

Alexandre Galvão da Silva

**Avaliação da resposta vasodilatadora em
crianças obesas portadoras de polimorfismo
dos receptores β 2-adrenérgico**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Endocrinologia
Orientadora: Profa. Dra. Sandra Mara F. Villares

São Paulo
2007

Alexandre Galvão da Silva

**Avaliação da resposta vasodilatadora em
crianças obesas portadoras de polimorfismo
dos receptores β 2-adrenérgico**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Endocrinologia
Orientadora: Profa. Dra. Sandra Mara F. Villares

São Paulo
2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Alexandre Galvão da
Avaliação da resposta vasodilatadora em crianças obesas portadoras de
polimorfismo dos receptores β_2 -adrenérgico / Alexandre Galvão da Silva. -- São
Paulo, 2007.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Clínica Médica.

Área de concentração: Endocrinologia.

Orientadora: Sandra Mara Ferreira Villares.

Descritores: 1.Códon 2.Polimorfismo genético 3.Receptores beta-2 adrenérgicos
4.Vasodilatadores/uso terapêutico 5.Obesidade 6.Estresse psicológico 7.Exercício
8.Criança

USP/FM/SBD-255/07

“A educação é o bálsamo que cura as chagas que provocam a escuridão, nos dando a luz que irá iluminar os caminhos que levam a humanidade a estar sempre próximo à perfeição”.

André Carlos da Silva

Dedicatória

Agradeço a Deus pela vida, pela saúde e pelas inúmeras graças a mim concedidas.

Aos meus pais, André e Elia, pelo amor, pelo carinho, pela minha formação e pelo exemplo de vida.

À minha esposa, Débora, pelo seu amor sempre tão presente, pelo constante incentivo e paciência, e que realiza comigo mais esta etapa de vida conquistada.

Aos meus irmãos Andréa e Arthur, pelo carinho intenso e verdadeiro que me acompanha durante toda a vida.

Agradecimentos

À Dra. Sandra Villares, minha orientadora e professora, pela oportunidade de aprendizagem e influência na minha formação profissional e científica, por meio do exemplo de persistência, ética e seriedade, o meu profundo agradecimento.

Ao professor, Carlos Eduardo Negrão, pela sua importante participação, apoio e suporte científico neste projeto.

À Profa. Dra., Ivani Trombetta, que participou com efetividade, dedicação e cumplicidade na finalização deste trabalho.

Ao meu grande amigo, Mauricio Maltez, pelos momentos de amizade e de cumplicidade, que sempre me apoiou incondicionalmente em todos os momentos da minha vida.

Ao meu amigo, Giulliano Gardenghi, pelo carinho e amizade compartilhada de forma mais sincera e honesta.

Às biólogas, Eliana e Isabel, o meu agradecimento pelas incontáveis vezes em que encontrei soluções para as minhas dúvidas metodológicas e moleculares e, principalmente, pela amizade sempre presente.

Ao Dr., Enéas Rocco, pela amizade e apoio no dia-a-dia que me deu tranquilidade para a realização desta dissertação de tese.

À Dra. Marines Ferrareto, pelo carinho e alegrias proporcionadas nos últimos anos.

Aos colegas médicos, nutricionistas, professores de educação física, estagiários e secretárias do ambulatório de endocrinologia do HC-FMUSP e da Unidade de Reabilitação Cardiovascular e Fisiologia do Exercício do

Instituto do Coração, que tiveram, todo mérito e todo o meu reconhecimento pela atenção e carinho dispensados em relação aos pacientes e pela coleta de dados.

Às minhas crianças e família, um agradecimento especial, sem as quais não seria possível a realização deste estudo.

À Capes – Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior.

A todos os amigos que porventura eu não tenha citado aqui, o meu muito obrigado.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Características antropométricas dos indivíduos de acordo com os haplotipos	35
Tabela 2- Dados bioquímicos nos três grupos de acordo com os haplotipos	36
Tabela 3- Dados basais de pressão arterial média, fluxo sanguíneo muscular, condutância vascular do antebraço e frequência cardíaca nos três grupos de acordo com os haplotipos	37
Tabela 4 -Respostas hemodinâmicas durante o exercício isométrico no grupo de crianças obesas homozigotas para Arg16Gln27, Gly16Gln27 e Gly16Glu27	38
Tabela 5 - Respostas hemodinâmicas durante o estresse mental no grupo de crianças obesas homozigotas para Arg16Gln27, Gly16Gln27 e Gly16Glu27	41

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Fluxo sanguíneo muscular do antebraço durante o exercício Isométrico para Arg16Gln27, Gly16Gln27 e Gly16Glu27	39
FIGURA 2 -Condutância vascular do antebraço durante o exercício Isométrico para Arg16Gln27, Gly16Gln27 e Gly16Glu27	40
FIGURA 3 - Fluxo sanguíneo muscular do antebraço durante o estresse mental para Arg16Gln27, Gly16Gln27 e Gly16Glu27	42
FIGURA 4 - Condutância vascular do antebraço durante o estresse mental para Arg16Gln27, Gly16Gln27 e Gly16Glu27	43

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
CVA	Conduta vascular do Antebraço
CR	Coeficiente Respiratório
CA	Cintura Quadril
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
FC	Frequência Cardíaca
FSA	Fluxo Sangüíneo do Antebraço
GEB	Gasto Calórico Basal
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade (<i>High Density Lipoprotein</i>)
HOMA	<i>Homeostasis Model Assesment</i>
IMC	Índice de Massa Corporal
LDL	Lipoproteína de Baixa densidade (<i>Low Density Lipoprotein</i>)
PA	Pressão Arterial
PAM	Pressão Arterial Média
TG	Triglicérides

LISTA DE SÍMBOLOS

EP	erro padrão
kg	quilogramas
min	minutos
ml	mililitros
kg/m ²	quilograma por metro quadrado
mm/Hg	mililitros de mercúrio
ml/min/100ml	mililitros de sangue por minuto por 100 mililitros de tecido
ml/dl/120ml	mililitros por decilitro em 120 mililitros de tecido
mg/dl	miligrama por decilitro
μU/ml	microunidade por mililitro
%	por cento

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
LISTA DE SÍMBOLOS.....	X
RESUMO.....	XIII
SUMMARY	XIV
1 INTRODUÇÃO	2
1.1 Obesidade.....	2
1.2 Obesidade infantil	3
1.3 Obesidade e genética	5
1.4 Receptor β 2-adrenérgico.....	6
1.5 Polimorfismos do receptor β 2-adrenérgico.....	7
2 OBJETIVOS.....	15
3 MÉTODOS.....	17
3.1 Seleção dos pacientes	17
3.2 Avaliação antropométrica.....	18
3.3 Avaliação da composição corporal.....	19
3.4 Análise do gasto energético pela calorimetria indireta	19
3.5 Avaliação laboratorial.....	20
3.5.1 Caracterização da resistência à insulina	20
3.5.2 Análise dos lípides	22
3.5.3 Determinação da leptina plasmática	23
3.5.4 Determinação da adiponectina plasmática.....	23
3.5.5 Avaliação molecular	23
3.5.5.1 Extração de DNA	23
3.5.5.2 Amplificação por PCR do segmento de DNA, contendo o códon 27 do receptor β 2-adrenérgico	25
3.5.5.3 Amplificação por PCR do segmento de DNA, contendo o códon 16 do receptor β 2-adrenérgico.	26

3.6	Protocolo experimental.....	26
3.6.1	Experimento 1: efeito agudo do exercício isométrico na reatividade vascular.....	26
3.6.2	Experimento 2: reatividade vascular durante estresse mental.....	27
3.7	Métodos de avaliação.....	28
3.7.1	Avaliação da frequência cardíaca.....	28
3.7.2	Avaliação da pressão arterial.....	28
3.7.3	Avaliação do fluxo sanguíneo muscular.....	29
3.7.4	Avaliação da condutância vascular do antebraço.....	29
3.8	Seqüência experimental.....	30
4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
5	RESULTADOS.....	34
5.1	Dados basais antropométricos e metabólicos.....	34
5.2	Resposta hemodinâmica.....	37
5.2.1	Exercício isométrico a 30%.....	37
5.2.2	Estresse mental.....	40
6	DISCUSSÃO.....	45
7	CONCLUSÃO.....	53
	ANEXOS.....	55
	REFERÊNCIAS.....	84

RESUMO

SILVA, A.G. **Avaliação da resposta vasodilatadora em crianças obesas portadoras de polimorfismo dos receptores β_2 -adrenérgico**. São Paulo, 2006. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo

A obesidade é um dos maiores fatores de risco para o desenvolvimento de comprometimentos cardiovasculares. Essas alterações também são encontradas em crianças. Recentemente, estudos citam prejuízos cardiovasculares em crianças obesas. Estudos prévios *in vitro* e *in vivo*, sugeriram que alguns polimorfismos para o receptor β_2 -adrenérgico podem afetar de forma distinta as respostas à estimulação adrenérgica, levando a diferentes modulações cardiovasculares e metabólicas. No presente estudo, nós avaliamos a pressão arterial média, fluxo sanguíneo muscular e condutância vascular em resposta a estresse mental e exercício em crianças obesas homozigotas para Arg16 e Gln27 (Arg16/Gln27), Gly16 e Gln27 (Gly16/Gln27), e Gly16 e Glu27 (Gly16/Glu27) no receptor β_2 -adrenérgico. Inicialmente, foram pré-selecionadas 110 crianças obesas voluntárias do Ambulatório de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Essas crianças foram genotipadas para os alelos Arg 16, Gly16, Glu27 e Gln27 do β_2 adrenoreceptor. No estudo, foram detectadas 40 crianças obesas em homozigose para os alelos 16 e 27 do receptor β_2 -adrenérgico. Vinte e três eram homozigotas para Arg16/Gln27, 7 para Gly16/Gln27 e 10 para Gly16/Glu27. Quando os três grupos foram comparados em condições basais, não houve diferenças nas variáveis antropométricas (idade, peso, IMC e Z-score), nos parâmetros metabólicos (glicemia, colesterol total, LDL – colesterol, HDL – colesterol, triglicérides, leptina, insulina, área de glicose e insulina e HOMA – IR) e nas variáveis hemodinâmicas (frequência cardíaca, pressão arterial, fluxo sanguíneo muscular e condutância vascular). Durante o exercício, a resposta vasodilatadora foi maior nas crianças obesas homozigotas para Gly16 e Glu27 quando comparada às crianças obesas homozigotas para Gly16 e Gln27 e Arg16 e Gln27. Da mesma maneira, a resposta vasodilatadora ao estresse mental, foi maior nas crianças obesas homozigotas para Gly16 e Glu27 quando comparadas às crianças dos outros dois grupos. Pelos resultados, concluímos que a presença de homozigose para Gly16 e Glu27 do receptor β_2 -adrenérgico favorece a melhor resposta vasodilatadora durante manobras fisiológicas. É razoável pensar que estas crianças estarão mais protegidas contra injúrias cardiovasculares.

Palavras-chave: Obesidade, exercício, estresse mental, polimorfismo Glu27, receptor β_2 -adrenérgico, resposta vasodilatadora.

SUMMARY

SILVA, A.G. **Evaluation the muscle vasodilatory responses in obese children with β_2 -adrenoceptor polymorphism.** São Paulo, 2006. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo

Obesity is one major risk factor for development of vascular disorders. These alterations are also found in children, since recent studies reported vascular disorders in childhood obesity. Previous studies *in vivo* and *in vitro*, suggested that these variants of β_2 -adrenoceptors (ADRB2) may differently affect functional responses to adrenergic stimulation, leading to distinct modulations on cardiovascular and metabolic phenotypes. In the present investigation we report the mean blood pressure, forearm blood flow and forearm vascular conductance response during mental stress and exercise in obesity children who were homozygous for Arg16 and Gln27 (Arg16/Gln27), Gly16 and Gln27 (Gly16/Gln27), and Gly16 and Glu27 (Gly16/Glu27) of the β_2 -adrenoceptors. Initially, we screened one hundred and ten pre-selected obese children volunteers, from the Clinical Endocrinology Ambulatory Clinic of University of São Paulo. These children were genotyped for the Arg16, Gly16, Gln27, and Glu27 β_2 -adrenoceptor alleles. Forty subjects who were homozygous for the alleles 16 and 27 were involved in the study. Twenty-three were homozygous for Arg16/Gln27, 7 for Gly16/Gln27, and 10 for Gly16/Glu27. When the three groups were compared, in basal conditions, there were no difference in terms of anthropometry (age, weight, height, BMI, Z-score), metabolic variables (glucose, cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol, triglycerides, leptin, insulin, glucose area, insulin area and HOMA-IR) and hemodynamics variables (heart rate, blood pressure, forearm blood flow and forearm vascular conductance). During exercise, vasodilatory responsiveness was greater in obese children homozygous for Gly16 and Glu27 than in obese children homozygous for Gly 16 and Gln 27, and Arg 16 and Gln 27. Similarly, during mental stress vasodilatory responsiveness was greater in obese children homozygous for Gly 16 and Glu 27, than in obese children for Gly 16 and Gln 27, and Arg 16 and Gln 27. In conclusion, our results obtained in the obese children support the view that the homozygous for Gly16/Glu27 of the β_2 -adrenoceptor favors the greater vasodilatory response during physiological maneuvers; it is reasonable to think that they will be more protected against cardiovascular disorders.

Key words: Obesity, mental stress, Glu27 polymorphism, β_2 -adrenoceptor, vasodilatory response

1 INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade

De uma forma simplista, podemos afirmar que a obesidade resulta do aporte energético positivo em relação ao gasto. No entanto, os mecanismos que levam ao fenótipo obesidade são muito mais complexos. Embora a obesidade esteja relacionada a fatores genéticos, estudos comportamentais associam o crescimento do número de indivíduos obesos ao estilo de vida adotado pelo mundo moderno (KOPELMAN, 2000). Apesar das evidências de que fatores genéticos têm uma grande importância na etiologia da obesidade, é evidente que o fator ambiental é o principal determinante da epidemia da obesidade que vivemos hoje. Isto pode ser explicado pela dissociação entre o período que houve o aumento expressivo da obesidade, principalmente relacionado à mudança nos hábitos e no estilo de vida, e o período necessário para estabelecer alterações genéticas substanciais. Um consenso da causa do aumento da obesidade no mundo industrializado é o consumo de grande proporção de calorias derivadas da gordura (BRAY, 1998), associado a um estilo de vida sedentário (FRENCH, 2001; JEBB, 1999).

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

1.2 Obesidade infantil

A prevalência da obesidade infantil está aumentando em muitos países do mundo, estando o Brasil incluído neste fenômeno epidemiológico. Estima-se que 16,7% das crianças brasileiras encontram-se também com sobrepeso (IBGE 2006). Cabe observar que a da incidência da obesidade infantil está aumentando de maneira alarmante e, em termos de saúde pública, tal fato pode desencadear a ocorrência cada vez mais precoce das complicações associadas à obesidade infantil, comprometendo, assim, a saúde a médio e longo prazos.

As razões para o incremento do número de crianças obesas são complexas e não completamente elucidadas. Uma das hipóteses seria a da seleção genética dos obesos ao longo de milhões de anos, seguida da adaptação do fenótipo por influência das modificações de hábitos alimentares e diminuição considerável da atividade física, em especial nas últimas décadas. As modificações de ritmo alimentar, aumento do consumo de lípidos, a mídia da indústria de alimentos, o aumento do tempo despendido em frente à TV, aos computadores e aos vídeos games, são fatores que continuam a contribuir de maneira importante no aumento da obesidade infantil.

Na infância, da mesma forma que no indivíduo adulto, a obesidade resulta de um desequilíbrio entre o consumo e o gasto energético.

A obesidade é freqüentemente atribuída a excessos alimentares em valores absolutos. Contudo, há evidências que crianças obesas apresentam

gasto energético de repouso por quilo (kg), de massa magra ligeiramente inferior às crianças magras (TOUNIAN P, 1993).

A maior probabilidade de crianças obesas se tornarem adultos obesos é descrita por alguns autores (PÉRUSSE L, 1999; OLIVEIRA, 2003). Nestes estudos, ficou também evidenciado que a maior incidência de doenças cardiovasculares e metabólicas em adultos obesos está relacionada ao efeito aditivo desta doença, ou seja, quanto mais precoce a obesidade, maiores são as chances destes indivíduos apresentarem distúrbios metabólicos e cardiovasculares. A falta de atividade física e o mau hábito alimentar, presentes no estilo de vida ocidental, têm sido apontados como os fatores ambientais que levam ao aumento da prevalência da obesidade infantil (OLIVEIRA, 2003).

Evidências demonstram que a obesidade está associada a maiores níveis de atividade nervosa simpática muscular, pressão arterial e resistência vascular periférica. Esses fatores têm relação inversamente proporcional aos níveis de fluxo sanguíneo muscular, que estão diminuídos nessa população (RIBEIRO, 2001). Parte destas alterações hemodinâmicas parece ser mediada por alterações autonômicas. Indivíduos obesos têm disfunção barorreflexa (GRASSI G, 1998), apnéia do sono (NARKIEWICZ K, 1999), além da diminuição no controle metabólicoreflexo (NEGRÃO CE, 2001).

Alterações na ativação do sistema nervoso simpático (RIBEIRO, 2001, GRASSI G, 1998), associadas a alterações autonômicas reflexas, poderiam representar mais uma das variáveis envolvidas na doença multifatorial que é a obesidade. São poucos os autores que se dedicaram ao

estudo do controle autonômico e da resposta hemodinâmica na obesidade infantil. NAGAI et al. (2004), estudando o controle autonômico no coração de crianças obesas, verificaram um balanço autonômico alterado, evidenciando um aumento da atividade nervosa simpática nesse grupo. Recentemente, em nosso grupo, MALTEZ et al. (2005), verificando o comportamento vascular na musculatura esquelética de crianças obesas, observaram menor resposta vasodilatadora. A associação de dieta e de exercício físico restaurou esta disfunção vascular, trazendo à tona a discussão sobre a importância do exercício e da boa alimentação, que influenciariam positivamente no comportamento neurovascular de crianças obesas.

1.3 Obesidade e genética

No terreno da genética da obesidade, devemos salientar que a associação de vários polimorfismos e mutações, algumas já definidas, e outras por definir, podem ser diferentes de um indivíduo para o outro (EVANS, 2003; RANKINEM, 2002). Estas diferenças poderiam atuar, desencadeando a alteração central da regulação do apetite (HALL, 2000) ou a utilização de substrato energético pelo organismo, ou ainda poderiam desempenhar papel relevante na estocagem de energia sob a forma de triglicérides no tecido adiposo, levando ao aumento da massa adiposa (PEREZ-MARTIN, 2001).

1.4 Receptor β 2-adrenérgico

Na maioria dos órgãos e tecidos, a estimulação dos nervos simpáticos causa vasoconstrição, redução do fluxo sanguíneo e elevação da pressão sanguínea (DISHY, 2001). Porém, em alguns tecidos como musculatura esquelética, e algumas áreas da pele e no tecido adiposo, a estimulação simpática causa vasodilatação e incremento do fluxo sanguíneo mediada pelo receptor β 2-adrenérgico (DISHY V, 2001). Alguns estudos têm demonstrado que indivíduos obesos apresentam resposta vasodilatadora diminuída durante a reação de defesa (ROCKSTROTH JK, 1992), o que, segundo alguns autores, parece estar relacionado a uma deficiência na produção de óxido nítrico (LAAKSO M, 1990). Estas disfunções vasculares somadas a alterações de receptores β 2-adrenérgicos (MATSUKAWA K, 1993) podem representar mais um fator de risco cardiovascular para o paciente obeso.

Durante a reação de defesa no animal, ou stress mental no homem ocorre vasodilatação muscular pelo aumento na atividade nervosa simpática. Além disso, sabe-se que esta resposta de aumento de fluxo sanguíneo muscular é, em parte, devida à liberação de óxido nítrico (DIETZ NM, 1994; MATSUKAWA K, 1993) e/ou vasodilatação noradrenérgica (DIETZ NM, 1997). Portanto, em pacientes obesos, que apresentam disfunções vasculares e alteração de receptores β 2-adrenérgicos, podem-se precipitar eventos cardiovasculares durante a reação de defesa.

1.5 Polimorfismos do receptor β 2-adrenérgico

Estudos têm demonstrado que o gene que codifica o receptor β 2-adrenérgico, no cromossomo 5, apresenta heterogeneidade na população humana (GREEN SA, 1995), com ocorrências naturais de polimorfismos nos codons que codificam para os aminoácidos na posição 16 e 27 do domínio N-terminal extracelular do receptor. Estudo em células de fibroblastos de hamster mostrou que a presença de polimorfismo na forma homozigota do códon 27 da substituição do aminoácido glutamina pelo ácido glutâmico (Gln27→Glu) provocava ausência de dessensibilização frente a uma estimulação prolongada com um agonista do receptor β 2-adrenérgico (GREEN SA, 1994). Esse trabalho serviu como referência para outros estudos, tentando associar a presença desses polimorfismos na fisiopatologia da obesidade humana, por meio de estudos *in vitro* ou *in vivo* do tecido adiposo. Desde a identificação dos polimorfismos dos receptores β 2-adrenérgicos humanos, que codifica os aminoácidos dos codons 16 e 27 foram descritas, estudos têm sido conduzidos para elucidar sua funcionalidade e/ou modulação vascular e metabólica (COCKCROFT JR, 2000; DISHY V, 2001).

LARGE et al. (1997) descreveram que os polimorfismos do receptor β 2-adrenérgico que consistiam na substituição do aminoácido arginina pela glicina (Arg16→Gly) e na substituição do aminoácido glutamina pelo ácido glutâmico (Gln27→Glu) são mais freqüentes em obesos e se associam à alteração da função dos receptores β 2-adrenérgicos no adipócito. Estes

autores descreveram que a combinação do polimorfismo nos codons 16 e 27 apresentava alta correlação, uma vez que 64% dos indivíduos apresentavam as formas Arg16Gly e Gln27Glu nas formas homozigóticas e heterozigóticas. Os polimorfismos dos codons 16 e 27 diferiam significativamente entre os obesos e não obesos ($P=0.024$). Estes autores descreveram também que a maior diferença entre ambos os grupos foi a maior expressão dos homozigotos de ambos os codons Gly16 e Glu27 nos indivíduos obesos com *odds ratio* de 10.3. SHIGEMOTO et al. (1999), estudando a presença do polimorfismo Gly16 e Glu27 em pacientes obesos com diabetes e hipertrigliceridemia, demonstraram que a presença do polimorfismo Glu27 nesses pacientes foi mais freqüente.

ISHIYAMA-SHIGEMOTO et al. (1999) demonstraram que tanto em mulheres como em homens japoneses, a presença do alelo polimórfico do códon 27 (Glu27) estava associada à obesidade. Esses indivíduos possuíam maiores TG plasmáticos, colesterol total, hemoglobina glicada, PAS e PAD do que aqueles sem a variante. Uma explicação aventada por esses autores corroboraria com o estudo de GREEN et al. (1994): a resistência do receptor à dessensibilização levaria ao aumento da liberação de ácidos graxos livres pelos adipócitos e, conseqüentemente, à hipertrigliceridemia e resistência à insulina.

Outros trabalhos demonstram que o efeito do polimorfismo no receptor adrenérgico tem efeitos negativos sobre a obesidade. HELLSTROM et al. (1999) descreveram que a obesidade em indivíduos suecos do sexo masculino não estava associada à presença do alelo polimórfico (Glu27).

Nos indivíduos portadores da forma homozigota Glu do polimorfismo, houve uma tendência a um menor IMC do que em indivíduos com os outros genótipos. O que difere dos resultados prévios encontrados. Num amplo e elegante estudo, envolvendo 1195 indivíduos, MEIRHAEGHE et al. (1999), investigando o impacto da atividade física na presença do polimorfismo do gene β 2-adrenérgico, demonstraram que, em homens sedentários, a presença da forma selvagem do polimorfismo Gln27 provocava aumento do peso, do índice de massa corporal e ainda do risco para o desenvolvimento da obesidade na ordem de 3,45 (95% CI 1,56-7, 8, $P < 0,002$) quando comparados com a presença do polimorfismo Glu27.

Bogalusa Heart Study, 2002, estudou 1151 indivíduos afro-americanos e caucasianos, homens e mulheres, durante 24 anos na transição de adolescência para a idade adulta, sugerindo uma associação entre polimorfismo no códon 16 para Gly no aumento de peso em relação à Arg, sendo significativamente diferente (20% maior) aos 20 anos, concluindo que o receptor β 2-adrenérgico estaria relacionado ao ganho de peso nos homens entre a fase jovem e a fase adulta. O papel do polimorfismo genético do β 2-adrenérgico no códon 27 e a associação com distúrbios metabólicos na presença de obesidade e diabetes foi avaliado por SHIGEMOTO et al. (1999). Estes autores demonstraram uma maior frequência do alelo Glu27 em pacientes com diabetes tipo 2, porém, após análise de variância com variáveis múltiplas, observaram que havia uma associação da glicemia plasmática avaliada duas horas após ingestão de glicose, com o IMC desses indivíduos, sugerindo que a associação com

diabetes poderia ser secundária à obesidade. Além disso, a presença do alelo Glu27 foi associada a maiores concentrações de triglicérides plasmáticas.

EHRENBORG et al. (2000) estudaram a presença desse polimorfismo em homens suecos e demonstraram que indivíduos com maior IMC tinham uma maior frequência do alelo Glu27, maiores concentrações plasmáticas de colesterol total, triglicérides, e VLDL-colesterol. Outro estudo feito por TILBURG et al. (2003) mostrou que indivíduos com diabetes tipo 2 apresentavam a presença do polimorfismo no receptor β 2-adrenérgico na forma Glu27, assim como um importante aumento no IMC, no controle metabólico e no perfil lipídico.

A presença da forma homozigota do códon 16 (Gly16) provoca aumento da pressão arterial de repouso, atenuação do débito cardíaco e redução de resistência vascular periférica durante a administração de salbutamol (GRATZE G, 1999). A presença da forma homozigota no códon 27 (Glu27) potencializa a resposta vasodilatadora durante a infusão de isoproterenol (COCKCROFT JR, 2000). Mais recentemente, foi demonstrado que a presença da forma homozigota do códon 27 (Glu27) leva a uma exacerbada resposta vasodilatadora muscular durante a infusão de isoproterenol (DISHY, 2001). Estes estudos apontam para a importância dos polimorfismos genéticos nos codons 16 e 27 na resposta vasodilatadora muscular e dessensibilização à infusão de um agonista do receptor β 2-adrenérgico.

PEREIRA et al. (2003) demonstraram que pacientes portadores do polimorfismo nos receptores β 2-adrenérgico no códon 16 (Gly16) apresentam uma elevação maior da pressão arterial sistólica, quando comparada com indivíduos portadores do polimorfismo no códon 27 (Glu27).

Estendendo esse conhecimento para manobras simpatoexcitatórias fisiológicas, EISENACH et al., em 2004, estudando o polimorfismo do gene que codifica o receptor β 2-adrenérgico Arg16 para Gly observou que durante o exercício de *handgrip* os indivíduos que apresentavam esse polimorfismo tinham uma resposta aumentada de pressão arterial no pico de esforço, mediante uma diminuição da resposta vasodilatadora periférica. CASTELLANO et al. (2003) observaram que a presença do polimorfismo do receptor β 2-adrenérgicos para Arg16→Gly estaria associada a uma resposta reativa na modulação da pressão arterial.

Nosso grupo (TROMBETA, 2005), avaliando mulheres homozigotas para Arg16 e Gln27 e mulheres homozigotas para Gly16 e Glu27, demonstrou uma maior responsividade ao estresse mental e ao exercício, em que o aumento do fluxo sanguíneo muscular é uma regra em mulheres homozigotas para Gly16 e Glu27. Estes resultados demonstram que o alelo Glu27 facilita a vasodilatação durante o estresse mental ou exercício físico. Esse achado independe da presença do polimorfismo do códon 16, concluindo que o polimorfismo dos receptores β 2-adrenérgicos homozigotos para Glu27 aumenta a resposta vasodilatadora muscular durante manobras fisiológicas como estresse mental e o exercício físico. Nosso grupo avaliou a presença do polimorfismo dos receptores β 2-adrenérgicos do códon 16 e 27

na perda de peso por meio de dieta isolada e dieta associada ao exercício físico, e observou que os pacientes portadores do polimorfismo Glu27 apresentaram uma maior perda de massa gorda que os não-portadores desse polimorfismo (BATALHA LT, 2003) quando submetidos à intervenção de dieta e treinamento físico. Estes dados demonstram que o exercício facilita uma maior resposta vascular e maior lipólise (TROMBETA, 2005; BATALHA LT 2003).

A compreensão dos aspectos metabólicos, autonômicos e hemodinâmicos associados à obesidade infantil despontam como perspectivas que auxiliarão na prevenção e no tratamento destas complicações. Apesar dos conhecimentos adquiridos em adultos obesos, pouco se sabe a respeito de crianças obesas. Além disso, as respostas fisiológicas em crianças são particulares e diferenciadas, o que inviabiliza a extrapolação dos conhecimentos fisiológicos adquiridos em adultos para crianças (GREGOIRE J, 1996; A.KOLATA G, 1986).

O modelo de estudo proposto utiliza uma ferramenta eficaz para a investigação hemodinâmica, visto que as manobras experimentais apresentam grandes estimulações do controle neurovascular. Também possibilita investigar as possíveis alterações decorrentes das modificações genéticas de polimorfismos dos receptores β_2 -adrenérgicos, com isso modificando a resposta vasodilatadora muscular observada na reação de defesa ou estresse mental.

Por meio deste estudo do polimorfismo do receptor β_2 -adrenérgicos em crianças obesas, poderemos compreender o impacto do polimorfismo na

regulação cardiovascular e metabólica. Diante desta hipótese, é possível inferir que o polimorfismo, nessa população, possa conferir um efeito protetor contra injúrias cardiovasculares e metabólicas.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

1. Testar a hipótese de que a resposta vasodilatadora muscular durante o estresse mental ou durante o exercício estaria aumentada em crianças obesas com polimorfismo no códon 16 e 27 dos receptores β_2 -adrenérgicos.
2. Avaliar a associação da presença do polimorfismo Arg16/Gln27, Gly16/Gln27 e Gly16/Glu27 com a composição corporal, gasto energético basal e alterações metabólicas.

MÉTODOS

3 MÉTODOS

3.1 Seleção dos pacientes

O protocolo de estudo foi aprovado pela Comissão Científica e de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade São Paulo (FMUSP) (ANEXO I). Os pacientes foram informados, detalhadamente, sobre o estudo e, a seguir, foi solicitado ao responsável o consentimento por escrito, ou seja, o "consentimento pós-informado" (ANEXO II).

Foram recrutadas e genotipadas 110 crianças obesas, não aparentadas, que estavam sendo acompanhadas no Ambulatório de Obesidade Infantil do Hospital das Clínicas FMUSP e que não utilizavam medicação de uso crônico. Elas foram avaliadas no Ambulatório de Obesidade Infantil do Hospital das Clínicas FMUSP, e na Unidade de Reabilitação Cardiovascular e Fisiologia do Exercício do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da FMUSP.

O grupo de estudo foi constituído de 40 crianças obesas (14, do sexo masculino e, 26, do sexo feminino); faixa etária variada entre 08 e 12 anos de idade.

As crianças foram subdivididas em três subgrupos de acordo com a genotipagem. A saber:

- grupo 1: 23 crianças obesas portadoras da forma natural homocigota do polimorfismo (Arg16/Gln27);

- grupo 2: 7 crianças obesas portadoras da variante alélica homozigota do polimorfismo (Gly16/27Gln);
- grupo 3: 10 crianças obesas portadoras da variante alélica homozigota do polimorfismo (Gly16/Glu27).

3.2 Avaliação antropométrica

O peso corporal foi aferido por uma escala eletrônica com a criança vestida apenas com roupas leves. A altura medida por um estadiômetro “Harpenden”. Assim, calculamos o IMC para classificação e inserção da criança no protocolo de pesquisa. A circunferência do abdome foi medida com fita plástica não-elástica com 0,7cm de largura, no ponto médio entre a crista ilíaca e o rebordo inferior da última costela. Foram realizadas três medidas consecutivas, sempre pelo mesmo observador, estando o paciente despido e de pé, com braços ligeiramente separados do corpo e em expiração.

Portanto, a determinação do grau de obesidade foi realizada pela correção do IMC e também pelo método LMS descrito por COLE et al. (1990). Este método, chamado de Z score do IMC, consiste no índice de variação do IMC acima dos 95% de cada criança (ANEXOS III e IV), ou seja, quanto que a criança está acima do seu valor de referência do IMC corrigido pela idade e sexo (95%) - (ANEXOS III e IV).

3.3 Avaliação da composição corporal

As crianças foram avaliadas mediante da bioimpedância. Este método foi anteriormente testado e validado quando comparado ao método de medidas de tecidos moles periféricos e centros-regionais por meio das medidas por densitometria *Dual Energy X ray Absortometry* (DEXA) (*HOLOGIC QDR-2000 Densitometer*) (ANEXO V).

3.4 Análise do gasto energético pela calorimetria indireta

A avaliação do metabolismo de repouso nas crianças e adolescentes foi realizada pela manhã, após 12 horas de jejum. Foi utilizado um monitor metabólico (calorímetro) DELTATRAC o qual faz medidas constantes de gases inspirados e expirados para a concentração de oxigênio (O₂) e gás carbônico (CO₂). Com este procedimento, o monitor calcula a queima calórica a partir do equivalente energético.

Foram seguidas as orientações do *Quick Guide, Deltatrac Metabolic Monitor, Detex-Engstrom Finland* quanto ao prévio aquecimento do aparelho, sua calibração e cuidados com o paciente. O paciente ficou em repouso durante 30 minutos, deitado na posição supina antes de ser colocada a campânula transparente ao redor da cabeça e pescoço. Após ser colocada a campânula, foi mantida uma ventilação constante de 40,4 L/min, a qual foi ligada ao monitor por meio de um tubo.

3.5 Avaliação laboratorial

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

3.5.1 Caracterização da resistência à insulina

HOMA-IR: O *Homeostasis Model Assesment* (HOMA) é um modelo matemático que se baseia na interação da glicose com a insulina (MATHEWS, 1985). O HOMA tem sido proposto como um método para avaliar a sensibilidade ou resistência à insulina e função das células β , a partir das concentrações de insulina e glicose de jejum.

A análise da resistência à insulina se faz utilizando a seguinte fórmula: Resistência à insulina (IR) = insulina (μ U/mL) x glicose (mmol/L)/ 22,5 (MATTHEWS, 1985).

Determinação da insulina: A concentração sérica da insulina foi determinada pelo método imunofluorimétrico AutoDELFIA (Wallac Oy, Turku, Finlândia). Os valores são expressos em microunidade por mililitro (uUi/mL) de soro. As análises foram realizadas em duplicata. O coeficiente de variação foi < 6%. A determinação da insulina plasmática foi realizada no laboratório da Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Determinação da glicose: A concentração plasmática de glicose foi determinada em analisador automático, modelo Cobas Integra da Roche, pelo método enzimático colorimétrico hexoquinase. O intervalo de referência considerado para os valores normais de glicemia foi de 70 a 99 mg/dL.

A determinação da glicose plasmática foi realizada no laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.5.2 Análise dos lípides

O sangue foi coletado por punção venosa após jejum de 12 horas, em tubos contendo 25 mM de EDTA. Após a obtenção de plasma por centrifugação a 3.000 rpm durante 10 min a 4°C em centrífuga refrigerada Sorvall RT 6000B (Sorvall Instruments, Du Pont Company, Newton, CT, EUA), foram adicionados os seguintes conservantes: aprotinina 10 mg/mL (5 µL/mL); benzamidina 2 mmol/L (5 µL/mL); e solução de cloranfenicol 0,25% e gentamicina 0,5% (20 µL/mL). A fração HDL do plasma foi obtida após a precipitação das lipoproteínas, contendo apo B (LDL e VLDL) com solução de sulfato de dextrana/cloreto de magnésio (1:1) (100 µL/mL de plasma), e posterior centrifugação a 4°C, 3.000 rpm por 30 min (WARNICK, 1982). O sobrenadante (HDL) e as amostras de plasma total foram armazenados em freezer a -20°C até as análises subseqüentes.

As dosagens de colesterol total (CT), HDL-C e triglicérides (TG) plasmáticas foram realizadas em sistema automatizado COBAS MIRA (F. Hoffmann-La Roche, Basileia, Suíça), utilizando kits enzimáticos comerciais da Roche (Mannheim, Alemanha). A concentração de colesterol nas frações LDL e VLDL foi determinada pela equação de FRIEDWALD, onde $VLDL-C = TG/5$ e $LDL-C = CT - (HDL-C + VLDL-C)$ (FRIEDWALD, 1972).

A determinação dos lípides plasmáticos foi realizada no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.5.3 Determinação da leptina plasmática

As análises foram realizadas em duplicata. O limite mínimo de detecção do ensaio da leptina foi de 2,5 ng/mL. O coeficiente de variação intra-ensaio foi de 2,6%. A concentração sérica da leptina plasmática foi determinada pelo método imunoradiométrico, utilizando o kit de reagente DSL-231000, Inc, Texas, EUA. Os valores foram expressos em nanograma por mililitro (ng/mL). Feitas no laboratório da Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.5.4 Determinação da adiponectina plasmática

Os níveis de adiponectina foram dosados por radioimunoensaio, utilizando-se o kit HADP-61HK, marca Linco Research, Inc. St Charles, Missouri – USA. A determinação da adiponectina foi realizada no Laboratório de investigação Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Lim 25.

3.5.5 Avaliação molecular

3.5.5.1 Extração de DNA

A extração de DNA genômico de leucócitos foi realizada com sangue periférico segundo o método de *Salting Out* de MILLER et al., (1988). Foram coletados 10 mL de sangue venoso em tubos contendo 25 mM EDTA (ácido etilenodiaminotetracético). O *pellet* leucocitário foi obtido a partir da lise dos glóbulos vermelhos, utilizando-se a solução de lise (1mM NH_4HCO_3 , 114 mM

NH₄Cl), com incubação a 4°C por 30 minutos, seguida de centrifugação do material a 4°C por 15 minutos a 3000 rpm (Hettich-Rotina 35R, Alemanha), desprezando-se o sobrenadante. Esse procedimento foi repetido mais uma vez. O botão de glóbulos brancos foi então suspenso em 6 mL de solução de lise de glóbulos brancos (10 mM Tris, 10 mM EDTA, 150 mM de NaCl), 120 µL de SDS 10% (Sigma, St.Louis, MO, EUA), 80 µL de proteinase K (10mg/mL) (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, EUA) e incubada durante 18 horas a 37°C. No dia seguinte, foram adicionados 2,4 mL de NaCl saturado. Agitou-se essa solução vigorosamente por 15 segundos e o material foi centrifugado por 15 min a 3000 rpm. O sobrenadante contendo o DNA desproteinizado foi transferido para um tubo limpo onde foram adicionados 2 volumes de etanol absoluto gelado e homogeneizado cuidadosamente por inversão. O DNA precipitado foi retirado do tubo, lavado duas vezes com etanol gelado a 70% e, posteriormente, com etanol absoluto. Em seguida, foi centrifugado a vácuo (SpeedVac System, Savant ISS100, NY, EUA) durante 5 min e ressuspenso em solução de TE pH 8 (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1mM).

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

3.5.5.2 Amplificação por PCR do segmento de DNA, contendo o códon 27 do receptor β_2 -adrenérgico

A amplificação dos segmentos em termociclador (GeneAmp PCR System 9600, Perkin-Elmer, EUA), contendo o códon 27 do β_2 -adrenérgico, foi realizada em volume de 26 μ L, contendo aproximadamente 300 μ g de DNA, 100 mM de desoxinucleotídeos (DNTP), tampão de PCR (100 mM Tris-HCl, 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl, pH 8,3), 10% DMSO, 20 pmol de cada amplímeros (direto, 5'-GGCCCATGACCAGATCAGCA-3', e reverso 5'-GAATGAGGCTTCCAGGCGTC-3'), e 1 unidade de Taq DNA polimerase.

A PCR iniciou com denaturação a 94°C por 4 min, seguidos por 30 ciclos de denaturação (94°C, 1 min), hibridação (63°C, 1 min), e extensão (72°C, 1 min), com uma extensão final a 72°C por 10 min. O produto de PCR de 353 pb foi digerido a 37°C por 2 h com 2 U de enzima de restrição *Fnu4HI*. O produto de digestão foi introduzido em gel a 3% (50% agarose ultrapura e 50% Nusieve) com tampão TBE (89 mM Tris-Borato, 2 mM EDTA) e visualizado em sistema de documentação de imagens GelDoc System 1000 (Bio Rad, Califórnia, EUA) após coloração com brometo de etídio. Os fragmentos de produtos de digestão apresentaram bandas de 27, 55, 97 e 174 pb no homozigotos Gln27; 27, 55, 97, 174 e 229 pb no heterozigoto Gln27Glu27; e 27, 97 e 229 pb no homozigotos Glu27.

3.5.5.3 Amplificação por PCR do segmento de DNA, contendo o códon 16 do receptor β_2 -adrenérgico.

A amplificação por PCR do segmento de DNA, contendo códon 16 do gene do receptor β_2 -adrenérgico, foi realizada de forma semelhante ao códon 27, porém utilizando o “primer” senso 5'-CTTCTTGCTGGCACGCAAT-3' e o “primer” antisenso 5'-CCAGTGAAGTGATGAAGTAGTTGG-3'. O produto de amplificação foi digerido a 60°C por 1 hora com 2 U de BsrDI. O fragmento foi visualizado em gel de agarose Meta-Phor agarose 3% e visualizado pelo mesmo procedimento que o polimorfismo do códon 27. A digestão produziu fragmentos dos tamanhos: 14, 56 e 131 pb nos homocigotos Arg16; 14, 23, 56, 108 e 131 pb heterocigotos Arg16Gly16; e 14, 23, 56, e 108 pb nos homocigotos Gly16.

3.6 Protocolo experimental

3.6.1 Experimento 1: efeito agudo do exercício isométrico na reatividade vascular

Antes do início do protocolo de exercício isométrico (RAY, 1993), a criança foi colocada na posição supina e, a seguir, foi determinada sua contração voluntária máxima após três tentativas de contração máxima (no braço dominante) em um dinamômetro de preensão de mão. Em seguida, calculou-se 30% da contração voluntária máxima. Após três minutos de repouso (registros basais), o indivíduo realizou três minutos de exercício isométrico moderado de preensão de mão, a 30% da contração voluntária

máxima, para ativação do comando central, dos mecanorreceptores periféricos e metaborreceptores musculares. Durante todo o protocolo de exercício isométrico foram feitos os registros simultâneos da frequência cardíaca, da pressão arterial e do fluxo sanguíneo muscular.

3.6.2 Experimento 2: reatividade vascular durante estresse mental

O protocolo de estresse mental foi realizado mediante teste de cores (*Stroop color word test*) (STROOP, 1935; MIDDLEKAUFF, 1997). O estresse mental consiste de uma tabela que possui uma série de nomes de cores, escritos com uma tinta diferente daquela do significado da palavra. Foi pedido para o participante identificar a cor da tinta, e não ler a palavra. Por meio do teste de cores, as crianças foram estimuladas a dizer em voz alta e o mais rápido possível, sendo advertido gentilmente quando erravam as palavras.

Este procedimento foi realizado da seguinte maneira: três minutos de registro basal, seguidos de quatro minutos de teste das cores. Ao final do teste, foi perguntado a cada indivíduo o grau de dificuldade do teste de cores.

Durante todo o protocolo de estresse mental, foram feitos os registros, simultaneamente, da frequência cardíaca, da pressão arterial e do fluxo sanguíneo muscular.

3.7 Métodos de avaliação

3.7.1 Avaliação da frequência cardíaca

A frequência cardíaca foi obtida pelo registro eletrocardiográfico. O sinal do eletrocardiograma foi adquirido em um computador e, em seguida, analisado por um programa específico (AT/CODAS), numa frequência de 500 Hz.

3.7.2 Avaliação da pressão arterial

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

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

3.7.3 Avaliação do fluxo sanguíneo muscular

O fluxo sanguíneo muscular foi avaliado pela técnica de pletismografia de oclusão venosa. O braço contra-lateral (aquele que não estava realizando o exercício isométrico) foi elevado acima do nível do coração para garantir uma adequada drenagem venosa. Um tubo silástico preenchido com mercúrio, conectado a um transdutor de baixa pressão e a um pletismógrafo, foi colocado ao redor do antebraço, a 5 cm de distância da articulação úmero-radial e conectado a um pletismógrafo. Um manguito foi colocado ao redor do pulso e, outro, na parte superior do braço. O manguito do pulso foi inflado a um nível supra-diastólico 1 minuto antes de se iniciar as medidas. Em intervalos de 15 segundos, o manguito do braço foi inflado acima da pressão venosa por um período entre 7 e 8 segundos. O aumento em tensão no tubo silástico refletiu o aumento de volume do antebraço e, conseqüentemente, sua vasodilatação.

3.7.4 Avaliação da condutância vascular do antebraço

A condutância foi calculada pela divisão do fluxo sanguíneo no antebraço (ml/min/100ml) pela pressão arterial média (mmHg).

3.8 Seqüência experimental

Visita n° 1:

- anamnese;
- exame Físico;
- ECG de Repouso;
- solicitação de Exames Complementares;
- orientação ao Paciente;
- termo de Consentimento Informado.

Visita n° 2:

- protocolo experimental: Avaliação do fluxo sangüíneo muscular, da pressão arterial, da freqüência cardíaca e da variabilidade da frequência cardíaca, e o fluxo respiratório.

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

Os dados das características antropométricas e metabólicas, e os dados basais do fluxo sanguíneo muscular condutância vascular no antebraço, juntamente aos dados da pressão arterial média e da frequência cardíaca dos três grupos foram submetidos à análise de variância de um caminho (*one-way ANOVA*) para amostras repetidas.

A análise de variância de dois fatores para medidas repetidas (*two-way ANOVA*) foi utilizada para: análise do comportamento das variáveis hemodinâmicas durante o estresse mental e o exercício isométrico. Em casos de F significativa, foram realizadas comparações *post-hoc de Scheffè*, com nível de significância aceito de $P < 0.05$.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

As crianças obesas foram genotipadas para o códon 16 e 27. Os alelos que codificam Arg16, Gly16, Gln27, e Glu27 foram identificados para determinação dos grupos de estudo. Após todas as avaliações, foram selecionadas aquelas participantes que, de acordo com suas características genéticas, comporiam os três grupos. Das 40 participantes do estudo, 57% compôs o primeiro grupo, isto é, 23 crianças obesas sedentárias homozigotas para os alelos Arg16 e Gln27 (forma selvagem); 15% compôs o segundo grupo, constituído por 07 crianças obesas sedentárias homozigotas para os alelos Gly16 e Gln27, portanto, portadoras de polimorfismo apenas para o códon 16 e, no terceiro grupo, 27% (10 crianças obesas) portadoras de polimorfismo na forma homozigota para o alelo Gly16 e Glu27.

5.1 Dados basais antropométricos e metabólicos

Nas tabelas 1, 2 e 3 e anexos podemos avaliar os dados antropométricos, metabólicos, hemodinâmicos e neurovasculares das crianças obesas com cada um dos haplotipos (Arg16Gln27, Gly16Gln27 e Gly16Glu27). A idade média foi semelhante nos três grupos Arg16Gln27, Gly16Gln27 e Gly16Glu27 ($10,2 \pm 0,2$ vs. $10,7 \pm 0,4$ vs. $9,7 \pm 0,2$ anos, respectivamente). Os três subgrupos estudados, de acordo com o haplotipo, não conferiram às crianças obesas, diferenças significantes quanto:

- à antropometria (peso, altura, IMC, Z-score, cintura abdominal, massa magra, massa gorda, gasto energético basal e coeficiente respiratório);
- às variáveis metabólicas (glicemia, área da glicemia, colesterol total e frações, leptina, insulina, área da insulina, adiponectina, triglicérides, e HOMA-IR);
- às variáveis hemodinâmicas e neurovasculares (frequência cardíaca, pressão arterial média, fluxo sanguíneo antebraço, e condutância vascular do antebraço).

Tabela 1- Características antropométricas dos indivíduos de acordo com os haplotipos

	Arg16Gln27 (n=23)	Gly16Gln27 (n=7)	Gly16Glu27 (n=10)	P
Idade (anos)	10,2 ± 0,2	10,7 ± 0,4	9,7 ± 0,2	0,38
Peso (Kg)	64±1,7	68±5,9	63±4,3	0,13
Altura (cm)	1,46±1,6	1,47±3,4	1,43±2,6	0,19
IMC (Kg/m ²)	30±1,0	30±1,8	31±3,0	0,42
Zscore (BMI)	2.4±0,0	2.4±0,1	2.6±0,1	0,86
CA (cm)	96,3±0.3	96,7±0.4	94,0±0,4	0,25
M.Magra (Kg)	38,8±1,0	40,6±2,1	38,7±2,1	0,39
M.Gorda (Kg)	23,5±1,2	24,1±1,2	22,5±3,6	0,59
GEB	1379,0±38,2	1490,0±117,5	1229,0±35,8	0,58
CR	0,86±0,1	0,86±0,1	0,89±0,1	0,60

Valores são média ± EP

IMC= índice de massa corporal; CA= cintura abdominal; GEB= gasto energético basal; CR= coeficiente respiratório.

Tabela 2- Dados bioquímicos nos três grupos de acordo com os haplotipos

	Arg16/Gln27 (n=23)	Gly16/Gln27 (n=07)	Gly16/Glu27 (n=10)
<i>Parâmetros Metabólicos</i>			
Colesterol total (mg/dl)	174±8,1	168±17,3	171±7,7
LDL-Colesterol (mg/dl)	104,3±6,9	99,2±16,2	97,1±7,9
HDL-Colesterol (mg/dl)	42,8±1,5	41,5±3,1	38,7±2,1
Triglicérides (mg/dl)	98,9±8,6	104,9±8,6	106,9±11,9
Glicose (mg/dl)	87,0±1,7	92,9±4,6	89,5±2,1
Área de glicemia (mg/dL/120min)	11938,0±857,1	13175,07±576,1	12301,5±1399,6
HOMA (score)	3,7±0,4	4,5±1,8	4,3±0,5
Leptina (ng/mL)	49,5±4,1	53,9±6,5	50,2±8,0
Adiponectina (µL/mL)	10,6±0,8	8,8±1,1	9,8±0,8
Insulina (µU/mL)	17,2±1,5	20,3±2,7	19,5±,6
Área de insulina (µUI/mL/120 min)	9051,0± 1278,3	12215,0±1588,2	12439,1±3127,5

Valores são média ± EP
Vs $P > 0.05$

Tabela 3- Dados basais de pressão arterial média, fluxo sanguíneo muscular, condutância vascular do antebraço e frequência cardíaca nos três grupos de acordo com os haplotipos

	Arg16/Gln27 (n=23)	Gly16/Gln27 (n=07)	Gly16/Glu27 (n=10)
Parâmetros Hemodinâmicos			
PAM (mmHg)	80±2	78±3	84±3
FC (bpm)	81±4	76±4	85±5
Parâmetros Neurovasculares			
FSM (ml/min/100ml)	2,57±0,2	2,31±0,1	2,60±0,2
CVA (unidades)	3,4±0,1	3,1±0,2	3,7±0,3

Valores são média ± EP. PAM = pressão arterial média; FSM = fluxo sanguíneo muscular; CVA = condutância vascular do antebraço; FC = frequência cardíaca. Verso basal, $P > .05$

5.2 Resposta hemodinâmica

5.2.1 Exercício isométrico a 30%

Os valores referentes às respostas hemodinâmicas de Pressão arterial média e frequência cardíaca durante o exercício isométrico a 30% da contração voluntária máxima aumentaram nos três grupos estudados, independentemente do genótipo dos receptores β_2 -adrenérgicos, e estão representados na TABELA 4. Como esperado, o Fluxo Sanguíneo muscular aumentou durante o exercício isométrico. Entretanto, a resposta de Fluxo Sanguíneo muscular em valores absolutos foi significativamente maior nos homozigotos para Gly16 e Glu 27 que nos homozigotos para Arg16 e Gln27 ou homozigotas para Gly16 e Gln27 (Figura 1). Não houve diferença

significativa entre homozigotos para Arg16 e Gln27 ou homozigotas para Gly16 e Gln27.

Tabela 4 - Respostas hemodinâmicas durante o exercício isométrico no grupo de crianças obesas homozigotas para Arg16Gln27, Gly16Gln27 e Gly16Glu27.

		Exercício (30% CVM)			
		Basal	1 min	2 min	3 min
PAM (mmHg)	Arg16Gln27	80±3,3	84±3,4	90±3,5*	95±3,3*
	Gly16Gln27	78±3,6	83±4,4	91±6,0*	94±5,2*
	Gly16Glu27	76±2,4	77±2,7	83±2,4*	88±3,0*
FC (bpm)	Arg16Gln27	79±2,9	82±3,3	87±3,9*	89±3,2*
	Gly16Gln27	76±4,0	79±4,2	79±4,7	84±5,0*
	Gly16Glu27	82±2,5	84±2,0	87±1,7*	90±1,8*

Valores são média ± EP. PAM= pressão arterial média; FC= frequência cardíaca.

* $P < 0.05$ vs Basal.

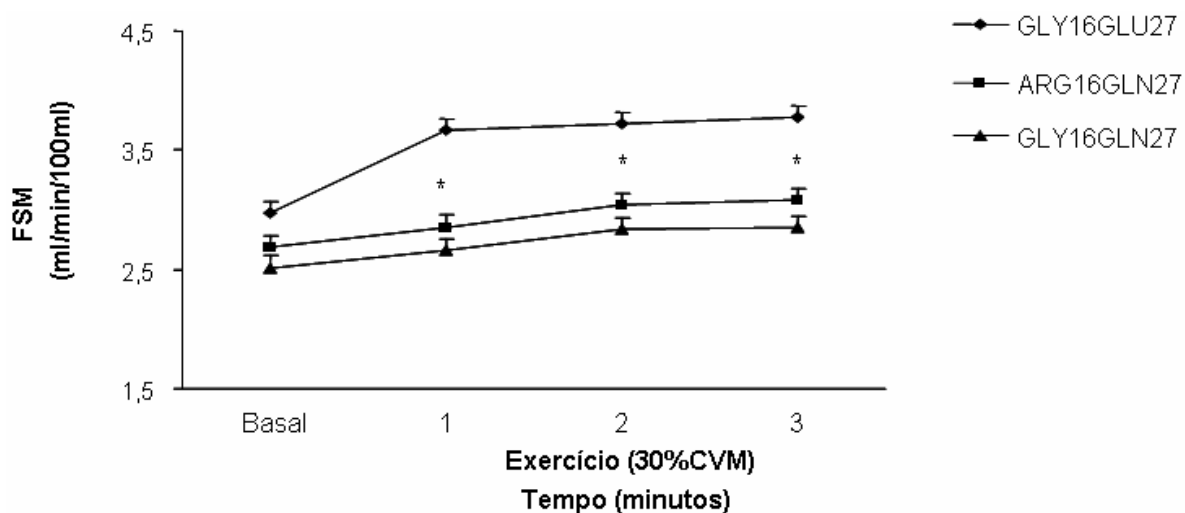


FIGURA 1 -Valores absolutos de fluxo sanguíneo muscular (FSM) durante o exercício de pressão de mão a 30% da contração voluntária máxima (CVM) em Crianças obesas homocigotas para Arg16Gln27, Gly16Gln27 e Gly16Glu27. Note que durante o exercício físico a resposta FSM está significativamente aumentada em Crianças obesas homocigotas para Gly16Glu27 quando comparada com Crianças obesas homocigotas para Arg16Gln27 ou Gly16Gln27.

* Gly16Glu27 vs. Arg16Gln27 ou Gly16Gln27, $P < 0.05$.

Resultados semelhantes foram encontrados na condutância vascular do antebraço. A magnitude do aumento da condutância vascular do antebraço foi significativamente maior nos homocigotos para Gly16 e Glu 27 que nos homocigotos para Arg16 e Gln27 ou homocigotos para Gly16 e Gln27 (Figura 2). Não houve diferença significativa entre homocigotos para Arg16 e Gln27 ou homocigotas para Gly16 e Gln27.

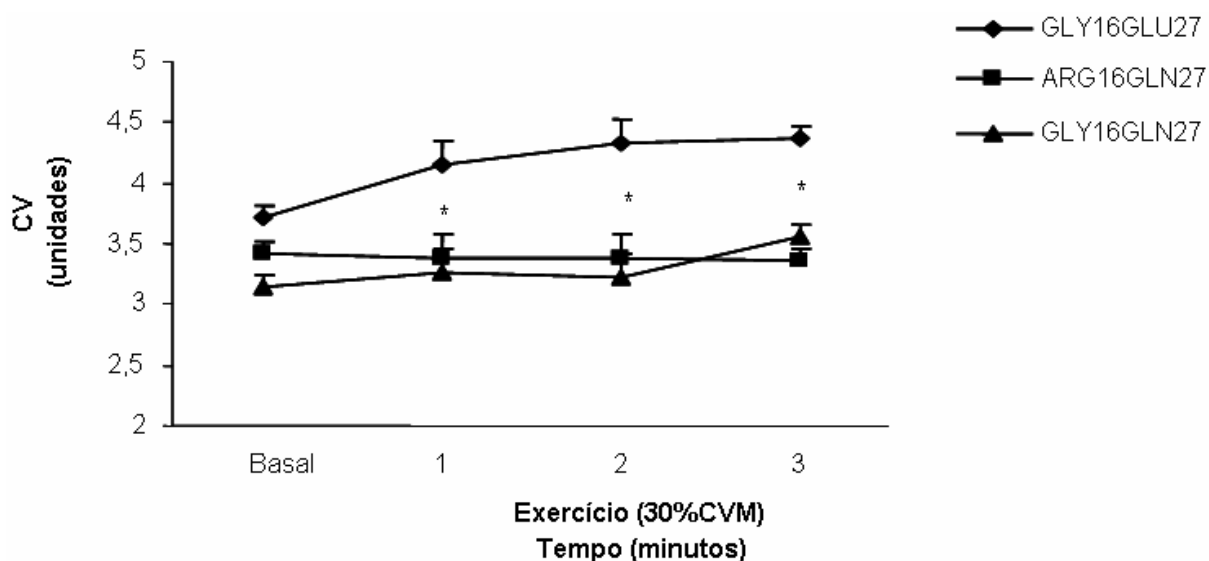


FIGURA 2 -Valores absolutos da Condutância Vascular do antebraço (CV) durante o exercício de pressão de mão a 30% da contração voluntária máxima (CVM) em Crianças obesas homozigotas para Arg16Gln27, Gly16Gln27 e Gly16Glu27. Note que durante o exercício físico a resposta CV está significativamente aumentada em Crianças obesas homozigotas para Gly16Glu27, quando comparada com Crianças obesas homozigotas para Arg16Gln27 ou Gly16Gln27.

* Gly16Glu27 vs. Arg16Gln27 ou Gly16Gln27, $P < 0.05$.

5.2.2 Estresse mental

Os valores referentes às respostas hemodinâmicas de pressão arterial média e frequência cardíaca durante o estresse mental aumentaram nos três grupos estudados, independentemente do genótipo dos receptores β_2 -adrenérgicos e estão representados na TABELA 5. Como esperado, o fluxo sanguíneo muscular aumentou durante o estresse mental. Entretanto, a resposta de fluxo sanguíneo muscular em valores absolutos foi significativamente maior nos homozigotos para Gly16 e Glu 27 que nos

homozigotos para Arg16 e Gln27 ou homozigotos para Gly16 e Gln27 (Figura 3). Não houve diferença significativa entre homozigotos para Arg16 e Gln27 ou homozigotos para Gly16 e Gln27.

Tabela 5 - Respostas hemodinâmicas durante o estresse mental no grupo de crianças obesas homozigotas para Arg16Gln27, Gly16Gln27 e Gly16Glu27.

		Stresse Mental				
		Basal	1 min	2 min	3 min	4 min
PAM (mmHg)	Arg16Gln27	80±2,3	82±3,1	88±2,5*	88±2,2*	90±2,4*
	Gly16Gln27	77±1,4	83±1,7*	84±1,9*	85±1,7*	84±2,3*
	Gly16Glu27	81±3,5	84±3,5	88±3,0*	90±2,9*	90±2,4*
FC (bpm)	Arg16Gln27	81±4,7	85±4,0	85±4,0	87±4,2*	83±4,0
	Gly16Gln27	72±2,3	85±4,0*	85±4,2*	87±4,3*	85±3,8*
	Gly16Glu27	85±5,3	87±5,7	87±5,7	88±5,7	90±5,6*

Valores são média ± EP. PAM= pressão arterial média; FC= frequência cardíaca.

* $P < 0.05$ vs basal.

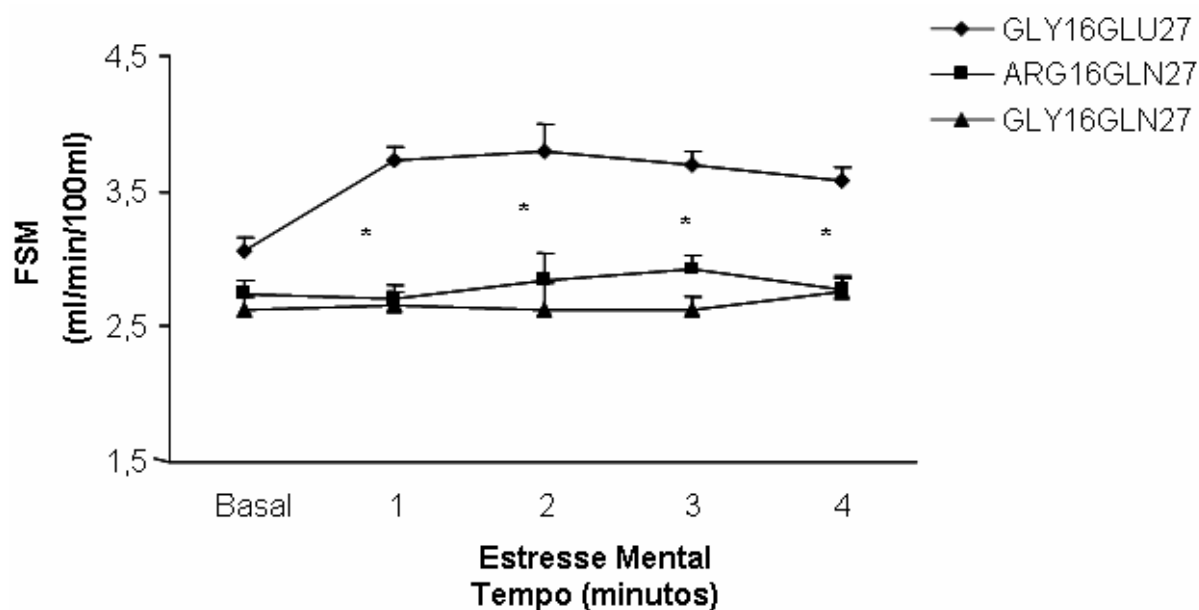


FIGURA 3 - Valores absolutos de fluxo sangüíneo muscular (FSM) durante o estresse mental em Crianças obesas homozigotas para Arg16Gln27, Gly16Gln27 e Gly16Glu27. Note que durante o exercício físico a resposta FSM está significativamente aumentada em Crianças obesas homozigotas para Gly16Glu27 quando comparada com Crianças obesas homozigotas para Arg16Gln27 ou Gly16Gln27.

* Gly16Glu27 vs. Arg16Gln27 ou Gly16Gln27, $P < 0.05$.

Resultados semelhantes foram encontrados na condutância vascular do antebraço. A magnitude do aumento da condutância vascular do antebraço foi significativamente maior nos homozigotos para Gly16 e Glu 27 que nos homozigotos para Arg16 e Gln27 ou homozigotos para Gly16 e Gln27 (Figura 4). Não houve diferença significativa entre homozigotos para Arg16 e Gln27 ou homozigotas para Gly16 e Gln27.

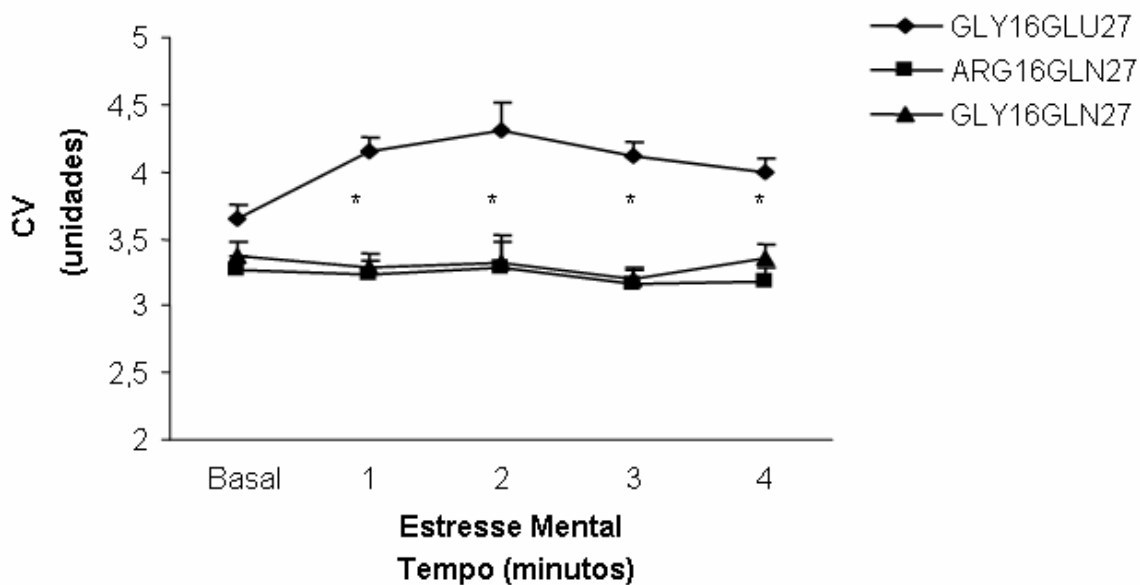


FIGURA 4 - Valores absolutos da Condutância Vascular do antebraço (CV) durante o estresse mental em Crianças obesas homozigotas para Arg16Gln27, Gly16Gln27 e Gly16Glu27. Note que durante o exercício físico a resposta CV está significativamente aumentada em crianças obesas homozigotas para Gly16Glu27 quando comparada com Crianças obesas homozigotas para Arg16Gln27 ou Gly16Gln27.

* Gly16Glu27 vs. Arg16Gln27 ou Gly16Gln27, $P < 0.05$.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou o aumento da resposta vasodilatadora reflexa, durante manobras fisiológicas como estresse mental ou exercício moderado, em crianças obesas homozigotas para os alelos Gly16 e Glu27 do receptor β_2 -adrenérgico.

A modulação das formas polimórficas de receptores β_2 -adrenérgicos na resposta a agonistas exógenos β -adrenérgicos foi previamente descrita por outros investigadores (GREE, 1994, 1995). Esta modulação foi também observada na resposta vascular sistêmica em indivíduos que apresentavam os haplotipos Arg16Arg do receptor β_2 -adrenérgico. A infusão de salbutamol resultou em um maior aumento do débito cardíaco e maior diminuição na resistência vascular periférica (GRATZE, 1999). A infusão intra-arterial ou intravenosa de isoproterenol provocou uma maior resposta vasodilatadora no antebraço ou maior responsividade vascular na mão em indivíduos com genótipo homozigoto para Glu27 (COCKCROFT, 2000).

O estudo atual estende esse conhecimento sobre a relevância do polimorfismo no receptor β_2 -adrenérgico para crianças obesas durante manobras simpatoexcitatórias fisiológicas. Nossos resultados sugerem a forma do receptor homozigoto para Glu27 aumenta a resposta vasodilatadora durante o estresse mental ou exercício isométrico, pois o fluxo sanguíneo muscular é menor em crianças obesas que não apresentam polimorfismos homozigóticos para Gly16 e Gln27. Essa resposta independe do polimorfismo que codifica receptor β_2 -adrenérgico para o códon 16. Estes

achados demonstram a importância de se levar em consideração o haplotipo e não um polimorfismo isolado, quando se estuda manobra fisiológica em humanos. A importância do haplotipo foi previamente descrita durante estímulo exógeno (GREEN, 1994). Neste estudo, após exposição ao agonista β_2 -adrenérgico isoproterenol, houve uma completa resistência a dessensibilização do receptor polimórfico Gln27→Glu; comparado à forma natural. Houve também um maior dessensibilização do receptor com o polimorfismo no códon 16 Arg16→Gly e nos receptores com a presença dos dois polimorfismos Gln27→Glu + Arg16→Gly, demonstrando que a presença de polimorfismo na forma homozigota, provoca ausência de dessensibilização frente a uma estimulação prolongada com um agonista do receptor β_2 -adrenérgico.

TROMBETTA et al. (2005) encontraram resultados similares aos nossos, no fluxo sanguíneo muscular durante o estresse mental e exercício em mulheres obesas, portadoras das três formas do polimorfismo no receptor β_2 -adrenérgico. Neste estudo, a responsividade vasodilatadora aumentada durante manobras simpatoexcitatórias em mulheres homozigotas para Gly16 e Glu27 era mediada pelos receptores β_2 -adrenérgicos. Usando a administração intra-arterial de propanolol, um antagonista do receptor β_2 -adrenérgico, ambos os grupos igualaram a resposta de FSM e CVA no estresse mental, mostrando que realmente é a presença do polimorfismo no receptor β_2 -adrenérgico que leva a um aumento exacerbado do fluxo sanguíneo e da condutância durante essa manobra. Resultados de estudos anteriores (STEIN, 1995) dão suporte à noção de que os receptores β_2 -

adrenérgicos modulam a responsividade vascular do antebraço aumentada durante modulação nervosa simpática semelhante. Neste estudo, a administração intra-arterial de isoproterenol provocou maior vasodilatação no antebraço em indivíduos normotensos do que em pacientes hipertensos pareados por idade, independentemente do fato de que os dois grupos tinham *spillover* de noradrenalina semelhantes.

No presente estudo, há pelo menos duas convincentes razões para acreditar que a responsividade vasodilatadora aumentada durante manobras simpatoexcitatórias em crianças obesas homozigotas para Gly16 e Glu27 é mediada pelos receptores β 2-adrenérgicos. Primeiro, desde que os indivíduos dos três grupos eram homogêneos em relação ao sexo, idade, e Z-score do índice de massa corporal, é improvável que o aumento na resposta vasodilatadora nos indivíduos homozigotos para Gly16 e Glu27 seja devido a uma maior ação colinérgica e/ou por produção de óxido nítrico/endotélio-dependente. Segundo, o aumento de fluxo sanguíneo em crianças obesas homozigotas para Gly16 e Glu27 é, de fato, devido a uma mudança no tônus vascular, ao invés de ajuste hemodinâmico. A resposta de frequência cardíaca, que é o principal componente de aumento do débito cardíaco durante o estresse mental ou o exercício isométrico em humanos (FREYCHUSS, 1988), foi semelhante entre os três grupos estudados. Da mesma maneira, a resposta da pressão arterial foi comparável entre homozigotos Gly16 e Glu27, Arg16 e Gln27 ou Gly16 e Gln27. Estas respostas demonstram que o débito cardíaco e a pressão de perfusão não estavam aumentados nos homozigotos Gly16 e Glu27. Adicionalmente, a

condutância vascular no antebraço, a qual depende dos níveis de fluxo sanguíneo e de pressão arterial, estava significativamente aumentada nas crianças obesas para Gly16 e Glu27.

Independentemente do fato que estudos anteriores (KOTANKO, 1997; TIMMERMAN, 1998) terem ligado a troca da variante de Arg→Gly dos receptores β_2 -adrenérgicos no códon 16 com um aumento nos níveis de pressão arterial em humanos, nossos achados mostram semelhança na pressão arterial de repouso entre as crianças obesas Gly16 e Glu27, Arg16 e Gln27 ou Gly16 e Gln27. De fato, em estudo anterior (DISHY, 2001), no qual foram investigados os mesmos haplotipos, não foram encontradas diferenças nos níveis de pressão arterial sistólica ou diastólica. PEREIRA et al. (2003) demonstraram que pacientes portadores do polimorfismo nos receptores β_2 -adrenérgico no códon 16 (Gly16) tinha maior valor na pressão arterial sistólica, do que indivíduos portadores do polimorfismo no códon 27 (Glu27).

Contudo, um estudo mais definitivo sobre este assunto ainda precisa ser conduzido. É possível que um estudo com monitorização da pressão arterial por longo período aumente o nosso entendimento sobre as relações dos aminoácidos na forma homozigota que codificam os codons 16 e 27 e a pressão arterial.

O receptor β_2 -adrenérgico é considerado muito importante na regulação dos estoques de energia por ser o principal receptor lipolítico em seres humanos. Alguns polimorfismos genéticos desses receptores e suas influências na fisiopatologia da obesidade vêm sendo estudados. LARGE et

al. (1997) estudaram os polimorfismos dos codons 16 e 27 do receptor β_2 -adrenérgico em um grupo de mulheres suecas obesas e de peso normal, e demonstraram uma associação entre obesidade e a presença do alelo Glu27 estavam presente, apenas em mulheres obesas. Este grupo de mulheres apresentava uma frequência sete vezes maior da variante alélica do polimorfismo, Glu27, quando comparado a um grupo de não-obesas (23% x 3%), um *odds ratio* de 10 e um risco relativo aproximado de sete vezes em desenvolver obesidade.

A presença do polimorfismo comum no códon 27 (Glu27) do receptor β_2 -adrenérgico tornou esse gene um importante candidato na gênese da obesidade humana. Há associação do polimorfismo com maior adiposidade (LARGE, 1997; SHIGEMOTO, 1999; MOORE, 2001); entretanto, esses resultados são controversos e parecem sofrer influências da etnia, da população estudada, do sexo, do grau de obesidade e de fatores ambientais (MOORE, 2001, ARNER, 2001). Nós investigamos também a influência da presença ou não, destes polimorfismos no fenótipo das crianças obesas. O fato de que em crianças obesas com a presença ou não desses polimorfismos no receptor β_2 -adrenérgico não influiu na composição corporal, no metabolismo de repouso e no coeficiente respiratório, podendo sugerir que estas variações desse alelo não impactaram no momento a associação com a composição corporal das crianças obesas, e que poderá contribuir para obesidade, com a influência do tempo.

ROSMOND et al., 2000, demonstraram que, indivíduos portadores do alelo polimórfico (Glu27) poderiam apresentar uma associação com

concentrações elevadas de leptina e de triglicérides plasmáticos. MARTINEZ et al. (2003) também demonstrou que mulheres obesas portadoras do alelo polimórfico (Glu 27) tinham maiores concentrações plasmáticas de triglicérides e insulina com maior risco de obesidade, quando comparadas ao grupo de mulheres magras com a mesma variante.

No nosso estudo, não encontramos diferenças metabólicas basais, na leptina, nos valores de adiponectina, insulina, glicose plasmáticas, na resistência insulina (HOMA-IR), em crianças obesas homozigotas para Gly16/Glu27 comparadas com os grupos de crianças obesas Gly16/Gln27 e Arg16/Gln27. Evidenciando assim, que a influência das variantes alélicas não promoveu adaptações metabólicas basais nestas crianças obesas. A associação entre o polimorfismo de Glu27 do receptor β_2 -adrenérgico e a intolerância à glicose, já descrita em populações diferentes (ISHIYAMA-SHIGEMOTO, 1999; CARLSSON, KAWAMURA, 2001) embora, nenhum efeito em crianças obesas tenha sido relatado.

Alguns autores também sugerem que haveria um aumento da lipólise nos indivíduos portadores do polimorfismo no receptor β_2 -adrenérgico e; conseqüentemente, de TG plasmáticos e insulina (SHIGEMOTO, 1999). Outros autores sugerem que haveria uma piora na lipólise com conseqüente acúmulo de gordura (MORI et al., 1999) e na oxidação de gordura (MACHO-AZCARATE, 2002), Também não houve mudança no perfil lipídico basal das crianças obesas homozigotas para Gly16/Glu27 comparadas com os grupos de crianças obesas Gly16/Gln27 e Arg16/Gln27 não obtiveram diferenças nas concentrações plasmáticas de colesterol, TG, HDL-c e LDL-c. Os

mecanismos que levam à associação do polimorfismo no perfil lipídico ainda são controversos.

Na conclusão, nossos resultados obtidos em crianças obesas suportam que o polimorfismo do receptor β_2 -adrenérgico homozigoto para Gly16/Glu27 favorece a uma maior resposta vasodilatadora durante manobras fisiológicas; é razoável pensar que crianças obesas portadoras desse polimorfismo estariam mais protegidas de acometimentos cardiovasculares.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

1. O polimorfismo dos receptores β_2 -adrenérgicos com genótipo homozigoto para Glu27 aumenta a responsividade vasodilatadora ao estresse mental e exercício em crianças obesas. Estes achados são evidências importantes da modulação genética dos receptores β_2 -adrenérgicos na regulação cardiovascular durante manobras fisiológicas em humanos.

2. A presença do polimorfismo no receptor β_2 -adrenérgico em crianças obesas para Arg16/Gln27, Gly16/27Gln e Gly16/Glu27 não influenciou na composição corporal, gasto energético e no perfil metabólico em condições basais.

ANEXOS

ANEXO I – Termo de Aprovação da Comissão Científica e de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade São Paulo (FMUSP)



APROVAÇÃO

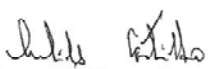
A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 13.04.05, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1096/04**, intitulado: **"Avaliação da resposta vasodilatadora em crianças obesas portadoras de polimorfismo dos receptores β 2-adrenérgicos"** apresentado pelo Departamento de **CLÍNICA MÉDICA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

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

Pesquisador(a) Responsável: **Profa. Dra. Sandra Mara Ferreira Villares**

Pesquisador(a) Executante: **Sr. Alexandre Galvão da Silva**

CAPPesq, 13 de Abril de 2005.


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

ANEXO II – Consentimento pós-informado.

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL****1. NOME DO PACIENTE**

.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO..... Nº..... APTO:
BAIRRO:..... CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD(.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

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

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA : **EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO NO CONTROLE AUTÔNOMICO E NAS VARIÁVEIS HEMODINÂMICAS DE CRIANÇAS OBESAS**

PESQUISADOR: Prof. Dr. Carlos Eduardo Negrão

CARGO/FUNÇÃO: Diretor da Unidade de Reabilitação Cardiovasculares e Fisiologia do Exercício

UNIDADE DO HCFMUSP: InCor

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

	SEM RISCO	RISCO MÍNIMO X	RISCO MÉDIO
	RISCO BAIXO	RISCO MAIOR	

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

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 36 meses

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

1. **Justificativa e Objetivos da Pesquisa:** O Sr ou Sra, pai/mãe ou responsável pelo menor, está sendo convidado a autorizar o seu filho a participar de uma pesquisa que visa estabelecer a efetividade de tratamento para a obesidade infantil. Estaremos pesquisando os efeitos do treinamento físico associado a dieta hipocalórica em crianças e adolescente portadores de obesidade.

2. Procedimentos:

Pletismografia: serão colocados dois manguitos, semelhantes ao aparelho de pressão, um no braço e um no punho, para medição da quantidade de sangue que vai passar pelo braço durante o exame.

Eletrocardiografia: serão colocados eletrodos no peito para controlar os batimentos do coração.

Finapress: será colocado um medidor de pressão no dedo médio da mão para se medir continuamente a pressão arterial.

Cinta Respiratória: será colocada uma cinta logo abaixo de peito para se registrar continuamente a respiração.

3. Desconfortos e Riscos:

Pletismografia: não há riscos, embora o manguito no punho fique inflado continuamente durante o exame, ocluindo a circulação do sangue para a mão o que provoca um leve desconforto. **Eletrocardiografia:** não há riscos. **Finapress:** não há riscos. **Cinta Respiratória:** não há riscos.

3. Benefícios que poderão ser obtidos:

Para você: Possibilidade de tratar a obesidade. Associar dieta hipocalórica à atividade física, proporcionando mudanças no hábito da vida diária. Para os pesquisadores: Conhecimento de novas formas de tratamento na Obesidade Infantil.

5. Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo: Nenhum

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

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e retirar o seu filho da participação do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.
5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

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

Carlos Eduardo Negrão, Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 44 - AB; F: (011) 3069 5043

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

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

São Paulo, de de 2001.

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

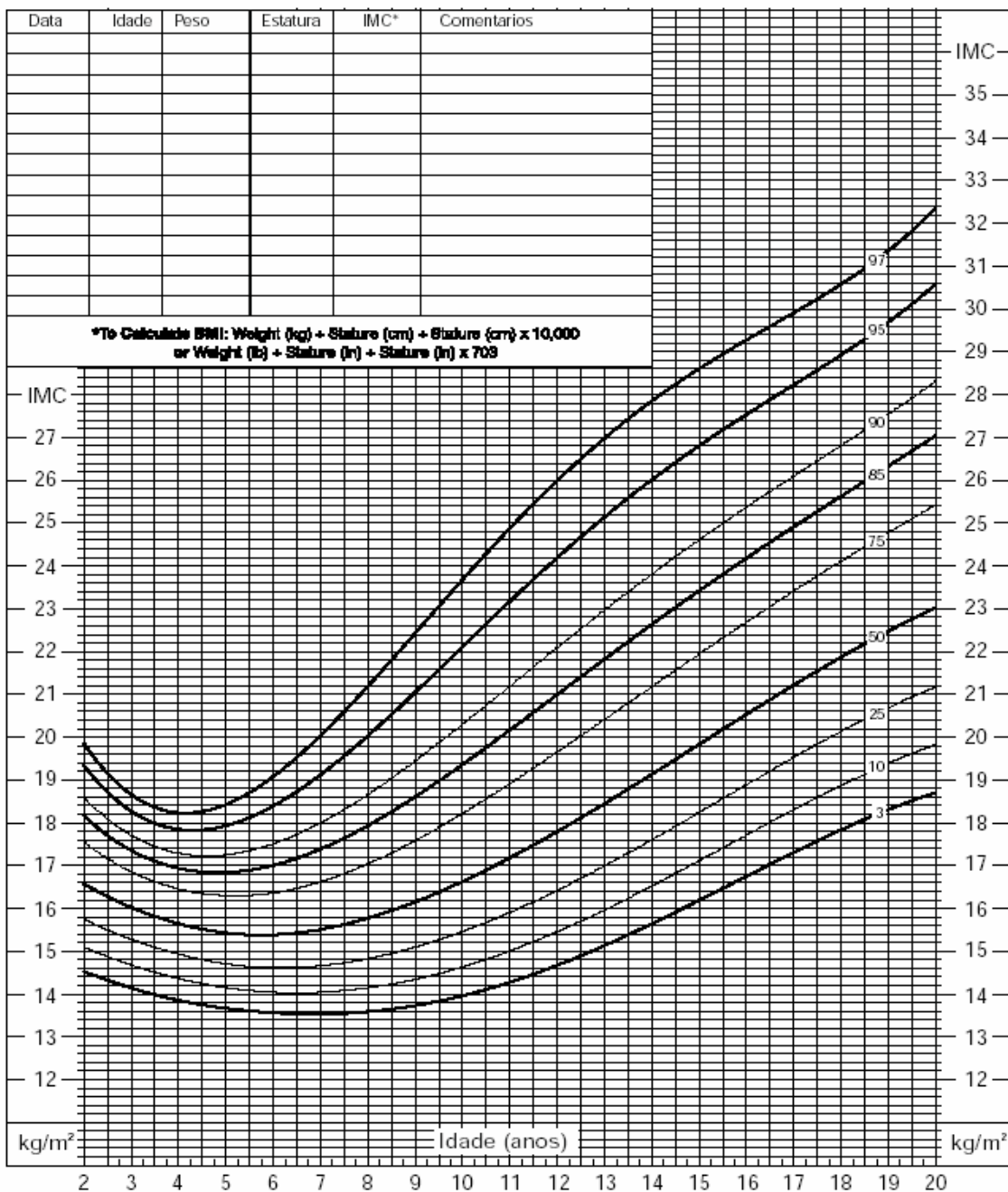
ANEXO III – Tabela masculina da Relação entre IMC e Idade para Classificação da Obesidade na Infância

2 a 20 anos: meninos

Nome _____

percentis de idade por índice de massa corporal

registro # _____



SOURCE: Developed by the National Center for Health Statistics in collaboration with the National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion (2000).



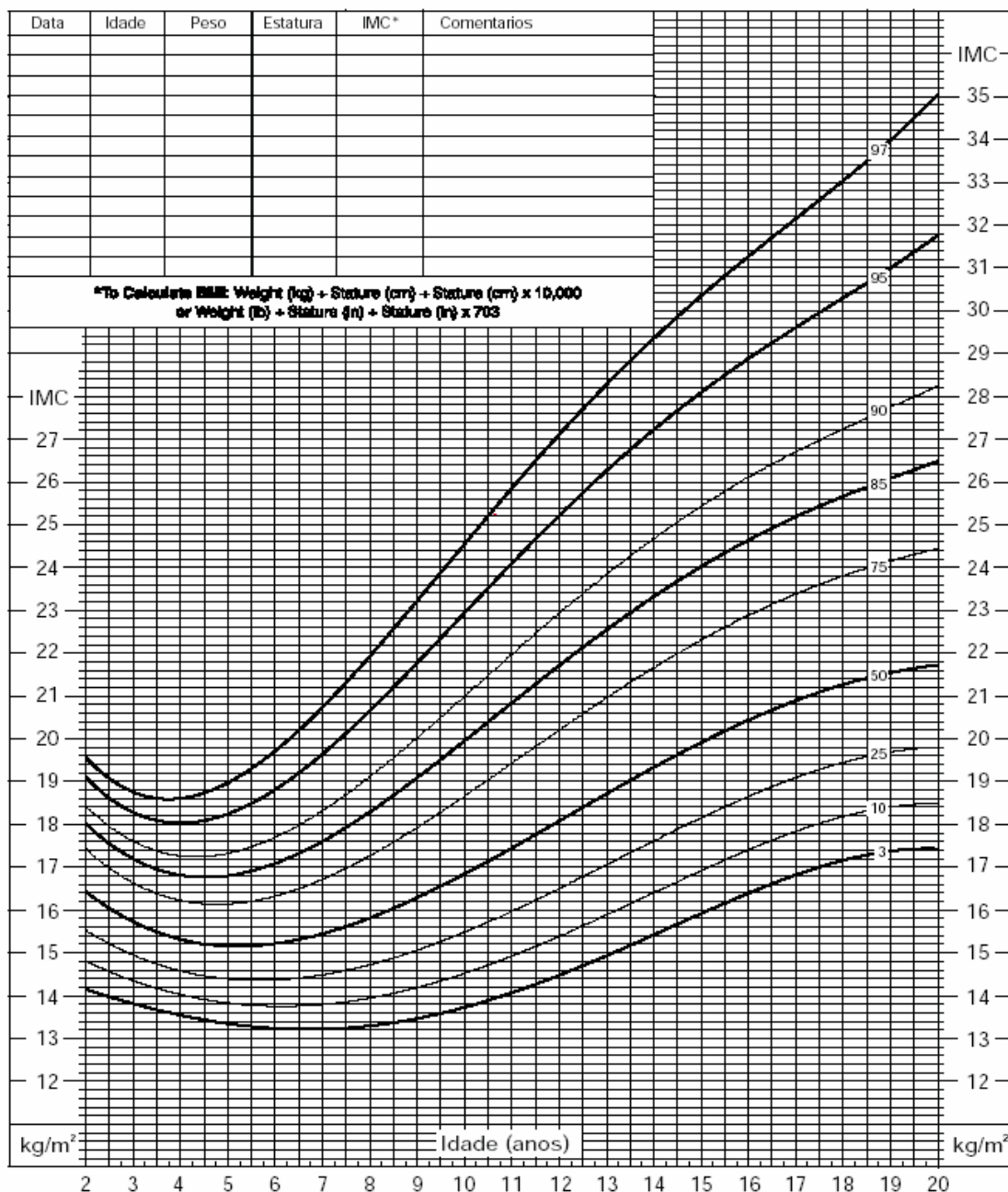
ANEXO IV – Tabela feminina da Relação entre IMC e Idade para Classificação da Obesidade na Infância

2 a 20 anos: meninas

Nome _____

percentis de idade por índice de massa corporal

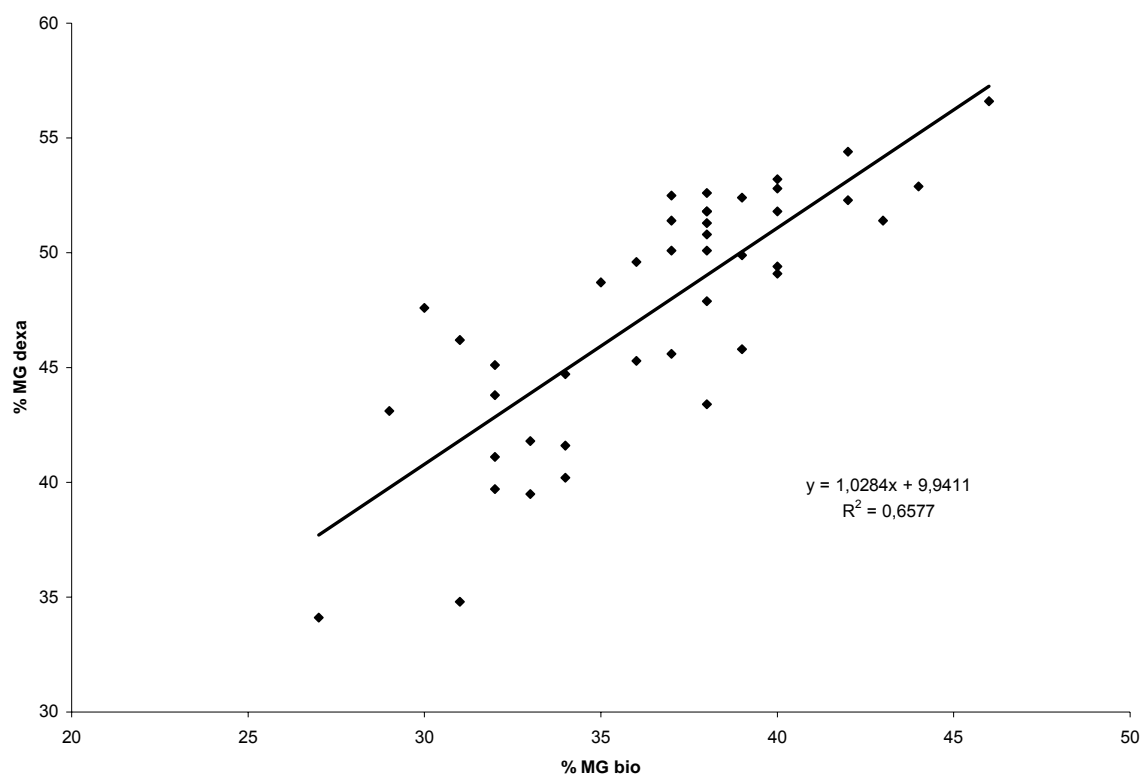
Registro # _____



SOURCE: Developed by the National Center for Health Statistics in collaboration with the National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion (2000).



ANEXO V – Correlação do Percentual de Massa Gorda (Gordura Corporal) entre o Método da Bioimpedância e o Método da DEXA nas Crianças Obesas.



ANEXO VI - Características das crianças obesas homocigotas para Arg16 e Gln27.

Pacientes	Sexo	Idade (anos)	Peso (kg)	Altura (cm)	IMC (Kg/m ²)	z-score (IMC)	CA (cm)	M. magra (kg)	M. gorda (kg)	GEB (Kcal/24h)	CR (Kcal/24h)
AFA	F	10,2	55,2	141,0	27,8	2,2	91,0	32,4	20,6	1100,0	0,8
BPT	F	9,8	74,2	153,5	31,5	2,5	100,0	43,0	30,3	1460,0	1,0
BRS	F	8,9	63,7	141,9	31,6	2,6	93,0	36,6	25,1	1530,0	0,9
BDM	M	11,0	64,0	142,5	31,5	2,4	93,0	40,5	24,5	1480,0	1,0
CSN	F	10,9	74,7	153,0	31,9	2,4	107,0	44,2	30,0	1450,0	0,8
CRT	F	10,7	61,8	152,2	26,7	2,0	89,5	37,4	22,3	1160,0	0,9
CRA	F	9,6	66,4	142,5	32,7	2,6	107,0	38,0	27,7	1100,0	0,9
DPBO	M	10,5	54,3	131,0	31,6	2,5	93,0	34,4	20,9	1310,0	0,9
FLO	M	10,2	49,3	145,1	23,4	1,8	85,0	32,6	14,4	1350,0	0,9
HLS	M	10,8	64,7	136,0	35,0	2,6	106,0	37,2	27,7	1300,0	0,9
JLAS	F	11,3	74,2	158,4	29,6	2,2	89,0	45,1	27,6	1290,0	0,8
JGS	F	10,8	57,5	151,0	25,2	1,8	87,0	36,7	21,7	1100,0	0,8
JCM	F	10,8	64,7	142,0	32,1	2,4	102,0	38,5	26,4	1420,0	0,9
JRS	M	9,5	55,6	139,0	28,8	2,4	92,0	35,5	19,1	1350,0	0,9
LAN	M	8,3	56,3	139,5	28,9	2,6	95,0	34,3	20,7	1560,0	0,8
MRS	F	10,5	79,9	154,0	33,7	2,6	104,0	48,1	31,8	1710,0	0,9
POS	F	10,5	68,0	153,2	29,0	2,3	98,0	45,0	22,7	1460,0	0,8
RLS	M	9,0	51,0	141,0	25,7	2,3	89,0	32,1	7,9	1470,0	0,8
RSM	M	10,5	54,0	138,0	28,4	2,3	91,0	35,6	18,0	1170,0	0,9
SGL	F	10,3	67,7	156,5	27,6	2,2	102,0	45,4	28,8	1380,0	0,8
SYFS	F	10,9	74,8	158,5	29,8	2,3	87,5	38,5	18,5	1510,0	0,8
THRO	M	10,0	66,8	151,0	29,3	2,4	96,0	41,0	24,9	1250,0	0,9
WOJ	M	10,3	70,8	144,0	34,1	2,6	107,0	39,3	29,7	1810,0	0,8
MÉDIA		10,2	63,9	146,3	29,8	2,3	95,8	38,8	23,5	1379,1	0,9
E. P.		0,2	1,7	1,6	0,6	0,0	1,5	1,0	1,2	38,2	0,0

ANEXO VII - Características das crianças obesas com homozigotas para Gly16 e Gln27.

Pacientes	Sexo	Idade (anos)	Peso (kg)	Altura (cm)	IMC (Kg/m²)	z-score (IMC)	CA (cm)	M. magra (kg)	M.gorda (kg)	GEB (Kcal/24h)	CR (Kcal/24h)
BSR	F	11,7	103,5	152,0	35,8	2,9	110,0	36,4	25,8	1880,0	0,9
CFC	F	11,9	68,8	149,5	30,8	2,2	90,0	42,7	26,1	1540,0	0,8
CBP	F	11,1	72,5	153,5	30,8	2,3	101,0	46,9	24,9	1790,0	0,8
EVA	F	10,6	65,1	157,7	26,2	2,0	94,0	44,3	20,4	1330,0	0,9
LVM	F	10,3	89,8	157,0	36,4	2,7	109,0	32,4	27,6	1350,0	0,8
LMF	M	11,6	84,7	127,0	37,5	2,6	81,0				
WLJ	M	8,8	58,8	137,5	31,1	2,6	92,0	37,3	19,5	1050,0	0,8
MÉDIA		10,8	66,6	147,7	30,9	2,5	96,7	40,0	24,1	1490,0	0,9
E. P.		0,4	7,1	3,4	2,3	0,1	3,4	2,6	3,9	117,5	0,0

ANEXO VIII - Características das crianças obesas homozigotas para Gly16 e Glu27.

Pacientes	Sexo	Idade (anos)	Peso (Kg)	Altura (cm)	IMC (Kg/m²)	z-score (imc)	CA (cm)	M. magra (kg)	M.gorda (kg)	GEB (Kcal/24h)	CR (Kcal/24h)
BXS	F	9,3	51,5	141,0	25,9	2,2	86,0	40,2	10,8	1020,0	0,9
CCRL	F	11,2	72,3	158,0	29,0	2,2	100,0	44,4	27,6	1270,0	0,8
CDN	F	9,7	60,2	150,3	26,6	2,2	92,5	50,2	10,0	1350,0	0,8
DSS	F	9,5	65,9	133,0	37,3	2,8	105,0	37,8	28,2	1210,0	0,8
DCB	M	9,3	69,2	132,6	39,4	2,8	105,0	35,2	33,6	1290,0	0,9
EMJM	F	9,9	50,5	140,0	25,8	2,0	81,0	33,3	15,7	1100,0	0,8
JGC	F	8,5	55,3	137,3	29,3	2,6	88,0	33,2	21,5	1210,0	1,0
JLM	F	9,4	52,6	149,8	23,4	1,8	80,0	34,6	15,9	1290,0	1,0
RPR	M	10,2	95,2	144,0	26,6	2,2	105,0	36,2	37,8	1160,0	1,0
VAO	F	10,3	64,9	145,6	30,6	2,4	94,0	41,7	24,2	1390,0	1,0
MÉDIA		9,7	63,8	143,2	29,4	2,3	93,7	38,7	22,5	1229,0	0,9
E. P.		0,2	2,5	2,6	1,6	0,1	3,4	2,1	3,0	35,8	0,0

ANEXO IX - Glicemia, Insulina, Homa, Adiponectina, Leptina, área de glicemia (mg/dl/120 min) e área de insulina (μ UI/dL/120min) das crianças obesas homozigotas para Arg16 e Gln27.

Pacientes	Glicemia (mg/dL)	Insulina (μUI/mL)	Homa (score)	Adiponectina (U/ml)	Leptina (ng/dL)	Área Glicemia	Área Insulina
AFA	80,0	23,2	4,6	5,4	46,0	13320,0	17403,0
BPT	104,0	28,5	7,3		80,0	13815,0	11824,5
BRS	88,0	30,2	6,6	9,9	73,0	14445,0	21693,0
BDM	95,0	15,2	3,6	11,1	45,0	15285,0	6289,5
CSN	84,0	16,8	3,5	10,0	39,0	15870,0	9517,5
CRT	92,0	14,4	3,3	7,4	74,0	13470,0	8227,5
CRA	78,0	11,0	2,1	13,8	34,0	8190,0	5772,0
DPBO	87,0	11,9	2,6	20,7	47,0	15990,0	10890,0
FLO		20,9	4,0	13,5			
HLS	83,0	5,6	2,1		63,0	13800,0	9915,0
JLAS	73,0	11,2	2,0	10,3	74,0	11160,0	1498,5
JGS	95,0	6,7	3,6	16,2	50,0	14820,0	4239,0
JCM	84,0	10,5	2,2	8,6	71,0	9990,0	6739,5
JRS	87,0	25,8	1,2	10,3	25,0	10830,0	4623,0
LAN	91,0	19,4	4,4	7,8	47,0		
MRS	80,0	14,9	2,9	7,2	52,0	11430,0	10516,5
POS	93,0	16,9	3,9	7,2	29,0	13140,0	15643,5
RLS	88,0	25,9	3,3	15,9	19,0	13170,0	2662,5
RSM	78,0	4,9	3,9	9,0	9,9	12720,0	3993,0
SGL	89,0	22,8	5,0	12,9	27,0	14325,0	16257,0
SYFS	76,0	18,4	3,5	6,5	60,0	12360,0	21975,0
THRO	94,0	22,0	5,1	11,4	54,0	12420,0	10261,5
WOJ	97,0	17,9	4,3	17,8	65,0	14025,0	8232,0
MÉDIA	87,1	17,2	3,7	10,6	49,3	11938,0	9051,0
E. P.	1,6	1,5	0,3	0,8	4,0	857,1	1278,3

ANEXO X - Glicemia, Insulina, Homa, Adiponectina, Leptina, área de glicemia (mg/dl/120 min) e área de insulina (μ UI/dL/120min) das crianças obesas homozigotas para Gly16 e Gln27.

Pacientes	Glicemia (mg/dL)	Insulina (μUI/mL)	Homa (score)	Adiponectina (μU/ml)	Leptina (ng/dL)	Área Glicemia	Área Insulina
BSR	84,0	17,6	5,7	8,1	102,0	13230,0	12181,5
CFC	86,0	21,7	4,6	5,8	73,0	14745,0	14890,5
CBP	96,0	27,2	6,4	13,6	39,0	12810,0	14160,0
EVA	92,0	25,9	5,9		44,0	14520,0	14593,5
LVM	119,0	19,1	4,5	6,8	40,0	11115,0	16325,0
LMF	87,0	23,9	5,1	7,1	49,0	13080,0	9034,5
WLJ	86,0	6,4	1,4	11,1	30,0	13725,0	4320,0
MÉDIA	92,9	26,0	6,2	8,3	76,7	13175,0	12215,0
E. P.	4,6	4,7	1,5	1,3	22,5	579,1	1588,2

ANEXO XI - Glicemia, Insulina, Homa, Adiponectina, Leptina, área de glicemia (mg/dl/120 min) e área de insulina (μ UI/dL/120 min) das crianças obesas homozigotas para Gly16 e Glu27.

Pacientes	Glicemia (mg/dL)	Insulina (μUI/mL)	Homa (score)	Adiponectina (μU/ml)	Leptina (ng/dL)	Área Glicemia	Área Insulina
BXS	83,0	18,9	1,8	11,9	39,0	12075,0	6774,0
CCRL	92,0	16,3	3,7	4,6	36,0	14475,0	23287,5
CDN	87,0	33,0	7,1	9,5	24,0	15045,0	32400,0
DSS	84,0	26,0	5,4	6,2	97,0	14415,0	18532,5
DCB	83,0	14,7	3,0	13,3	90,0	12525,0	6948,0
EMJM	94,0	17,4	4,0	11,2	26,0	13785,0	6786,0
JGC	104,0	14,3	3,7	11,2	36,0	14445,0	4873,5
JLM	95,0	13,7	3,2	5,0	27,0	13065,0	15625,5
RPR					38,0		
VAO	86,0	17,4	3,7	10,1	75,0	13185,0	9163,5
MÉDIA	89,8	19,1	3,6	9,2	48,8	12301,5	12439,1
E. P.	2,2	2,0	0,6	1,0	8,7	1399,6	3127,5

ANEXO XII - Colesterol, HDL-c, LDL-c, e Triglicérides das crianças obesas homocigotas para Arg16 e Gln27.

Pacientes	Colesterol (mg/dL)	HDL-c (mg/dL)	LDL-c (mg/dL)	TG (mg/dL)
AFA	198,0	43,0	137,0	90,0
BPT	129,0	46,0	64,0	96,0
BRS	184,0	38,0	112,0	169,0
BDM	214,0	44,0	142,0	139,0
CSN	150,0	34,0	94,0	109,0
CRT	190,0	45,0	66,0	97,0
CRA	120,0	36,0	75,0	43,0
DPBO	239,0	49,0	162,0	139,0
FLO	124,0	37,0	75,0	60,0
HLS	207,0	43,0	140,0	122,0
JLAS	140,0	36,0	70,0	71,0
JGS	197,0	52,0	130,0	75,0
JCM	103,0	35,0	60,0	39,0
JRS	188,0	38,0	116,0	72,0
LAN	216,0	28,0	145,0	217,0
MRS	163,0	38,0	96,0	46,0
POS	155,0	58,0	81,0	78,0
RLS	168,0	39,0	101,0	61,0
R SM	153,0	45,0	101,0	112,0
SGL	139,0	49,0	64,0	128,0
SYFS	218,0	54,0	143,0	104,0
THRO	169,0	46,0	70,0	103,0
WOJ	243,0	51,0	162,0	105,0
MÉDIA	174,2	42,8	104,5	98,9
E. P.	8,0	1,6	6,7	8,6

ANEXO XIII - Colesterol, HDL-c, LDL-c, e Triglicérides das crianças obesas homocigotas para Gly16 e Gln27.

Pacientes	Colesterol (mg/dL)	HDL-c (mg/dL)	LDL-c (mg/dL)	TG (mg/dL)
BSR	219,0	35,0	153,0	181,0
CFC	192,0	40,0	132,0	100,0
CBP	187,0	35,0	137,0	73,0
EVA	162,0	56,0	90,0	78,0
LVM	135,0	43,0	78,0	70,0
LMF	194,0	38,0	124,0	158,0
WLJ	86,0	37,0	34,0	74,0
MÉDIA	168,4	40,6	106,9	104,9
E. P.	17,3	2,8	15,7	17,3

ANEXO XIV - Colesterol, HDL-c, LDL-c, e Triglicérides das crianças obesas homocigotas para Gly16 e Glu27.

Pacientes	Colesterol (mg/dL)	HDL-c (mg/dL)	LDL-c (mg/dL)	TG (mg/dL)
BXS	219,0	34,0	63,0	109,0
CCRL	196,0	31,0	127,0	70,0
CDN	168,0	35,0	104,0	144,0
DSS	154,0	38,0	89,0	100,0
DCB	186,0	29,0	143,0	70,0
EMJM	152,0	36,0	95,0	107,0
JGC	132,0	47,0	58,0	137,0
JLM	173,0	38,0	114,0	85,0
RPR	194,0	45,0	113,0	181,0
VAO	140,0	52,0	75,0	66,0
MÉDIA	171,4	38,5	98,1	106,9
E. P.	8,4	2,3	8,7	11,9

ANEXO XV – Pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) durante o exercício moderado a 30% da contração voluntária máxima em crianças obesas homozigotas para Arg16 e Gln27.

INDIVÍDUOS	PAM (mmHg)				FC (bpm)			
	Basal	1 min	2 min	3 min	basal	1 min	2 min	3 min
AFA	85	100	95	95	79	75	89	80
BPT								
BRS	85	83	102	100	75	76	84	72
BDM	89	72	76	102	72	78	76	80
CSN	95	95	101	107	84	90	83	102
CRT	79	90	97	84	82	105	110	104
CRA	81	85	96	110	86	84	92	89
DPBO	78	72	81	82	90	90	86	88
FLO	76	83	77	85	79	75	71	81
HLS	66	87	78	78	83	88	90	98
JLAS	79	73	92	86	78	85	85	86
JGS	70	73	80	93	82	77	84	84
JCM	56	64	80	90	59	59	58	68
JRS	73	94		107	70	75	84	84
LAN	90	93	96	108	81	80	93	96
MRS	87	74	82	80	75	75	72	80
POS	94	95	108	102	89	97	86	100
RLS	94	95	100	100	66	85		91
R SM	94	81	87	80	92	94	101	101
SGL	79	95	114	130	75	78	90	87
SYFS	65	85	79	82	70	72	92	92
THRO	78	70	83	90	93		105	104
WOJ	86	95	98	100	96	94	102	102
Média	80,80	84,27	90,57	95,05	79,75	82,48	87,29	89,50
EP	3,3	3,3	3,5	4,1	2,9	3,3	3,8	3,3

ANEXO XVI - Pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) durante o exercício moderado a 30% da contração voluntária máxima em crianças obesas homocigotas para Gly16 e Gln27.

INDIVÍDUOS	PAM (mmHg)				FC (bpm)			
	Basal	1 min	2 min	3 min	basal	1 min	2 min	3 min
BSR	91	87	110	100	75	78	79	89
CFC	78	84	76	95	93	91	100	104
CBP	66	69	68	76	60	63	63	63
EVA	61	68	80	80	60	60	64	64
LVM	75	100	112	110	87	94	93	96
LMF	90	101	111	121	83	88		98
WLJ	85	71	80	82	79	81	80	80
Média	78,00	82,86	91,00	94,86	76,67	79,29	79,83	84,86
EP	1.82	2.66	2.33	3.52	2.48	2.50	2.73	2.50

ANEXO XVII – Pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) durante o exercício moderado a 30% da contração voluntária máxima em crianças obesas homozigotas para Gly16 e Glu27.

INDIVÍDUOS	PAM (mmHg)				FC (bpm)			
	Basal	1 min	2 min	3 min	basal	1 min	2 min	3 min
BXS	59	62	70	76	72	77	85	94
CCRL	76	95	85	85	76	81	79	81
CDN	81	80	86	77	73	76	82	88
DSS	76	75	92	101	84	84	87	93
DCB	82	76	88	82	92	94	92	92
EMJM	80	82	89	100	78	85	96	90
JGC	81	76	80	97	91	91	92	100
JLM	85	74	74	94	87	82	82	87
RPR	70	73		84	90	92	93	
VAO								
Média	76,74	77,00	83,00	88,44	82,52	84,67	87,56	90,63
EP	2,5	2,8	2,4	3,1	2,52	2,05	1,88	1,77

ANEXO XVIII – Fluxo sanguíneo muscular (FSM) e condutância vascular no antebraço (CVA) durante o exercício moderado a 30% da contração voluntária máxima em crianças obesas homozigotas para Arg16 e Gln27.

INDIVÍDUOS	FSM (ml/min/100ml)				CVA (ml/min/100ml/mmHg)			
	basal	1 min	2 min	3 min	basal	1 min	2 min	3 min
AFA	2,43	3,05	3,10	3,12	0,029	0,031	0,033	0,033
BPT								
BRS	2,58	3,18	3,47	3,47	0,030	0,038	0,034	0,035
BDM	3,02	3,26	3,02	3,69	0,034	0,045	0,040	0,036
CSN	2,66	3,09	3,05	3,09	0,028	0,033	0,030	0,029
CRT	3,48	3,27	3,53	3,81	0,044	0,036	0,036	0,045
CRA	2,58	3,18	3,31	3,47	0,032	0,037	0,034	0,032
DPBO	2,65	2,80	2,85	2,91	0,034	0,039	0,035	0,035
FLO	2,96	2,71	3,37	3,35	0,039	0,033	0,044	0,039
HLS	3,12	4,02	4,32	5,16	0,047	0,046	0,055	0,066
JLAS	3,02	3,26	3,02	3,69	0,038	0,045	0,033	0,043
JGS	2,37	3,09	3,15	3,09	0,034	0,042	0,039	0,033
JCM	2,03	3,00	3,05	2,98	0,036	0,047	0,038	0,033
JRS	2,29	3,58	3,61	3,59	0,032	0,038	0,038	0,034
LAN	2,38	2,51	3,28	3,10	0,026	0,027	0,034	0,029
MRS	3,01	3,64	3,74	4,47	0,035	0,049	0,046	0,056
POS	2,09	2,49	2,55	2,55	0,022	0,026	0,024	0,025
RLS	2,22	2,80	2,86	2,84	0,024	0,029	0,029	0,028
R SM	2,04	3,27	3,53	3,81	0,022	0,040	0,041	0,048
SGL	2,35	2,71	2,95	2,99	0,030	0,029	0,026	0,023
SYFS	2,35	2,71	2,95	2,99	0,036	0,032	0,037	0,036
THRO	2,15	3,22	4,15	4,25	0,028	0,046	0,050	0,047
WOJ	2,71	2,65	2,74	2,9	0,031	0,028	0,028	0,029
Média	2,57	3,07	3,25	3,42	0,032	0,037	0,037	0,037
EP	0,1	0,1	0,1	0,2	0,002	0,002	0,002	0,003

ANEXO XIX – Fluxo sanguíneo muscular (FSM) e condutância vascular no antebraço (CVA) durante o exercício moderado a 30% da contração voluntária máxima em crianças obesas homozigotas para Gly16 e Gln27.

INDIVÍDUOS	FSM (ml/min/100ml)				CVA (ml/min/100ml/mmHg)			
	basal	1 min	2 min	3 min	basal	1 min	2 min	3 min
BSR	2,58	2,86	2,91	2,96	0,028	0,033	0,026	0,030
CFC	2,38	3,37	3,53	3,54	0,031	0,040	0,046	0,037
CBP	2,60	2,95	2,98	3,00	0,039	0,043	0,044	0,039
EVA	2,35	2,56	2,65	2,70	0,038	0,038	0,033	0,034
LVM	2,21	2,51	3,28	3,10	0,030	0,025	0,029	0,028
LMF	2,43	2,68	2,72	2,80	0,027	0,027	0,025	0,023
WLJ	1,65	1,69	1,76	1,84	0,019	0,024	0,022	0,022
Média	2,31	2,66	2,83	2,85	0,030	0,033	0,032	0,031
EP	0,1	0,2	0,2	0,2	0,002	0,002	0,003	0,002

ANEXO XX – Fluxo sanguíneo muscular (FSM) e condutância vascular no antebraço (CVA) durante o exercício moderado a 30% da contração voluntária máxima em crianças obesas homozigotas para Gly16 e Glu27.

INDIVÍDUOS	FSM (ml/min/100ml)				CVA (ml/min/100ml/mmHg)			
	basal	1 min	2 min	3 min	basal	1 min	2 min	3 min
BXS								
	3,04	4,12	4,00	4,02	0,051	0,066	0,057	0,053
CCRL								
	2,46	3,95	3,99	3,85	0,032	0,042	0,047	0,045
CDN								
	2,94	3,85	3,90	4,10	0,036	0,048	0,045	0,053
DSS								
	3,22	3,99	3,87	3,74	0,042	0,053	0,042	0,037
DCB								
	3,19	3,74	3,89	4,00	0,039	0,049	0,044	0,049
EMJM								
	2,99	3,42	3,51	3,50	0,037	0,042	0,039	0,035
JGC								
	2,84	3,95	3,98	3,78	0,035	0,052	0,050	0,039
JLM								
	2,92	3,16	3,41	3,40	0,035	0,043	0,046	0,036
RPR								
	3,14	3,27	3,53	3,81	0,045	0,045	0,046	0,045
VAO								
	3,00	3,17	3,15	3,58				
Média	2,97	3,66	3,72	3,78	0,039	0,049	0,046	0,044
EP	0,07	0,12	0,09	0,07	0,002	0,002	0,002	0,002

ANEXO XXI – Pressão arterial média (PM) e frequência cardíaca (FC) durante o estresse mental em crianças obesas homozigotas para Arg16 e Gln27.

INDIVIDUOS	PAM (mmHg)					FC (bpm)				
	basal	1 min	2 min	3 min	4 min	basal	1 min	2 min	3 min	4 min
AFA	82	89	87	90	88	75	80	79	79	77
BPT	78	71	85	89	88					
BRS	94	102	101	101	99	59	60	58	58	62
BDM	92	92	92	90	90	78	84	87	88	90
CSN	73	78	84	84	87	83	82	80	82	83
CRT	78	84	83	84	87	99	108	108	110	109
CRA	68	74	78	80	79	75	81	79	82	80
DPBO	70	84	90	86	80	78	84	87	88	90
FLO	80	80	86	77	80	96	100	102	103	104
HLS	94	100	103	100	101	88	101	94	98	96
JLAS	70	73	85	93	89	45	69	68	68	
JGS	81	77	90	80	94	84	88	95	95	
JCM	81	80	80	92	95	91	98	100	105	
JRS	88	91	96	98	97	79	88	89	88	
LAN	82	87	86	87	86	72	90	91	93	87
MRS	74	74	73	74	72	104	93	91	95	94
POS	78	71	85	89	88	73	75	73	77	77
RLS	81	88	89	91	89					
R SM	79	73	92	86	94	89	92	96	96	94
SGL	89	87	96	100	100	60	60	55	62	63
SYFS	87	100	96	105	104	104	93	91	95	94
THRO	79	73	92	86	94	78	84	87	88	90
WOJ	81	77	90	80	94	91	91	90	92	83
Média	80,9	82,8	88,7	88,8	90,3	81,0	85,8	85,7	87,7	86,7
EP	2,3	3,1	2,2	2,5	2,4	4,7	4,0	4,2	4,2	4,0

ANEXO XXII - Pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) durante o estresse mental em crianças obesas homozigotas para Gly16 e Gln27.

INDIVIDUOS	PAM (mmHg)					FC (bpm)				
	basal	1 min	2 min	3 min	4 min	basal	1 min	2 min	3 min	4 min
BSR	82	89	87	90	88	72	90	91	93	87
CFC	81	88	89	91	89	79	90	90	91	87
CBP	70	84	90	86	80	72	90	91	93	87
EVA	77	79	79	83	82	78	101	101	102	103
LVM	83	84	85	86	87	79	85	80	84	84
LMF	74	74	73	74	72	59	60	58	58	62
WLJ	76	87	87	88	94	70	80	86	90	89
Média	77,62	83,61	84,42	85,25	84,77	72,93	85,09	85,60	87,23	85,48
EP	1,45	1,74	1,97	1,74	2,31	2,28	4,08	4,28	4,36	3,82

ANEXO XXIII – Pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) durante o estresse mental em crianças obesas homozigotas para Gly16 e Glu27.

INDIVIDUOS	PAM (mmHg)					FC (bpm)				
	basal	1 min	2 min	3 min	3 min	basal	1 min	2 min	3 min	3 min
BXS	83	84	85	86	87	89	88	87	89	92
CCRL	56	74	80	87	90	59	60	58	58	62
CDN	78	71	85	89	88	60	60	55	62	63
DSS	96	108	107	105	98	104	93	91	95	94
DCB	88	91	96	98	97	102	106	103	104	105
EMJM	88	91	95	97	97	84	84	84	89	89
JGC	74	74	73	74	72	70	75	84	84	
JLM	73	77	84	87	90	86	93	93	87	88
RPR	89	85	88	80	92	99	108	108	110	109
VAO	88	91	95	97	97	99	108	108	110	109
Média	81,25	84,65	88,78	90,00	90,66	85,10	87,46	87,11	88,75	90,19
EP	3,57	3,56	3,05	2,91	2,44	2.60	4.63	3.96	3.40	3.40

ANEXO XXIV – Fluxo sanguíneo muscular (FSM) e condutância vascular no antebraço (CVA) durante o estresse mental em crianças obesas homozigotas para Arg16 e Gln27.

INDIVIDUOS	FSM (ml/min/100ml)					CVA (ml/min/100ml/mmHg)				
	basal	1 min	2 min	3 min	4 min	basal	1 min	2 min	3 min	4 min
AFA	3,28	2,93	3,46	3,90	3,44	0,040	0,033	0,040	0,043	0,039
BPT	3,25	3,85	4,20	3,62	4,01	0,041	0,054	0,049	0,041	0,046
BRS	1,14	2,82	2,84	3,05	3,47	0,012	0,028	0,028	0,030	0,035
BDM	1,91	1,58	2,11	2,80	2,46	0,021	0,017	0,023	0,031	0,027
CSN	1,89	1,87	2,56	2,48	2,87	0,026	0,024	0,031	0,030	0,033
CRT	3,23	3,81	3,89	4,26	3,41	0,042	0,045	0,047	0,050	0,039
CRA	1,33	2,24	2,00	2,10	2,20	0,019	0,030	0,026	0,026	0,028
DPBO	2,73	2,85	3,18	3,11	2,84	0,039	0,034	0,035	0,036	0,035
FLO	2,02	2,41	2,59	2,69	2,89	0,025	0,030	0,030	0,035	0,036
HLS	1,89	1,87	2,56	2,48	2,87	0,020	0,019	0,025	0,025	0,028
JLAS	1,33	2,24	2,00	2,10	2,20	0,019	0,031	0,024	0,023	0,025
JGS	2,13	2,25	2,01	2,11	2,20	0,026	0,029	0,022	0,026	0,023
JCM	2,73	2,85	3,18	3,11	2,84	0,034	0,036	0,040	0,034	0,030
JRS	1,97	1,93	1,74	1,84	2,13	0,022	0,021	0,018	0,019	0,022
LAN	2,83	4,74	4,87	6,09	3,83	0,034	0,054	0,057	0,070	0,044
MRS	2,82	2,69	2,74	2,60	2,79	0,038	0,036	0,038	0,035	0,039
POS	2,59	2,95	2,86	2,78	3,31	0,033	0,042	0,034	0,031	0,038
RLS	2,55	3,03	2,85	2,73	2,89	0,032	0,034	0,032	0,030	0,032
RSM	1,14	1,26	1,19	1,49	1,26	0,014	0,017	0,013	0,017	0,013
SGL	1,93	2,53	2,60	2,38	2,65	0,022	0,029	0,027	0,024	0,027
SYFS	2,45	2,74	3,08	2,79	2,78	0,028	0,027	0,032	0,027	0,027
THRO	2,82	2,69	2,74	2,60	2,79	0,036	0,037	0,030	0,030	0,030
WOJ	2,45	2,74	3,08	2,79	2,78	0,030	0,036	0,034	0,035	0,030
Média	2,28	2,65	2,80	2,86	2,82	0,028	0,032	0,032	0,033	0,032
EP	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2	0,003	0,003	0,003	0,004	0,002

ANEXO XXV – Fluxo sanguíneo muscular (FSM) e condutância vascular no antebraço (CVA) durante o estresse mental em crianças obesas homozigotas para Gly16 e Gln27.

INDIVIDUOS	FSM (ml/min/100ml)					CVA (ml/min/100ml/mmHg)				
	basal	1 min	2 min	3 min	4 min	basal	1 min	2 min	3 min	4 min
BSR	2,83	3,01	3,00	2,90	2,95	0,035	0,034	0,034	0,032	0,033
CFC	2,80	2,93	2,80	2,81	2,70	0,035	0,033	0,031	0,031	0,030
CBP	2,13	2,25	2,01	2,11	2,20	0,030	0,027	0,022	0,025	0,027
EVA	3,00	2,82	2,84	3,05	3,47	0,039	0,036	0,036	0,037	0,042
LVM	2,83	2,45	2,50	2,30	2,74	0,034	0,029	0,029	0,027	0,031
LMF	2,15	2,50	2,47	2,60	2,55	0,029	0,034	0,034	0,035	0,036
WLJ	2,62	2,65	2,70	2,62	2,65	0,034	0,030	0,031	0,030	0,028
Média	2,62	2,66	2,62	2,63	2,75	0,034	0,032	0,031	0,031	0,033
EP	0,11	0,09	0,10	0,11	0,12	0,001	0,001	0,001	0,001	0,002

ANEXO XXVI – Fluxo sanguíneo muscular (FSM) e condutância vascular no antebraço (CVA) durante o estresse mental em crianças obesas homozigotas para Gly16 e Glu27.

INDIVIDUOS	FSM (ml/min/100ml)					CVA (ml/min/100ml/mmHg)				
	basal	1 min	2 min	3 min	4 min	basal	1 min	2 min	3 min	4 min
BXS	3,25	3,85	4,01	3,62	3,65	0,039	0,046	0,047	0,042	0,042
CCRL	3,20	3,58	3,85	3,40	4,01	0,057	0,048	0,048	0,039	0,045
CDN	3,25	3,85	4,20	3,62	4,01	0,041	0,054	0,049	0,041	0,046
DSS	2,72	4,21	3,85	4,53	1,78	0,028	0,039	0,036	0,043	0,018
DCB	3,00	3,80	3,74	3,78	4,00	0,034	0,042	0,039	0,039	0,041
EMJM	3,59	3,99	4,00	3,90	3,97	0,041	0,044	0,042	0,040	0,041
JGC	2,83	3,41	3,50	3,71	3,65	0,038	0,046	0,048	0,050	0,051
JLM	2,83	3,85	3,98	4,00	3,83	0,039	0,050	0,048	0,046	0,042
RPR	2,59	2,95	2,86	2,78	3,31	0,029	0,035	0,033	0,035	0,036
VAO	3,25	3,85	3,90	3,62	3,65	0,037	0,042	0,041	0,037	0,038
Média	3,05	3,73	3,79	3,70	3,59	0,038	0,045	0,043	0,041	0,040
EP	0,10	0,11	0,12	0,14	0,21	0,003	0,002	0,002	0,001	0,003

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. AKolata G. Obese Children. **Science**. Apr 4; 232 (4746): 20-1, 1986.
2. ARNER, P. Genetic variance and lipolysis regulation: implications for obesity. **Ann. Med.**, v.33, p.542-46, 2001.
3. BATALHA LT, VILLARES SMF. Efeito do polimorfismo do códon 27 do receptor β_2 -adrenérgico em resposta ao treinamento Físico e a dieta hipocalórica em pacientes obesas. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Endocrinologia. Tese de Doutorado, 2003.
4. CARLSSON M, ORHO-MELANDER M, HEDENBRO J, GROOP LCCOMMON variants in the beta2-(Gln27Glu) and beta3-(Trp64Arg)--adrenoceptor genes are associated with elevated serum NEFA concentrations and type II diabetes. **Diabetologia**., May;44(5):629-36, 2001.
5. CASTELLANO M, ROSSI F, GIACCHÈ M, PERANI C, RIVADOSSI F, MUIESAN M L, SALVETTI M, BESCHI, M RIZZONI D, AGABITI-ROSEI E. β_2 -Adrenergic Receptor Gene Polymorphism, Age, and Cardiovascular Phenotypes. **Hypertension**., 41:361-367.2003
6. COCKCROFT, J.R.; GAZIS, A.G.; CROSS, D.J.; WHEATLEY, A.; DEWAR, J.; HALL, I.P.; NOON, J.P. β_2 -adrenoceptor polymorphism determines vascular reactivity in humans. **Hypertension**., v.36, p.371-75, 2000.
7. Cole TJ. The LMS method for constructing normalized growth standards. **Eur J Clin Nutr.**, 44: 45-60. 1990.
8. DIETZ, N.M.; ENGELKE, K.A.; SAMUEL, T.T.; FIX, R.T.; JOYNER, M.J. Evidence for nitric oxide-mediated sympathetic forearm vasodilation in humans. **J. Physiol.**, 498:531-540; 1997.
9. DIETZ, N.M.; RIVERA, J.J.; EGGNER, S.E.; FIX, R.T.; WARNER, D.O.; JOYNER, M.J. Nitric oxide contributes to the rise in forearm blood flow during mental stress in human. **J. Physiol.**, v.480, p.361-8, 1994.
10. DISHY, V.; SOFOWORA, G.G.; XIE, H.; KIM, RB, BYRNE, D.W.; STEIN, C.M.; WOOD, A.J.J. The effect of common polymorphism of the

- β_2 -adrenergic receptor on agonist-mediated vascular desensitization. **N. Engl. J. Med.**, v.345, p.1030-5, 2001.
11. EHRENBORG, E.; SKOGSBERG, J.; RUOTOLO, G.; LARGE, V.; ERIKSSON, P.; ARNER, P.; HAMSTEN, A. The Q/E27 polymorphism in the β_2 -adrenoceptor gene is associated with increased body weight and dyslipoproteinemia involving triglyceride-rich lipoproteins. **J. Int. Med.**, v.247, p.651-56, 2000.
 12. EISENACH JH, MCGUIRE AM, SCHWINGLER RM, TURNER ST, AND JOYNER MJ. The Arg16/Gly beta2-adrenergic receptor polymorphism is associated with altered cardiovascular responses to isometric exercise. **Physiol Genomics.**, 16:323-328. 2004.
 13. EVANS, W.E.; McLEOD H.L. Pharmacogenomics-drug disposition, drug targets, and side effects. **N. Engl. J. Med.**, vol.346 (6), p.538-49, 2003.
 14. FRENCH SA, STORY M, JEFFERY RW. Environmental influences on eating and physical activity. **Annu Rev Public Health.**, 22:309-35, 2001.
 15. FREYSCHUSS, U.; HJEMDAHL, P.; JUHLIN-DANNFELT, A.; LINDE, B. Cardiovascular and sympathoadrenal responses to mental stress: influence of β -blockade. **Am. J. Physiol: Heart. Circ. Physiol.**, v.255, p.H1443-51, 1988.
 16. FRIEDWALD WT, LEVY RI, FREDERICKSON DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin. Chem.**, 18: 499-502. 1972.
 17. GRASSI, G.; SERAVALLE, G.; COLOMBO, M.; BOLLA, G.; CATTANEO, B.M.; CAVAGNINI, F.; MANCIA, G. Body weight reduction, sympathetic nerve traffic, and arterial baroreflex in obese normotensive humans. **Circulation.**, v.97, p.2037-42, 1998.
 18. GRATZE G, FORTIN J, LABUGGER R, BINDER A, KOTANKO P, TIMMERMANN B, LUFT FC, HOEHE MR, SKRABAL F. β_2 -adrenergic receptor variants affect resting blood pressure and agonist-induced vasodilation in young adult Caucasians. **Hypertension.**, v.33, p.1425-30, 1999.

19. GREEN, S.A., TURKI, J., INNIS, M.; LIGGETT, B. Amino-terminal polymorphisms of the human β_2 -adrenergic receptor impart distinct agonist-promoted regulatory properties. *Biochemistry*, v.33, p.9414-19, 1994.
20. GREEN, SA. TURKI, J., INNIS, M.; LIGGETT, S.B. Amino-terminal polymorphisms of the human β_2 -adrenergic receptor impart distinct agonist-promoted regulatory properties. *Biochemistry*, v.33, p.9414-9, 1994.
21. GREGOIRE J, TUCK S, YAMAMOTO Y, HUGHSON RL. Heart Rate Variability at Rest and Exercise: Influence of Age, Gender, and Physical Training. Canadian Society for Exercise *Physiology*, 21(6): 445-470. 1996.
22. HALL, J.E., BRANDS, M.W., HILDEBRANT, D.A., KUO, J., FITZGERALD, S. Role of sympathetic nervous system and neuropeptides in obesity hypertension. *Rev . Bras. Hipertens.*, v.3, p.212-24, 2000.
23. HELLSTRÖM, L., LARGE, V., REYNISDOTTIR, S., WAHRENBERG, H. ARNER, P. The different effects of a Gln27Glu β_2 -adrenoceptor gene polymorphism on obesity in males and in females. *J. Inter. Med.*, vol. 245; p.253-59, 1999.
24. ISHIYAMA-SHIGEMOTO S.; YAMADA K.; YUAN X.; ICHIKAWA F.; NONAKA, K. Association of polymorphisms in the β_2 -adrenergic receptor gene with obesity, hypertriglyceridaemia, and diabetes mellitus. *Diabetologia*, v.42, p.98-101, 1999.
25. JEEB, S.A; MOORE, M.S. Contribution of a sedentary lifestyle and inactivity to the etiology of overweight and obesity: current evidence and research issues. *Med Sci Sports Exerc.*, v.31 (11Suppl), p.S534-41, 1999.
26. KAWAMURA, T., EGUSA, G., FUJIKAWA, R. & OKUBO, M. Gln27Glu variant of the beta2-adrenergic receptor gene is not associated with obesity and diabetes in Japanese-Americans. *Metabolism*, 50, 443446, 2001.
27. KOPELMAN, PG. Obesity as a medical problem. *Nature*, 404(6778):635-43, 2000.

28. KOTANKO P.; BINDER, A.; TASKER, J., ET AL. Essential hypertension in african caribbeans associates with a variant of the β 2-adrenoceptor. **Hypertension.**, v.30, p.773-76, 1997.
29. LAAKSO, M.; EDELMAN, S.V.; BRECHETEL, G.; BARON, A.D. Impaired insulin-mediated skeletal muscle blood flow in patients with NIDDM. **Diabetes.**, v. 41, p.1076-83, 1990.
30. LARGE, V.; HELLSTRÖM, L.; REYNISDOTTIR, S.; LÖNNQVIST, F.; ERIKSSON, P.; LANNFELT, L.; ARNER, P. Human beta-2 adrenoceptor gene polymorphisms are highly frequent in obesity and associates with altered adipocyte beta-2 adrenoceptor function. **J. Clin. Invest.**, v.100, p.3005-13, 1997.
31. LARGE, V.; HELLSTRÖM, L.; REYNISDOTTIR, S.; LÖNNQVIST, F.; ERIKSSON, P.; LANNFELT, L.; ARNER, P. Human beta-2 adrenoceptor gene polymorphisms are highly frequent in obesity and associate with altered adipocyte beta-2 adrenoceptor function. **J. Clin. Invest.**, v.100, p.3005-13, 1997.
32. MACHO-AZCARATE, T.; MARTI, A.; GONZÁLEZ, A.; MARTINEZ, J.A.; IBÁÑEZ, J. Gln27Glu polymorphism in the beta2 adrenergic receptor gene and lipid metabolism during exercise in obese women. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, vol. 26, p.1434-41, 2002a.
33. MARTINEZ, J.A, CORBALAN, M.S., SÁNCHEZ-VILLEGAS, A., FORGA, L., MARTI, A.M., MARTÍNEZ-GONZALEZ, M.A. Obesity risk is associated with carbohydrate intake in women carrying the Gln27Glu β 2-adrenoceptor polymorphism. **J. Nutr.**, v.133, p.2549-54, 2003.
34. MATSUKAWA K, SHINDO T, SHIRAI M, NINOMIYA I. Nitric Oxide Mediates Cat Hindlimb Cholinergic Vasodilation Induced By Stimulation Of Posterior Hypothalamus. **Jap. J. Physiol.**, 43:473-483; 1993.
35. MATTHEWS DR, HOSKER JP, RUDENSKY AS, NAYLOR BA, TREACHER DF, TURNER RC. Homeostasis model assessment: Insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia.**, 1985; 28: 412-9.
36. MEIRHAEGHE, A.; HELBECQUE, N.; COTTEL, D.; AMOUYEL, P. β 2-Adrenoceptor gene polymorphism, body weight, and physical activity. **Lancet.**, v.353, p.896, 1999.

37. MIDDLEKAUFF HR, NGUYEN AH, NEGRÃO CE, NITZSCHE EU, HOH CK, NATTERSON BA, HAMILTON MA, FONAROW GC, HAGE A, MORIGUCHI JD. Impact of acute mental stress on muscle sympathetic nerve activity in patients with advanced heart failure. *Circulation.*, 96:1835-1842. 1997.
38. MILLER, S.A., DYKES, D.D., POLESKY, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res.*, v.16, p.1215, 1988.
39. MOORE, G.E., SHULDINER, A.R., ZMUDA, J.M., FERRELL, R.E., McCOLE, S.D., HAGERG, J.M. Obesity gene variant and elite endurance performance. *Metabolism.*, v.50 (12), p.1391-2, 2001.
40. MORI, Y.; KIM-MOTOYAMA, H.; ITO, Y.; KATAKURA, T.; YASUIDA, K.; ISHIYAMA-SHIGEMOTO, S.; YAMADA, K.; AKANUMA, Y.; OHASHI, Y.; KIMURA, S.; YAZAKI, Y.; KADOWAKI, T. The Gln27Glu β 2-adrenergic receptor variant is associated with obesity due to subcutaneous fat accumulation in Japanese men. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol.258, p.138-40, 1999.
41. NAGAI N, MORITAMI T, Effect of physical activity on autonomic nervous system function in lean and obese children. *International Journal of obesity.*, v.28, p.27-33, 2004.
42. NARKIEWICZ, K.; KATO, M.; PESEK, C.A.; SOMERS, V.K. Human obesity is characterized by a selective potentiation of central chemoreflex sensitivity. *Hypertension.*, v.33, p.1153-8, 1999.
43. NEGRÃO, C.E.; TROMBETTA, I.C.; BATALHA, L.T.; RIBEIRO, M.M.; RONDON, M.U.P.B.; TINUCCI, T.; FORJAZ, C.L.M.; BARRETTO, A.C.P.; HALPERN, A.; VILLARES, S.M.F. Muscle metaboreflex control is diminished in normotensive obese women. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, v.281, p.H469-75, 2001b.
44. OLIVEIRA CL, FISBERG M. Obesidade na infância e adolescência. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia.*, 47(2). 2003.
45. PEREIRA A, FLORIANO MS, GLORIA FA, CUNHA RS, HERKENHOFF FL, MIL JG, KRIGER JE. β 2-Adrenoceptor Functional Gene variants, Obesity, and Blood Pressure Level Interactions In the General Population. *Hypertension.*, 42(parte2):685-692. 2003.
46. PÉREZ-MARTIN, A., RAYNAUD, E., MERCIER, J. Insulin resistance and associated metabolic abnormalities in muscle: effects of exercise. *Obes Rev.*, v.2, p.47-59, 2001.

47. PÉRUSSE L, BOUCHARD C. Role of genetic factors in childhood obesity and in susceptibility to dietary variations. *Ann Med.*, 31 Suppl 1: 19-25. 1999.
48. RANKINEN, T., PÉRUSSE, L., WEISNAGEL, J., SNYDER, E.E., CHAGNÓN, C., BOUCHARD, C. The human obesity gene map: the 2001 update. *Obes. Res.*, v.109, p.196-43, 2002.
49. RAY, C.E.; MARK, A.L. Sympathetic adjustments to exercise: insights from microneurographic recordings. In: HAINSWORTH, E.; MARK, A.L. Cardiovascular reflex control in health and disease. *Saunders*, p.137-64, 1993.
50. RIBEIRO MM, SILVA AG, SANTOS S, GUAZZELLE I, MATOS LNJ, TROMBETTA IC, HALPERN A, NEGRÃO CE, VILLARES SMF. Diet and exercise training restore blood pressure and vasodilatory responses during physiological Maneuvers In Obese Children. *Circulation.*, 111. 2005.
51. RIBEIRO, M.M.; TROMBETTA, I.C.; BATALHA, L.T.; RONDON, M.U.P.B.; FORJAZ, C.L.M.; BARRETTO, A.C.P.; VILLARES, S.M.F.; NEGRÃO, C.E. Muscle sympathetic nerve activity and hemodynamics alterations in middle-aged obese women. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.34, p.475-8, 2001.
52. ROCKSTROTH JK, SCHIMIEDER RE, SCHÄCHINGER H, MESSERLI FH. Stress Response Pattern In Obesity And Systemic Hypertension. *Am. J. Cardiol.* 70:1035-1039, 1992.
53. ROSMOND, R.; UKKOLA, O.; CHAGNON, M.; BOUCHARD, C.; BJÖRNTORP, P. Polymorphisms of the β 2-adrenergic receptor gene (ADRB2) in relation to cardiovascular risk factors in men. *J. Inter. Med.*, v.248, p.239-44, 2000.
54. SHIGEMOTO SI, YAMADA K, YUAN X, ICHIKAWA F, NONAKA K. Association Of Polymorphisms In The β 2-Adrenergic Receptor Gene With Obesity, Hypertriglyceridaemia, And Diabetes Mellitus. *Diabetologia* 42:98-101, 1999.
55. STEIN, C.M.; NELSON, R.; DEEGAN, R.; HE, H.; WOOD, M.; WOOD, A.J.J. Forearm beta adrenergic receptor-mediated vasodilation is impaired, without alteration of forearm norepinephrine spillover, in borderline hypertension. *J. Clin. Invest.*, v.96, p.579-85, 1995.
56. STROOP JR. Studies of interference in serial verbal reactions. *J. Exper. Psychol.*, 18: 643-62. 1935.

57. TILBURG JH, WIJMENGA C, BAKEL H, ROZEMAN L, PEARSON PT, HAEFTEN TW. Relationship of β 2-Adrenergic Receptor Polymorphism With Obesity in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care.*, 26: 251-252. 2003.
58. TIMMERMANN, B.; RUNE, M.; LUFT, F.C.; GERDTS, E.; BUSJAHN, A.; OMVIK, G.L.; SCHUSTER, H.; WIENKER, T.F.; HOEHE, M.R.; LUND-JOHANSEN, P. β -2Adrenoceptor genetic variation is associated with genetic predisposition to essential hypertension: the bergen blood pressure study. *Kidney Intern.*, v.53, p.1455-60, 1998.
59. TOUNIAN P, GIRARDET J P. Energy metabolism in obesity. *Ann Pediatr.* V. 40 p. 291 – 6, 1993.
60. TROMBETTA IC, BATALHA LT, RONDON MUPB, LATERZA MC, FRAZZATTO E, ALVES MJNN, SANTOS AC, BRUM PC, BARRETO ACP, HALPEN A, VILLARES SMF, NEGRAO CE. Gly16+Glu27 beta2-adrenoceptor polymorphisms cause increased forearm blood flow responses to mental stress and handgrip in humans. *Jounarl appl physiol.*, 98(3), p.787-794, 2005.