957-961, 1986.
- ROCCHINI, A.P. Obesity hypertension. **Am J Hypertens**, Nova Iorque/NY, EUA, v.15, suppl.2Pt2, p.50S-52S, 2002.
- ROESCHLAU, P.; BERNT, E.; GRUBER, W. Enzymatic determination of total cholesterol in serum. **Z Klin Chem Klin Biochem**, Berlin, Alemanha, v.12, n.5, p.226, 1974.
- ROGERS, E. J.; SHONE, A. C.; ALONSO, S.; MAY, C. A.; ARMOUR, J. A. Integrated analysis of sequence evolution and population history using hypervariable compound haplotypes. **Hum Mol Genet**, Oxford, RU, v.9, n.18, p.2675-2681, 2000.
- RÖNNEMAA, T.; MARNIEMI, J.; SAVOLAINEN, M.J.; KESÄNIEMI, Y.A.; EHNHOLM, C.; BOUCHARD, C.; KOSKENVUO, M. Serum lipids, lipoproteins, and lipid metabolizing enzymes in identical twins discordant for obesity. **J Clin Endocrinol Metab**, Bethesda/MD, EUA, v.83, n.8, p.2792-2799, 1998.
- ROTIMI, C.N.; COMUZZIE, A.G.; LOWE, W.L.; LUKE, A.; BLANGERO, J.; COOPER, R.S. The quantitative trait locus on chromosome 2 for serum leptin levels is confirmed in African-Americans. **Diabetes**, Alexandria/VA, EUA, v.48, n.3, p.643-644, 1999.
-

- SABRY, M.O.D.; SAMPAIO, H.A.C.; SILVA, M.G.C. Hipertensão e obesidade em um grupo populacional no nordeste do Brasil. **Ver Nutr**, Campinas/SP, Brasil, v.15, n.2, p.139-147, 2002.
- SAITO, Y.; NOTHACKER, H.P.; CIVELLI, O. Melanin-concentrating hormone receptor: an orphan receptor fits the key. **Trends Endocrinol Metab**, Nova Iorque/NY, EUA, v.11, n.8, p.299-303, 2000.
- SAKURAI, Y. Duration of obesity and risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Biomed Pharmacother**, Cedex, França, v.54, n.2, p.80-84, 2000.
- SALAZAR, L.A.; HIRATA, M.H.; CAVALLI, S.A.; MACHADO, M.O.; HIRATA, R.D.C. Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. **Clin Chem** Washington/DC, EUA, v.44,n.8,p.1748-1750, 1998.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. Protocol 1. Isolation of high-molecular weight DNA from mammalian cells using Proteinase K and Phenol. *in* **Molecular cloning: A laboratory manual**. 3rd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, 2001a, cap.6,p.6.4-6.11.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. Protocol 9. Neutral Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *in* **Molecular cloning: A laboratory manual**. 3rd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, 2001b, cap.5, p.5.40-5.46.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. Protocol 1. Agarose Gel Electrophoresis. *in* **Molecular cloning: A laboratory manual**. 3rd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, 2001c, cap.5, p.5.4-5.13.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. Protocol 2. Detection of DNA in Agarose Gels. *in* **Molecular cloning: A laboratory manual**. 3rd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, 2001d, cap.5, p.5.14-5.17.
- SATOH, N.; OGAWA, Y.; KATSUURA, G.; NUMATA, Y.; MASUZAKI, H.; YOSHIMASA, Y.; NAKAO, K. Satiety effect and sympathetic activation of
-

- leptin are mediated by hypothalamic melanocortin system. **Neurosci Lett**, Limerick, Irlanda, v.249, n.2-3, p.107-110, 1998.
- SCHNEIDER, S.; ROESLI, D.; EXCOFFIER, L. ARLEQUIN Ver.2000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Genebra, Suíça, 2000.
- SCHOENBORN, C. A.; ADAMS, P. F.; BARNES, P. M. Body weight status of adults: United States, 1997-98. **Adv Data**, Rockville/MD, EUA, v.6, n.330, p.1-15, 2002.
- SCHWARTZ, M.W.; BASKIN, D.G.; BUKOWSKI, T.R.; KUIJPER, J.L.; FOSTER, D.; LASSER, G.; PRUNKARD, D.E.; PORTE, D.Jr.; WOODS, S.C.; SEELEY, R.J.; WEIGLE, D.S. Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice. **Diabetes**, Alexandria/VA, EUA, v.45, n.4, p.531-5, 1996.
- SHINTANI, M.; IKEGAMI, H.; YAMATO, E.; KAWAGUCHI, Y.; FUJISAWA, T.; NAKAGAWA, Y.; HAMADA, Y.; UEDA, H.; MIKI, T.; OGIHARA, T. A novel microsatellite polymorphism in the human *OB* gene: a highly polymorphic marker for linkage analysis. **Diabetologia**, Berlin, Alemanha, v.39, n.11, p.1398-1401, 1996.
- SHINTANI, M.; IKEGAMI, H.; FUJISAWA, T.; KAWAGUCHI, Y.; OHISHI, M.; KATSUYA, T.; HIGAKI, J.; SHIMAMOTO, K.; OGIHARA, T. Leptin gene polymorphism is associated with hypertension independent of obesity. **J Clin Endocrinol Metab**, Bethesda/MD, EUA, v.87, n.6, p.2909-2912, 2002.
- SIERVOGEL, R.M.; WISEMANDLE, W.; MAYNARD, L.M.; GUO, S.S.; CHUMLEA, W.M.C.; TOWNE, B. Lifetime overweight status in relation to serial changes in body composition and risk factors for cardiovascular disease: The Fels Longitudinal Study. **Obes Res**, Silver Spring/MD, EUA, v.8, n.6, p.422-430, 2000.
- SOUZA, L.J.; FILHO, J.T.S.; SOUZA, T.F.; REIS, A.F.; NETO, C.G.; BASTOS, D.A.; CORTES, V.A.; CHALITA, F.E.; TEIXEIRA, C.L.
-

- Prevalence of dyslipidemia and risk factors in Campos dos Goytacazes, in the Brazilian state of Rio de Janeiro. **Arq Bras Cardiol**, São Paulo/SP, Brasil, v.81, n.3m p.249-64, 2003.
- SOWERS, J.R. Obesity as a cardiovascular risk factor. **Am J Med**, Nova Iorque/NY, EUA, v.115, suppl. 8A, p.37S-41S, 2003.
- STUBBS, R.J. Peripheral signals affecting food intake. **Nutrition**, Oxford, RU, v.15, n.7-8, p.614-625, 1999.
- STUNKARD, A.J.; SORENSEN, T.I.A.; HANIS, G.; TEASDALE, T.W.; CHAKRABORTY, R.; SCHULL, W.J.; SCHULSINGER, F. An adoption study of human obesity. **N Engl J Med**, Waltham/MA, EUA, v.314, n.1, p.193-198, 1986a.
- STUNKARD, A.J.; FOCH, T.T.; HRUBEK, Z. A twin study of human obesity. **Am J Med**, Nova Iorque/NY, EUA, v.256, n.1, p.51-54, 1986b.
- SUGIUCHI, H.; UJI, Y.; OKABE, H.; IRIE, T.; UEKAMA, K.; KAYAHARA, N.; MIYAUCHI, K. Direct Measurement of High-Density Lipoprotein Cholesterol in Serum with Polyethylene Glycol-Modified Enzymes and Sulfated/Cyclo-dextrin. **Clin Chem**, Washington/DC, EUA, v.41, n.5, p.717-723, 1995.
- SUVIOLAHTI, E.; OKSANEN, L. J.; OHMAN, M.; CANTOR, R. M.; RIDDERSTRALE, M.; TUOMI, T.; KAPRIO, J.; RISSANEN, A.; MUSTAJOKI, P.; JOUSILAHTI, P.; VARTIAINEN, E.; SILANDER, K.; KILPIKARI, R.; SALOMAA, V.; GROOP, L.; KONTULA, K.; PELTONEN, L.; PAJUKANTA, P. The SLC6A14 gene shows evidence of association with obesity. **J Clin Invest**, Ann Arbor/MI, EUA, v.112, n.11, p.1762-1772, 2003.
- TARTAGLIA, L.A.; DEMBSKI, M.; WENG, X.; DENG, N.; CULPEPPER, J.; DEVOS, R.; RICHARDS, G.J.; CAMPFIELD, L.A.; CLARK, F.T.; DEEDS, J.S.; MUIR, C.; SANKER, S.; MORIARTY, A.; MOORE, K.J.; SMUTKO, J.S.; MAYS, G.G.; WOOLF, E.A.; SELENT-MUNRO, C.; TEPPER, R.I.
-

- Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. **Cell**, Cambridge, RU, v.83, n.7, p.1263-1271, 1995.
- TAYLOR, J.G.; CHOI, E-W, FOSTER, C.B.; CHANOCK, S.J. Using genetic variation to study human disease. **Trends Mol Med**, Heywards Heath, RU, v.7, n.11, p.507-512, 2001.
- THOMPSON, D.; WOLF, A. M. The medical-care cost burden of obesity. **Obes Rev**, Oxford, RU, v.2, n.3, p.189-197, 2001.
- THOMPSON, D.B.; RAVUSSIN, E.; BENNETT, P.H.; BORGADUS, C. Structure and sequence variation at the human leptin receptor in lean and obese Pima Indians. **Hum Mol Genet**, Oxford, RU, v.6, n.5, p.675-679, 1997.
- THOMSON, G. Significance levels in genome scans. **Adv Genet**, Orlando/FL, EUA, v.42, p.475-487, 2001.
- THOROGOOD, M.; APPLEBY, P.N.; KEY, T.J.; MANN, J. Relation between body mass index and mortality in an unusually slim cohort. **J Epidemiol Community Health**, Londres, RU, v.57, n.2, p.130-3, 2003.
- TREMBLAY, A.; DOUCET, E. Obesity: a disease or a biological adaptation? **Obes Rev**, Oxford, RU, v.1, n.1, p.27-35, 2000.
- TRINDER, P. Determination of Glucose in Blood using Glucose Oxidase with an alternative oxygen acceptor. **Ann Clin Biochem**, Londres, RU, v.6, n.2, p.24-27, 1969.
- UNGER, R.H Leptin physiology: a second look. **Regul Pept**, Amsterdã, Holanda, v.92, n.1-3, p.87-95, 2000.
- VAN DIJK, G.; THIELE, T.E. Glucagon-like peptide-1 (7-36) amide: a central regulator of satiety and interoceptive stress. **Neuropeptides**, Kent, RU, v.33, n.5, p.406-414, 1999.
- VAN ROSSUM, C.T.; HOEBEE, B.; VAN BAAK, M.A.; MARS, M.; SARIS, W.H.; SEIDELL, J.C. Genetic variation in the leptin receptor gene, leptin,
-

- and weight gain in young Dutch adults. **Obes Res**, Silver Spring/MD, EUA, v.11, n.3, p.377-86, 2003.
- VILLARES, S.M.F. Obesidade e genética In:HALPERN, A.; MATOS, A.F.G.; SUPLICY, H.L.; MANCINI, M.C.; ZANELLA, M.T. **Obesidade**. São Paulo/SP, Brasil: Lemos Editorial, 1998, p.67-80.
- WAHLEFELD, A.W.; BERGMAYER, H.U. (eds.) Methods of Enzymatic Analysis. 2nd English ed. New York, NY: Academic Press Inc, 1974, p1831.
- WAJCHENBERG, B.L. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome **Endocr Rev**, São Paulo/SP, Brasil, v.21, n.6, p.697-738, 2000.
- WALDER, K.; RAVUSSIN, E. Balanço energético In:HALPERN, A.; MATOS, A.F.G.; SUPLICY, H.L.; MANCINI, M.C.; ZANELLA, M.T. **Obesidade**. São Paulo/SP, Brasil: Lemos Editorial, 1998, p.81-102.
- WHO: World Health Organization – Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. Technical reports series: 894. World Health Organization, Singapore, 2000.
- WILSON, P.W.; D'AGOSTINO, R.B.; SULLIVAN, L.; PARISE, H.; KANNEL, W.B. Overweight and obesity as determinants of cardiovascular risk: the Framingham experience. **Arch Intern Med**, Chicago/IL, EUA, v.162, n.16, p.1867-72, 2002.
- WITHERSPOON, L.R.; EL SHAMI, A.S.; SHULER, S.E.; NEELY, H.; SONNEMAKER, R.; GILBERT, S.S.; ALYEA, K. Chemically blocked analog assays for free thyronines. I. The effect of chemical blockers on T4 analog and T4 binding by albumin and by thyroxin-binding globulin. **Clin Chem**, Washington/DC, EUA, v.34, n.1, p.9-16, 1988.
- YAMADA, K, WADA, E, SANTO-YAMADA, Y, WADA, K Bombesin and its family of peptides: prospects for the treatment of obesity. **Eur J Pharmacol**, Amsterdã, Holanda, v.440, n.2-3, p.281-290, 2002.
-

- YIANNAKOURIS, N.; YANNAKOULIA, M.; MELISTAS, L.; CHAN, J.L.; KLIMIS-ZACAS, D.; MANTZOROS, C.S. The Q223R polymorphism of the leptin receptor gene is significantly associated with obesity and predicts a small percentage of body weight and body composition variability. **J Clin Endocrinol Metab**, Bethesda/MD, EUA, v.86, n.9, p.4434-4439, 2001.
- YUAN, X, YAMADA, K, ISHIAMA-SHIGEMOTO, S, KOYAMA, W, NONAKA, K Identification of polymorphic loci in the promoter region of the serotonin 5-HT_{2C} receptor gene and their association with obesity and Type II diabetes. **Diabetologia**, Berlin, Alemanha, v.43, n.3, p.373-376, 2000.
- ZHANG, C.F.; SNELL, C.R.; LOH, Y.P. Identification of a novel prohormone sorting signal-binding site on carboxypeptidase E, a regulated secretory pathway-sorting receptor. **Mol Endocrinol**, Bethesda/MD, EUA, v.13, n.4, p.527-536, 1999.
- ZIMMET, P.; BOYKO, E.J.; COLLIER, G.R.; DE COURTEN, M. Etiology of the metabolic syndrome: potential role of insulin resistance, leptin resistance, and other players. **Ann N Y Acad Sci**, Nova Iorque/NY, EUA, v.892, p.25-44, 1999.
-

ANEXO I. Dados biodemográficos, bioquímicos e clínicos dos indivíduos.

ID	Idade	Sexo	Tab.	Meno.	IMC	CA	RCQ	HAS	DM	DCV	Glic.	TG	CT	HDL-C	LDL-C	VLDL-C	APO AI	APO B
C002	65	M	S	-	25,2	85	0,84	N	N	N	109	202	250	47	163	40	136	149
C003	66	M	S	-	24,8	80	0,88	N	N	N	88	123	203	39	139	25	109	112
C004	66	F	N	S	27,9	109	0,99	N	N	N	109	112	251	58	171	22	141	141
C006	63	F	N	S	25,5	99	0,98	N	N	N	109	51	240	105	125	10	205	111
C007	72	F	S	S	23,8	87	0,84	N	N	N	97	114	257	86	148	23	189	117
C011	37	M	S	-	29,0	99	0,94	N	N	N	97	166	177	47	97	33	137	99
C012	32	M	N	-	27,9	99	0,93	N	N	N	87	262	142	39	51	52	111	76
C014	36	M	N	-	28,0	99	0,89	N	N	N	95	84	140	45	78	17	124	75
C015	27	F	S	N	18,6	67	0,74	N	N	N	88	124	186	58	103	25	228	96
C016	21	F	N	N	18,7	67	0,76	N	N	N	91	89	155	60	77	18	153	71
C017	24	F	N	N	20,0	68	0,75	N	N	N	93	98	192	69	103	20	187	102
C019	44	M	N	-	25,6	94	0,93	N	N	N	91	221	204	40	120	44	123	115
C020	20	F	S	N	23,8	86	0,89	N	N	N	87	39	213	80	125	8	165	85
C021	26	M	N	-	29,2	105	0,88	N	N	N	94	102	195	47	128	20	127	98
C023	23	M	N	-	24,1	81	0,82	N	N	N	98	64	186	44	129	13	119	103
C025	20	M	S	-	24,2	90	0,86	N	N	N	84	258	193	37	104	52	111	108
C026	30	F	N	N	20,6	68	0,76	N	N	N	99	160	222	91	99	32	219	98
D004	60	F	N	S	41,3	113	0,94	S	S	N	157	240	213	68	97	48	177	103
D005	65	F	N	S	32,9	106	0,96	S	S	S	99	267	195	39	103	53	119	123
D014	62	M	S	-	30,8	105	0,98	S	N	S	109	121	201	50	127	24	122	123
D017	56	F	N	S	37,5	105	0,96	S	N	N	93	102	163	43	100	20	103	80

ID, identificação; **Tab.**, tabagismo; **Meno.**, menopausa; **IMC**, índice de massa corporal; **CA**, circunferência abdominal; **RCQ**, relação cintura-quadril; **HAS**, hipertensão; **DM**, diabetes tipo 2; **DCV**, doença cardiovascular; **Glic.**, glicose; **TG**, triglicerídeos; **CT**, colesterol total; **HDL-C**, colesterol do HDL; **LDL-C**, colesterol do LDL; **VLDL-C**, colesterol do VLDL; **APO AI**, apolipoproteína AI; **APO B**, apolipoproteína B.

ANEXO I. Dados biodemográficos, bioquímicos e clínicos dos indivíduos (continuação).

ID	Idade	Sexo	Tab.	Meno.	IMC	CA	RCQ	HAS	DM	DCV	Glic.	TG	CT	HDL-C	LDL-C	VLDL-C	APO AI	APO B
D020	66	F	N	S	32,9	105	0,95	S	N	N	124	332	281	54	181	66	143	125
D021	76	F	N	S	37,2	107	0,87	S	S	N	103	145	237	59	149	29	150	145
D025	52	F	N	S	32,7	98	0,87	S	N	N	111	257	209	42	110	51	114	104
D026	38	F	S	N	38,7	112	0,93	S	N	N	111	127	170	51	94	25	122	91
D029	71	F	N	S	38,9	106	0,89	S	N	N	113	205	204	56	107	41	144	96
D032	63	M	S	-	35,5	120	1,01	S	N	N	98	132	215	40	149	26	110	103
D033	48	M	S	-	31,1	104	0,95	S	N	N	105	152	198	40	128	30	104	113
D035	69	F	S	S	39,6	109	0,93	S	N	N	94	128	172	63	83	26	136	77
D036	42	F	S	S	34,0	100	0,87	N	N	N	103	196	226	50	137	39	121	112
D037	48	F	N	S	48,5	124	0,84	S	N	N	108	183	317	97	183	37	221	139
D039	60	F	S	S	26,6	90	0,86	N	N	S	108	195	191	40	112	39	120	97
D040	64	M	S	-	33,5	122	1,10	S	N	S	109	129	203	38	139	26	109	119
D041	56	F	S	S	42,0	117	0,94	S	N	N	98	257	313	43	219	51	116	161
D042	33	F	N	S	35,9	100	0,86	N	N	N	96	102	256	82	154	20	161	122
D043	66	F	N	S	27,1	96	0,91	S	N	N	115	93	224	70	135	19	155	107
D044	50	F	S	S	42,1	116	0,92	S	S	N	176	172	204	54	116	34	137	100
D045	48	F	S	N	31,0	92	0,88	S	N	N	122	260	156	42	62	52	142	92
D050	40	F	S	N	34,1	102	0,99	S	N	N	93	225	248	43	160	45	114	152
D051	51	F	N	S	34,0	105	0,91	S	N	N	123	92	235	70	147	18	156	115
D054	61	M	S	-	36,8	123	1,00	N	N	N	113	153	242	45	166	31	126	148
D057	83	F	S	S	27,6	102	0,93	N	N	N	109	182	205	57	112	36	129	98
D058	52	F	S	S	37,2	114	0,93	S	N	S	109	125	249	42	182	25	108	153
D059	50	F	S	N	31,6	100	0,86	N	N	N	90	80	192	72	104	16	148	95

ID, identificação; Tab., tabagismo; Meno., menopausa; IMC, índice de massa corporal; CA, circunferência abdominal; RCQ, relação cintura-quadril; HAS, hipertensão; DM, diabetes tipo 2; DCV, doença cardiovascular; Glic., glicose; TG, triglicerídeos; CT, colesterol total; HDL-C, colesterol do HDL; LDL-C, colesterol do LDL; VLDL-C, colesterol do VLDL; APO AI, apolipoproteína AI; APO B, apolipoproteína B.

ANEXO I. Dados biodemográficos, bioquímicos e clínicos dos indivíduos (continuação).

ID	Idade	Sexo	Tab.	Meno.	IMC	CA	RCQ	HAS	DM	DCV	Glic.	TG	CT	HDL-C	LDL-C	VLDL-C	APO AI	APO B
D061	59	F	N	S	33,3	102	0,94	S	N	N	113	167	292	67	192	33	158	159
D063	47	F	S	N	36,1	113	0,90	S	N	N	105	215	202	49	110	43	128	107
D065	78	F	N	S	30,2	102	0,93	S	N	S	113	239	273	71	154	48	172	147
D067	56	F	N	S	31,6	102	0,86	S	N	N	114	153	252	47	174	31	119	135
D068	66	F	N	S	30,2	94	0,90	S	N	N	95	203	221	42	138	41	129	122
D069	54	M	N	-	29,8	106	1,03	S	N	N	117	128	193	51	116	26	125	114
D073	46	M	S	-	34,9	108	0,99	S	N	N	98	179	192	37	119	36	102	105
D074	41	F	N	N	46,6	128	0,90	S	S	S	223	241	275	53	174	48	133	154
D077	66	F	N	S	31,1	96	0,88	S	N	N	104	192	269	36	195	38	108	143
D078	64	F	N	S	29,6	104	0,88	S	N	N	75	176	319	107	177	35	222	145
D079	71	M	N	-	41,3	-	-	S	S	N	185	196	195	53	103	39	142	108
D080	64	F	N	S	37,9	108	0,84	S	N	N	102	110	212	55	135	22	140	100
D082	76	F	S	S	42,8	116	0,87	S	N	N	97	204	267	56	170	41	153	154
D083	35	M	N	-	39,2	136	0,98	N	N	N	122	180	179	39	104	36	111	96
D084	47	F	N	N	35,3	113	0,89	N	N	N	77	88	193	56	119	18	133	105
D085	50	F	N	S	30,6	95	0,89	N	N	N	99	214	298	47	208	43	121	171
D086	59	F	S	S	29,6	111	0,98	S	N	N	102	153	227	56	140	31	155	128
D087	71	F	S	S	29,2	94	0,84	S	N	N	108	194	226	52	135	39	145	125
D088	47	F	S	N	36,1	101	0,88	S	N	N	88	150	228	54	144	30	145	127
D089	64	M	S	-	30,5	105	0,96	S	N	S	105	227	272	39	188	45	107	161
D091	62	M	N	-	32,5	109	0,96	S	N	N	91	83	183	45	121	17	119	111
D092	64	M	S	-	32,0	103	0,93	N	N	N	139	130	190	52	112	26	121	106
D093	82	F	S	S	31,0	115	0,98	N	N	N	158	163	151	47	71	33	146	90

ID, identificação; Tab., tabagismo; Meno., menopausa; IMC, índice de massa corporal; CA, circunferência abdominal; RCQ, relação cintura-quadril; HAS, hipertensão; DM, diabetes tipo 2; DCV, doença cardiovascular; Glic., glicose; TG, triglicerídeos; CT, colesterol total; HDL-C, colesterol do HDL; LDL-C, colesterol do LDL; VLDL-C, colesterol do VLDL; APO AI, apolipoproteína AI; APO B, apolipoproteína B.

ANEXO I. Dados biodemográficos, bioquímicos e clínicos dos indivíduos (continuação).

ID	Idade	Sexo	Tab.	Meno.	IMC	CA	RCQ	HAS	DM	DCV	Glic.	TG	CT	HDL-C	LDL-C	VLDL-C	APO AI	APO B
D094	67	F	N	S	35,6	106	0,88	S	N	N	136	255	224	40	133	51	118	142
D095	43	F	N	N	36,9	112	0,88	S	N	N	110	156	173	39	103	31	121	101
D096	61	F	N	S	37,7	121	0,90	S	S	N	272	164	178	43	102	33	134	105
D097	50	F	N	S	35,9	97	0,80	S	N	N	114	83	150	41	92	17	111	86
D098	37	F	N	N	28,8	98	0,94	N	N	N	96	97	155	39	97	19	110	106
D101	42	F	N	N	35,5	109	0,92	N	N	N	83	79	154	49	89	16	137	90
D102	46	F	N	N	30,5	95	0,81	N	N	N	90	81	150	39	95	16	109	92
D103	66	F	N	S	31,2	105	0,96	S	N	N	90	79	190	62	112	16	169	111
D106	63	F	N	S	40,1	120	0,92	S	N	N	100	198	243	51	152	40	146	142
D109	64	F	S	S	35,1	96	0,76	S	S	S	136	197	244	63	142	39	170	137
D110	53	M	S	-	33,5	111	0,91	S	S	S	122	77	165	40	110	15	118	99
D111	65	F	N	S	31,5	107	0,94	S	N	S	116	134	279	62	190	27	169	155
D112	36	M	S	-	29,4	106	0,98	N	N	S	97	104	214	53	140	21	136	130
D113	64	M	S	-	38,1	125	1,02	S	N	S	123	344	193	36	88	69	112	126
D114	46	M	S	-	30,8	103	0,97	S	N	N	92	127	243	43	175	25	123	150
D116	67	F	N	S	31,6	103	0,90	S	N	N	113	203	185	44	100	41	128	119
D117	56	M	N	-	29,4	103	0,97	N	N	N	106	81	143	40	87	16	104	83
D119	64	F	N	S	31,4	90	0,93	S	N	N	92	77	252	76	161	15	172	124
D120	50	M	S	-	38,5	116	0,94	S	N	S	110	89	229	51	160	18	137	132
D121	54	F	N	S	31,2	88	0,80	N	N	N	93	146	226	54	143	29	139	114
D122	69	F	S	S	34,4	106	0,92	S	N	N	102	79	198	47	135	16	110	110
D123	43	M	N	-	32,5	109	0,92	S	N	N	95	139	201	38	135	28	114	118
D124	54	F	N	S	31,3	97	0,88	S	S	N	132	178	158	53	69	36	160	90

ID, identificação; **Tab.**, tabagismo; **Meno.**, menopausa; **IMC**, índice de massa corporal; **CA**, circunferência abdominal; **RCQ**, relação cintura-quadril; **HAS**, hipertensão; **DM**, diabetes tipo 2; **DCV**, doença cardiovascular; **Glic.**, glicose; **TG**, triglicerídeos; **CT**, colesterol total; **HDL-C**, colesterol do HDL; **LDL-C**, colesterol do LDL; **VLDL-C**, colesterol do VLDL; **APO AI**, apolipoproteína AI; **APO B**, apolipoproteína B.

ANEXO I. Dados biodemográficos, bioquímicos e clínicos dos indivíduos (continuação).

ID	Idade	Sexo	Tab.	Meno.	IMC	CA	RCQ	HAS	DM	DCV	Glic.	TG	CT	HDL-C	LDL-C	VLDL-C	APO AI	APO B
D126	56	F	S	S	32,0	113	1,05	S	S	N	106	151	270	64	176	30	157	142
D127	48	F	N	N	31,6	97	0,87	S	N	N	88	162	239	54	153	32	151	126
D128	53	F	N	S	39,6	114	0,94	S	N	N	95	151	270	48	192	30	124	162
D132	51	F	S	S	32,0	93	0,88	S	N	S	110	238	219	64	107	48	143	76
D133	34	F	S	N	34,2	102	0,93	N	N	N	93	175	177	42	100	35	126	96
D136	38	M	S	-	39,8	127	0,97	N	N	N	107	134	221	38	156	27	120	147
D137	58	F	N	S	37,4	121	1,01	S	S	S	232	176	193	51	107	35	149	107
D139	69	F	S	S	38,1	128	0,99	S	N	S	114	212	213	54	117	42	155	106
D140	39	M	S	-	43,6	136	1,06	N	N	N	98	270	159	44	61	54	136	80
D141	65	F	S	S	30,4	105	0,99	S	S	N	200	193	282	55	188	39	149	146
D142	60	M	S	-	48,4	132	1,02	S	N	N	130	127	217	50	142	25	139	118
D143	59	F	N	S	34,4	104	0,90	S	N	N	96	116	187	43	121	23	132	105
D145	62	M	N	-	29,6	111	0,92	S	N	S	75	158	146	42	72	32	123	74
D146	46	M	S	-	37,9	124	1,03	S	S	N	273	281	275	39	180	56	103	176
D147	41	F	N	N	38,6	112	0,87	N	N	N	101	133	170	39	104	27	105	90
D149	23	M	N	-	43,3	138	0,97	S	N	N	91	153	154	37	86	31	118	94
D151	49	F	S	S	31,2	94	0,86	N	N	N	102	118	267	36	207	24	108	134
D155	62	M	N	-	35,7	120	1,00	S	N	N	113	240	204	31	125	48	112	118
D156	20	F	S	N	31,2	105	0,91	N	N	N	74	97	191	45	127	19	137	96
D157	40	F	S	N	26,1	95	0,9	N	N	N	84	84	176	47	112	17	130	84
D158	62	M	S	-	34,0	116	0,93	S	S	S	84	280	238	42	140	56	138	114
D159	49	F	N	S	31,6	102	0,92	S	N	N	97	149	242	49	163	30	132	110
D160	39	F	N	S	31,2	104	0,88	N	N	N	107	208	228	52	134	42	174	102

ID, identificação; **Tab.**, tabagismo; **Meno.**, menopausa; **IMC**, índice de massa corporal; **CA**, circunferência abdominal; **RCQ**, relação cintura-quadril; **HAS**, hipertensão; **DM**, diabetes tipo 2; **DCV**, doença cardiovascular; **Glic.**, glicose; **TG**, triglicerídeos; **CT**, colesterol total; **HDL-C**, colesterol do HDL; **LDL-C**, colesterol do LDL; **VLDL-C**, colesterol do VLDL; **APO AI**, apolipoproteína AI; **APO B**, apolipoproteína B.

ANEXO I. Dados biodemográficos, bioquímicos e clínicos dos indivíduos (continuação).

ID	Idade	Sexo	Tab.	Meno.	IMC	CA	RCQ	HAS	DM	DCV	Glic.	TG	CT	HDL-C	LDL-C	VLDL-C	APO AI	APO B
D162	44	M	N	-	43,3	144	0,97	S	N	N	83	203	198	46	111	41	155	96
D163	38	F	N	N	34,6	110	0,87	N	N	N	119	156	179	31	117	31	132	89
D164	19	F	N	N	25,0	71	0,72	N	N	N	90	129	132	33	73	26	109	54
D165	31	F	N	N	40,7	120	0,90	S	N	N	98	139	247	61	158	28	159	92
D167	57	F	N	S	28,2	98	0,88	S	N	N	86	60	238	66	160	12	156	91
D168	39	F	S	S	25,1	87	0,83	N	N	N	95	254	306	63	192	51	153	112
D169	45	F	N	S	33,3	103	0,87	S	N	S	90	186	142	-	-	37	120	63
D170	42	F	N	N	52,4	124	0,80	N	N	N	106	123	176	54	97	25	149	63
D171	26	M	N	-	45,0	131	0,98	S	N	N	93	228	347	47	254	46	156	149
D172	50	F	S	S	38,0	108	0,89	N	N	N	164	144	279	44	206	29	137	129
D173	49	F	S	S	35,1	110	0,92	S	S	N	175	135	182	58	97	27	161	87
D174	36	M	N	-	34,6	112	0,94	N	N	N	104	219	209	41	124	44	127	106
E001	44	F	S	N	21,2	81	0,82	N	N	N	84	55	196	57	128	11	136	103
E002	35	F	N	N	23,6	82	0,84	N	N	N	81	59	161	62	87	12	139	72
E003	52	F	S	S	26,1	96	0,91	N	N	N	95	101	278	61	197	20	149	132
E004	30	F	N	N	30,8	98	0,92	N	N	N	101	173	200	60	105	35	163	100
E005	-	F	N	N	19,4	85	0,91	N	N	N	84	34	151	60	84	7	146	71
E007	50	F	S	S	31,6	97	0,90	S	N	N	84	405	340	68	-	-	194	172
E010	52	F	N	S	20,1	85	0,86	N	N	N	92	102	210	62	128	20	166	94
E012	35	F	N	N	25,9	87	0,88	N	N	N	90	79	176	55	105	16	138	83
E014	40	F	S	N	24,8	88	0,87	S	N	N	85	142	198	50	120	28	149	113
E015	52	F	N	S	21,8	78	0,84	N	N	N	85	63	220	85	122	13	186	94
E016	39	M	N	-	25,6	88	0,88	N	N	N	116	95	214	58	137	19	154	113

ID, identificação; Tab., tabagismo; Meno., menopausa; IMC, índice de massa corporal; CA, circunferência abdominal; RCQ, relação cintura-quadril; HAS, hipertensão; DM, diabetes tipo 2; DCV, doença cardiovascular; Glic., glicose; TG, triglicerídeos; CT, colesterol total; HDL-C, colesterol do HDL; LDL-C, colesterol do LDL; VLDL-C, colesterol do VLDL; APO AI, apolipoproteína AI; APO B, apolipoproteína B.

ANEXO I. Dados biodemográficos, bioquímicos e clínicos dos indivíduos (continuação).

ID	Idade	Sexo	Tab.	Meno.	IMC	CA	RCQ	HAS	DM	DCV	Glic.	TG	CT	HDL-C	LDL-C	VLDL-C	APO AI	APO B
E017	37	F	S	N	24,3	88	0,92	N	N	N	84	126	223	68	130	25	181	97
E018	-	F	S	S	20,4	77	0,79	N	N	N	94	99	207	73	114	20	183	99
E019	22	F	N	N	19,7	69	0,73	N	N	N	82	153	206	72	103	31	196	107
E020	57	F	S	N	21,6	69	0,75	N	N	N	105	40	181	80	93	8	170	78
E025	39	F	N	N	29,4	92	0,85	N	N	N	88	124	176	55	96	25	141	85
E027	27	F	N	N	22,9	73	0,77	N	N	N	84	88	223	72	133	18	183	108
E042	-	F	N	N	25,6	84	0,84	N	N	N	90	72	181	67	100	14	157	89
E043	62	F	N	S	40,7	115	0,86	S	N	N	106	84	145	47	81	17	143	73
E050	30	M	S	-	25,8	88	0,86	N	N	N	94	108	136	59	55	22	156	53
U002	43	F	N	N	23,5	72	0,83	N	N	N	92	101	179	50	109	20	130	101
U004	50	F	N	S	23,3	84	0,84	N	N	N	93	97	201	55	127	19	114	92
U006	27	F	N	N	22,8	81	0,84	N	N	N	88	95	144	50	75	19	126	73
U008	49	F	N	N	24,2	92	0,90	N	N	N	88	93	214	54	141	19	123	98
U012	40	F	N	N	23,6	-	-	N	N	N	85	87	205	50	138	17	106	90
U013	52	F	N	S	24,1	75	0,76	N	N	N	84	92	215	48	149	18	124	123
U016	29	F	S	N	21,2	71	0,77	N	N	N	81	99	124	45	59	20	120	59
U017	61	F	N	S	24,6	79	0,82	N	N	N	104	128	247	41	180	26	99	119
U020	35	F	N	N	23,3	78	0,82	N	N	N	91	100	138	39	79	20	93	68
U022	46	F	N	N	29,0	93	0,83	N	N	N	94	94	185	65	101	19	117	79
U024	35	F	S	N	20,0	85	0,92	N	N	N	94	100	129	43	66	20	99	49
U026	64	F	N	S	24,2	99	1,02	N	N	N	105	193	242	60	143	39	129	119
U028	52	M	N	-	26,0	93	0,94	N	N	N	104	128	207	41	140	29	101	106
U034	56	M	S	-	26,9	100	0,96	N	N	N	97	120	304	39	223	42	110	160

ID, identificação; Tab., tabagismo; Meno., menopausa; IMC, índice de massa corporal; CA, circunferência abdominal; RCQ, relação cintura-quadril; HAS, hipertensão; DM, diabetes tipo 2; DCV, doença cardiovascular; Glic., glicose; TG, triglicerídeos; CT, colesterol total; HDL-C, colesterol do HDL; LDL-C, colesterol do LDL; VLDL-C, colesterol do VLDL; APO AI, apolipoproteína AI; APO B, apolipoproteína B.

ANEXO I. Dados biodemográficos, bioquímicos e clínicos dos indivíduos (continuação).

ID	Idade	Sexo	Tab.	Meno.	IMC	CA	RCQ	HAS	DM	DCV	Glic.	TG	CT	HDL-C	LDL-C	VLDL-C	APO AI	APO B
U036	51	F	N	S	28,9	99	0,91	N	N	N	94	152	213	50	133	30	118	99
U044	37	F	N	N	31,0	95	0,91	N	N	N	89	124	217	45	147	25	103	113
U045	45	F	N	N	21,6	82	0,84	N	N	N	95	195	249	88	122	39	197	118
U046	21	F	N	N	20,3	78	0,78	N	N	N	90	130	195	81	88	26	166	86
U047	49	M	N	-	21,5	80	0,82	N	N	N	85	99	213	59	134	20	124	92
U049	35	M	N	-	21,5	81	0,84	N	N	N	81	72	171	47	110	14	104	82
U051	60	F	N	S	24,1	83	0,85	N	N	N	97	56	166	66	89	11	127	66
U052	48	M	N	-	21,0	86	0,91	N	N	N	92	105	163	45	97	21	100	90
U053	66	M	N	-	27,2	100	0,94	N	N	N	88	130	217	50	141	26	110	107
U054	54	F	N	S	20,1	75	0,87	S	N	N	97	129	212	62	124	26	146	100
U055	48	F	N	N	28,3	92	0,88	N	N	N	102	54	215	82	122	11	144	98
U056	18	F	N	N	19,1	79	0,85	N	N	N	86	59	160	83	65	12	145	55
U057	22	F	N	N	20,5	74	0,78	N	N	N	79	81	169	70	83	16	150	53
U058	37	F	N	N	20,7	76	0,80	N	N	N	79	89	204	68	118	18	151	94
U059	32	F	N	N	21, 2	88	0,88	N	N	N	87	65	214	86	115	13	172	77
U060	69	M	S	-	21,0	90	0,86	N	N	N	86	156	197	49	117	31	120	98
U061	38	F	N	S	22,1	80	0,82	N	N	N	79	52	153	44	99	10	103	82
U062	34	F	N	N	22,5	77	0,81	N	N	N	88	107	203	78	104	21	169	78
U063	73	M	S	-	24,4	86	0,90	N	N	N	91	45	142	56	77	9	130	61
U065	41	F	N	N	26,0	90	0,87	N	N	N	90	104	226	55	150	21	136	119
U067	24	F	N	N	33,6	115	0,96	N	N	N	90	50	148	68	70	10	130	61
U069	48	M	N	-	24,7	93	0,90	N	N	N	95	88	231	41	172	18	96	111
U071	47	M	N	-	20,1	88	0,88	N	N	N	69	141	191	34	129	28	96	100

ID, identificação; **Tab.**, tabagismo; **Meno.**, menopausa; **IMC**, índice de massa corporal; **CA**, circunferência abdominal; **RCQ**, relação cintura-quadril; **HAS**, hipertensão; **DM**, diabetes tipo 2; **DCV**, doença cardiovascular; **Glic.**, glicose; **TG**, triglicerídeos; **CT**, colesterol total; **HDL-C**, colesterol do HDL; **LDL-C**, colesterol do LDL; **VLDL-C**, colesterol do VLDL; **APO AI**, apolipoproteína AI; **APO B**, apolipoproteína B.

ANEXO I. Dados biodemográficos, bioquímicos e clínicos dos indivíduos (continuação).

ID	Idade	Sexo	Tab.	Meno.	IMC	CA	RCQ	HAS	DM	DCV	Glic.	TG	CT	HDL-C	LDL-C	VLDL-C	APO AI	APO B
U073	40	M	N	-	25,3	95	0,90	N	N	N	95	67	253	56	184	13	120	123
U074	36	M	N	-	20,6	81	0,83	N	N	N	87	97	200	65	116	19	143	85
U075	58	F	N	S	25,4	86	0,91	N	N	N	107	359	234	45	117	72	132	119
U076	49	M	S	-	21,0	79	0,87	N	N	N	87	70	181	41	126	14	101	100
U078	33	F	N	N	20,4	76	0,84	N	N	N	90	80	221	78	127	16	177	99
U079	38	F	S	N	20,6	77	0,79	N	N	N	88	87	216	71	128	17	150	89
U080	24	F	N	N	20,0	69	0,75	N	N	N	80	125	209	81	103	25	182	107
U081	27	M	N	-	22,2	85	0,89	N	N	N	89	171	244	53	157	34	122	121
U082	58	M	N	-	21,6	83	0,84	N	N	N	93	129	240	64	150	26	140	117
U083	54	F	N	S	20,3	69	0,78	N	N	N	89	78	245	64	165	16	142	104
U084	37	F	S	N	20,8	93	0,94	N	N	N	86	60	262	89	161	12	161	135
U085	45	F	S	S	24,0	87	0,89	N	N	N	94	115	245	56	166	23	116	115
U086	32	F	N	N	24,8	80	0,81	N	N	N	87	70	184	82	86	14	163	69
U087	72	M	S	-	22,5	92	0,95	N	N	N	94	125	191	44	122	25	110	100
U088	67	M	S	-	22,8	89	0,88	N	N	N	94	85	210	72	121	17	147	87
U089	63	F	N	S	24,2	85	0,83	N	N	N	97	83	147	48	82	17	118	64
U091	48	M	S	-	31,5	111	0,99	N	N	N	143	300	272	44	168	60	121	137
U092	41	F	N	N	24,5	97	0,93	N	N	N	101	50	186	66	110	10	118	80
U093	42	F	N	N	25,2	85	0,83	N	N	N	77	46	182	73	100	9	144	77
U095	64	M	N	-	27,1	106	0,97	N	N	N	89	142	258	47	183	28	108	136
U096	73	M	N	-	26,3	99	0,96	S	N	N	123	67	176	50	113	13	116	89
U097	44	F	N	N	25,6	83	0,89	N	N	N	101	233	233	40	146	47	11	144
U098	49	M	N	-	25,5	95	0,91	N	N	N	101	136	216	53	135	28	124	118

ID, identificação; **Tab.**, tabagismo; **Meno.**, menopausa; **IMC**, índice de massa corporal; **CA**, circunferência abdominal; **RCQ**, relação cintura-quadril; **HAS**, hipertensão; **DM**, diabetes tipo 2; **DCV**, doença cardiovascular; **Glic.**, glicose; **TG**, triglicerídeos; **CT**, colesterol total; **HDL-C**, colesterol do HDL; **LDL-C**, colesterol do LDL; **VLDL-C**, colesterol do VLDL; **APO AI**, apolipoproteína AI; **APO B**, apolipoproteína B.

ANEXO I. Dados biodemográficos, bioquímicos e clínicos dos indivíduos (continuação).

ID	Idade	Sexo	Tab.	Meno.	IMC	CA	RCQ	HAS	DM	DCV	Glic.	TG	CT	HDL-C	LDL-C	VLDL-C	APO AI	APO B
U101	62	M	S	-	27,7	98	0,94	N	N	N	90	194	190	41	110	39	124	107
U102	61	F	N	S	27,4	107	1,04	N	N	N	100	419	315	58	-	-	147	164
U103	27	M	N	-	30,7	102	0,85	N	N	N	89	162	223	52	139	32	132	107
U104	40	F	N	N	27,9	98	0,94	N	N	N	90	252	294	61	183	50	158	141
U106	36	M	N	-	24,2	79	0,85	N	N	N	80	124	207	43	139	25	108	85

ID, identificação; **Tab.**, tabagismo; **Meno.**, menopausa; **IMC**, índice de massa corporal; **CA**, circunferência abdominal; **RCQ**, relação cintura-quadril; **HAS**, hipertensão; **DM**, diabetes tipo 2; **DCV**, doença cardiovascular; **Glic.**, glicose; **TG**, triglicerídeos; **CT**, colesterol total; **HDL-C**, colesterol do HDL; **LDL-C**, colesterol do LDL; **VLDL-C**, colesterol do VLDL; **APO AI**, apolipoproteína AI; **APO B**, apolipoproteína B.