

CENTRO UNIVERSITÁRIO UNIVATES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTU SENSU
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

**ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS G2548A E GLN223ARG COM
PARÂMETROS ANTROPOMÉTRICOS EM MULHERES SAUDÁVEIS**

Débora Marin

Lajeado, outubro de 2014.

Débora Marin

**ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS G2548A E GLN223ARG COM
PARÂMETROS ANTROPOMÉTRICOS EM MULHERES SAUDÁVEIS**

Dissertação de mestrado apresentada para o Programa de Pós-Graduação *STRICTO SENSU* em Biotecnologia, do Centro Universitário Univates, como parte exigente para obtenção do grau de mestre em Biotecnologia, na linha de pesquisa Aspectos Moleculares em Processos Fisiopatológicos.

Orientadora: Dra. Simone Morelo Dal Bosco

Coorientador: Dra. Verônica Contini

Lajeado, outubro de 2014.

Dedico este trabalho:

Aos meus pais, que são meus pilares e meus exemplos. Por todo o amor, dedicação e apoio em mais esta etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

O meu tão sonhado momento chegou: concluir o mestrado. O caminho foi tortuoso, porém válido em todos os sentidos.

Agradeço primeiramente a Deus por iluminar meu caminho.

Minha família, principalmente meus pais e minha irmã por segurar minha mão em todos os momentos e nunca me deixar cair ou pensar em desistir.

Ao meu noivo pela paciência, pelo amparo e pelo amor incondicional.

A Luna, por estar sempre me esperando com seu focinho gelado, rabinho abanando e esbanjando amor e carinho.

A todos os amigos que ficaram na torcida.

Agradeço aos meus pacientes pela paciência, e pelo apoio. Sempre entenderam as trocas de horários, e minhas crises de enxaqueca.

Meu muito obrigada a Profe Simone Morelo Dal Bosco, minha orientadora, que me acolheu na Univates quando transferi minha graduação para Lajeado, que foi muito presente em todos os momentos, saibas que foi um privilégio trabalhar contigo mais uma vez.

A Profe Verônica Contini, minha co-orientadora, obrigada pelo comprometimento, pelo apoio e pela força. Foi você que me introduziu ao mundo da biologia molecular, um mundo fascinante que me encantou.

A todos os professores do mestrado, por abrir as portas do conhecimento, especialmente a Profe Julia Genro, Márcia Goettert e Adriane Pozzobon.

Às colegas de mestrado, especialmente Luana, Clara e Crislene.

Enfim, meu muito obrigada a todos que torceram por mim!!!

“O aumento do conhecimento é como uma esfera dilatando-se no espaço: quanto maior a nossa compreensão, maior o nosso contato com o desconhecido”.

Blaise Pascal

RESUMO

Introdução: Fatores genéticos e ambientais estão envolvidos na patogênese da obesidade. Vários estudos demonstraram associações de variantes nos genes da leptina (*LEP*) e do receptor de leptina (*LEPR*) com a obesidade. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi investigar a influência dos polimorfismos G2548A, no gene *LEP*, e Gln223Arg, no gene *LEPR*, em parâmetros antropométricos, perfil lipídico, glicemia e no consumo alimentar de carboidratos. **Metodologia:** As participantes foram avaliadas por uma anamnese no Ambulatório de Nutrição da Univates, onde os dados do consumo alimentar foram obtidos pelo recordatório de 24 horas e calculados pelo programa *Dietwin Profissional* (versão 2008). As medidas antropométricas avaliadas foram: peso, altura, circunferência da cintura, circunferência do quadril, e a composição corporal por bioimpedância. Foi calculado o IMC e RCQ. Amostras de sangue foram coletadas para extração de DNA e para análise de parâmetros laboratoriais para avaliação do perfil lipídico (CT, HDL, TG) e glicose jejum. Os polimorfismos dos genes *LEP* (rs7799039) e *LEPR* (rs1177101) foram genotipados pela técnica de discriminação alélica TaqMan (*Applied Biosystems*). **Resultados:** A amostra foi composta por 378 mulheres saudáveis, com idade média de 25,1 anos ($\pm 6,2$). Não foram detectadas associações significativas dos polimorfismos investigados com o perfil lipídico, a glicose jejum e o consumo de carboidratos. O genótipo AA do polimorfismo G2548A foi associado com o aumento de peso, IMC, RCQ, CC, e % de gordura corporal. O genótipo GG do polimorfismo Gln223Arg foi associado com o aumento de IMC. **Conclusão:** Os alelos de risco dos dois polimorfismos foram associados com o aumento das medidas antropométricas, em indivíduos saudáveis, demonstrando uma possível associação com aumento de risco para obesidade.

Palavras – chave: Obesidade. Leptina. Receptor da leptina. Consumo alimentar.

ABSTRACT

Introduction: Genetic and environmental factors are involved in the pathogenesis of obesity. Several studies have demonstrated associations between variants in the leptin (*LEP*) and in the leptin receptor (*LEPR*) genes with obesity. **Objective:** The aim of this study was to investigate the influence of the polymorphisms G2548A, in the *LEP* gene, and Gln223Arg, in the *LEPR* gene, on anthropometric parameters, lipid profile, fasting glucose and carbohydrates intake. **Methods:** Participants were assessed by an interview at the outpatient Nutrition Program at Centro Universitário Univates. Food consumption profile was obtained by the 24-hour recall method and calculated by the Dietwin Professional Program (2008 version). The anthropometric measurements were: weight, height, waist circumference, hip circumference, and fat body composition by bioelectrical impedance. BMI and WHR were calculated. Blood samples were collected for DNA extraction and for the analysis of biochemical parameters (TC, HDL, TG and fasting glucose). The polymorphisms (*LEP*-rs7799039 and *LEPR*-rs1177101) were genotyped by allelic discrimination TaqMan (Applied Biosystems). **Results:** The sample was composed by 378 healthy women with an average age of 25.1 years (\pm 6.2). No significant associations between the polymorphisms investigated and lipid profile, fasting glucose and carbohydrate intake were detected. The AA genotype of the G2548A polymorphism was associated with increased weight, BMI, WHR, WC, and% body fat. The GG genotype of the Gln223Arg polymorphism was associated with increased BMI. **Conclusion:** The risk alleles of the two polymorphisms were associated with increased anthropometric measurements in healthy subjects, suggesting a possible association with increased risk for the development of obesity.

Key – Words: Obesity. Leptin. Leptin Receptor. Food Consumption

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Localização genômica do gene <i>LEP</i>	22
Figura 2 – Localização genômica do gene <i>LEPR</i>	22
Figura 3 – Ação da leptina no sistema nervoso central.....	24
Figura 4 – Sinalização intracelular da leptina.....	25
Figura 5 – Funções da leptina.....	27
Figura 6 – Análise dos SNP's sobre parâmetros antropométricos.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estudos realizados com os polimorfismos Gln223Arg e G2548A..	29
Tabela 2 – Frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos investigado.....	38
Tabela 3 – Características clínicas, laboratoriais e antropométricas da amostra de acordo com os genótipos.....	40

LISTA DE SIGLAS

AGRP: Peptídeo relacionado ao gene agouti

ARC: Núcleo Arqueado

CC: Circunferência da cintura

CT: Colesterol total

DNA: Ácido desoxirribunucleico

EPA: Ácido graxo eicosapentanoico

EPI's: Equipamentos de proteção individual

HC: Carboidratos

HDL-c: Lipoproteína de alta densidade

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IMC: Índice de massa corporal

IRS: Substrato do receptor da insulina

JAK 2: Janus quinase 2

LDL-c: Lipoproteína de baixa densidade

LEP: Leptina

LEPR: Receptor de leptina

LH: Hormônio luteinizante

NPY: Neuropeptídeo Y

OMS: Organização Mundial da Saúde

PI3K: Fosfatidil inositol 3 quinase

POMC: Proopiomelanocortina

RCQ: Relação cintura quadril

SOCS3: Supressor de sinalização de citocinas 3

STAT 3: Signal transducer and activator of transcription 3

TG: Triglicerídeos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Tema.....	14
1.2 Problema.....	15
1.3 Objetivos.....	15
1.3.1 Objetivo geral.....	15
1.3.2 Objetivos específicos.....	15
1.4 Justificativa.....	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1 Obesidade.....	18
2.2 Consumo de carboidratos.....	19
2.3 Tecido adiposo.....	21
2.4 Leptina e receptor de leptina.....	21
2.4.1 Ação da leptina no sistema nervoso central e sinalização intracelular da leptina.....	23
2.4.2 Ações periféricas da leptina.....	26
2.4.3 Polimorfismo nos genes <i>LEP</i> (rs7799039) e <i>LEPR</i> (rs1137101).....	27
3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....	33
3.1 Critérios de inclusão.....	33
3.2 Critérios de exclusão.....	34
3.3 Anamnese e recordatório 24 horas.....	34
3.4 Medidas antropométricas.....	34
3.5 Percentual de gordura corporal.....	36
3.6 Exames laboratoriais.....	36
3.7 Extração do DNA e amplificação dos polimorfismos.....	37
3.8 Análise estatística.....	37

4 RESULTADOS.....	38
5 DISCUSSÃO.....	42
6 CONCLUSÃO.....	47
REFERÊNCIAS.....	48
ANEXOS.....	55

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é considerada hoje um problema de saúde pública mundial, uma pandemia que está aumentando a cada ano. Apresenta etiologia multifatorial, ou seja, é resultado de uma complexa interação entre fatores comportamentais, culturais, genéticos, fisiológicos e psicológicos. É um fator determinante para o aumento de doenças crônicas não transmissíveis incluindo as doenças cardiovasculares, diabetes *mellitus*, dislipidemias e hipertensão (WANG, 2013; ROMERO; ZANESCO, 2006; LANDEIRO; QUARANTINI, 2011).

O aumento da obesidade e suas co-morbidades podem ser um reflexo da transição nutricional. As mudanças na alimentação se devem, entre outros motivos, à oferta crescente de alimentos industrializados e ao aumento da disponibilidade e facilidade de acesso aos alimentos (BORTOLI *et al.*, 2011). Esta mudança no perfil nutricional da população é caracterizada pela diminuição da prática de atividade física e pelo aumento do consumo de gorduras (principalmente saturadas), açúcares e alimentos refinados (CARVALHO; ALFENAS, 2008). Por outro lado, em termos genéticos, são conhecidos hoje mais de 250 genes, marcadores e regiões cromossômicas que estão associados à obesidade.

Além disso, vários fatores ambientais são capazes de ativar ou silenciar genes envolvidos no processo da patogênese da obesidade. Esses fatores ambientais que interagem com o genoma são chamados de fatores epigenéticos e ocupam

importante papel, uma vez que podem modular a expressão de vários genes (LEITE; ROCHA; BRANDÃO, 2009).

A obesidade apresenta como característica um aumento de gordura corporal e, os recentes avanços no campo da endocrinologia e metabolismo mostram que, ao contrário do que se acreditava há alguns anos, o adipócito não é apenas uma célula de armazenamento de energia, mas também sintetiza e libera diversas substâncias, incluindo o hormônio leptina (PÉREZ *et al.*, 2008).

O conhecimento sobre o hormônio da leptina trouxe novas perspectivas para os mecanismos fisiopatológicos da obesidade e doenças associadas. Os estudos iniciais da leptina mostraram que ela regula o apetite e aumenta o gasto energético pela ativação da atividade nervosa simpática no tecido adiposo marrom termogênico. Além disso, a leptina, também controla o sistema hematopoiético, o sistema imune, o sistema reprodutor e o sistema cardiovascular (ROMERO; ZANESCO, 2006).

A leptina influencia a regulação do apetite via sistema nervoso central e tem sido relacionada com a resistência à leptina e ao aumento dos níveis séricos de leptina. A resistência à leptina explica porque administrações exógenas de leptina não se mostram eficientes no controle de peso em pacientes obesos em humanos. Em modelos animais, camundongos *knockout* para o gene codificador da leptina (*ob/ob*) não expressam o hormônio leptina e apresentam um fenótipo que inclui, entre outras características a obesidade (RIESTRA *et al.*; 2010; CARRILLO *et al.*, 2013).

1.1 Tema

Relação entre os polimorfismos G2548A, no gene codificador da leptina (*LEP*), e Gln223Arg, no gene codificador do receptor da leptina (*LEPR*), com parâmetros antropométricos, parâmetros bioquímicos e com o consumo alimentar de carboidratos.

1.2 Problema

Existe influência dos polimorfismos G2548A, no gene *LEP*, e Gln223Arg, no gene *LEPR*, nos parâmetros antropométricos, bioquímicos e no consumo alimentar de carboidratos de uma amostra de mulheres adultas?

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo geral

Investigar a influência dos polimorfismos G2548A, no gene *LEP*, e Gln223Arg, no gene *LEPR*, nos parâmetros antropométricos, bioquímicos e no consumo alimentar de carboidratos de uma amostra de mulheres adultas.

1.3.2 Objetivos específicos

- Avaliar os parâmetros bioquímicos de glicemia, colesterol total, HDL, LDL e triglicerídeos;
- Avaliar os parâmetros antropométricos IMC, circunferência da cintura, relação cintura quadril e percentual de gordura;
- Analisar o consumo alimentar das participantes, através do recordatório 24 horas;
- Determinar as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos G2548A, no gene *LEP*, e Gln223Arg, no gene *LEPR*;

- Avaliar a influência dos polimorfismos supracitados nos parâmetros antropométricos, bioquímicos e no consumo de carboidratos.

1.4 Justificativa

O aumento da prevalência da obesidade em todo mundo e o risco aumentado no desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis se constitui como um dos mais importantes fenômenos clínico-epidemiológico da atualidade. A obesidade tem sido associada a alterações metabólicas, as quais contribuem para o aumento do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares. O acúmulo excessivo de tecido adiposo parece ser fator responsável por essa situação, principalmente quando este tecido se acumula na região abdominal. Assim, várias desordens no metabolismo de carboidratos, como resistência à insulina, no metabolismo de lipídios, como hipertrigliceridemia, aumento dos níveis de colesterol total e LDL (lipoproteína de baixa densidade) e diminuição dos níveis de HDL (lipoproteína de alta densidade), e ainda, alterações nos níveis pressóricos, têm sido identificadas em indivíduos com excesso de gordura corpórea (SERRANO *et al.*, 2010).

Doenças influenciadas por polimorfismos genéticos também são multifatoriais, pois são causadas por um grande conjunto de fatores ambientais e pelo somatório de vários alelos de diferentes genes relacionados, aumentando a suscetibilidade para a patologia (SCHUCH *et al.*, 2010).

A leptina é um hormônio proteico, sintetizado pelos adipócitos, cuja função principal é informar ao hipotálamo o estado nutricional do organismo, regulação da massa de gordura e da termogênese através de mecanismos de *feedback* negativo (GOMES, 2012).

Alguns polimorfismos no gene da leptina (*LEP*) e no gene do receptor da leptina (*LEPR*) vêm sendo fortemente relacionados com obesidade, aumento do índice de massa corporal (IMC) e outras manifestações decorrentes da obesidade.

Entretanto esses dados parecem estar relacionados com a etnia, o gênero e fatores ambientais. Portanto, estudos com estes polimorfismos na população brasileira devem ser desenvolvidos para elucidar a ação dos mesmos (RIESTRA, *et al.*, 2010).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Obesidade

A obesidade é um dos principais problemas de saúde pública em todo o mundo, mesmo em países em desenvolvimento. Sua prevalência tem aumentado dramaticamente nas últimas décadas, chegando a proporções epidêmicas (VUCENIC, 2012).

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2013) estimam que pelo menos um bilhão de pessoas apresente excesso de peso, das quais, 300 milhões são obesos. Inquéritos nacionais realizados nas últimas décadas estimam que a obesidade atingirá em 2025, 40% da população nos EUA, 30%, na Inglaterra, e 20%, no Brasil (CONDE; BORGES, 2011).

No Brasil, o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) publicou, em agosto de 2010, os dados da Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF 2008–09), demonstrando que o peso dos brasileiros vem aumentando. O excesso de peso em homens adultos saltou de 18,5% para 50,1%, e em mulheres, foi de 28,7% para 48%. Os valores de obesidade atingiram 12,4% entre os homens e 16,9% entre as mulheres brasileiras.

A obesidade provoca sérias consequências sociais, físicas e psicológicas. As consequências físicas estão diretamente associadas a maiores riscos de morbidade e mortalidade, bem como doenças crônicas como hipertensão arterial, diabetes *mellitus* tipo 2 e dislipidemias (MOTA; ZANESCO, 2007).

O aumento global da obesidade tem sido em grande parte impulsionado por mudanças de estilo de vida e do meio ambiente. Apesar disso, a variação genética desempenha um papel importante na determinação das diferenças interindividuais na susceptibilidade ou resistência ao ambiente obesogênico atual, que se caracteriza pela facilidade de acesso a alimentos de alto teor calórico e gasto reduzido de energia. Estudos com gêmeos e de adoção demonstraram que a herdabilidade da obesidade é de cerca de 40-70%, embora seja possível que essas estimativas atuais possam estar aumentando (FERNANDES *et al.*, 2011; D'ANGELO; KOIFFMANN, 2012).

Os fatores de risco para obesidade apresentam como determinantes biológicos a idade, em especial a faixa etária dos 30 aos 50 anos, e o sexo. Para as mulheres, destacam-se como fatores contributivos a alta paridade, para aquelas em idade reprodutiva, a incorporação no mercado de trabalho e o menor esforço dispensado no trabalho doméstico, condição favorecida pela disponibilidade de eletrodomésticos modernos (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

2.2 Consumo de carboidratos

O conceito de interação entre gene e nutriente descreve a modulação dos efeitos dos componentes dietéticos em um fenótipo específico, associado a um polimorfismo genético. Uma revisão realizada por Steemburgo e colaboradores (2009) mostrou que os principais nutrientes que modulam o fenótipo de indivíduos portadores de genótipos associados à obesidade e diabetes *mellitus* tipo 2 são as gorduras, carboidratos e fibras. A maioria desses estudos destaca o consumo de gordura total, saturada e *trans* como fatores de risco associados à presença desses

genótipos de risco. Por outro lado, o consumo de gordura poli-insaturada, monoinsaturada e do ácido graxo eicosapentanoico (EPA) apresentaram efeitos benéficos. Já consumo de carboidratos refinado pode ser um fator de risco em fenótipos associados à obesidade (STEEMBURGO *et al.*, 2009).

Os efeitos das dietas ricas em carboidratos (HC), especialmente os carboidratos refinados, podem aumentar a incidência de sobrepeso e obesidade, gerando um estado metabólico que pode favorecer o agravamento da dislipidemia aterogênica, caracterizada pela elevação de triglicerídeos, redução dos níveis de colesterol HDL-c e aumento das concentrações de colesterol LDL-c (BORTOLI *et al.*, 2011).

Dietas ricas em HC podem aumentar a leptinemia, devido ao aumento da insulina e conseqüente aumento da captação e metabolização da glicose no tecido adiposo, mecanismo estimulante da secreção de leptina. Em adipócitos, a leptina é dependente da captação de glicose e de seu metabolismo, o que suporta a hipótese de que mudanças na secreção de leptina, depois de restrição energética ou realimentação, refletem a redução ou aumento na captação da glicose no tecido adiposo, respectivamente (HERMSDORFF 2006).

Mulheres apresentam várias alterações hormonais ao longo do ciclo menstrual. De acordo com a *National Association for Premenstrual Syndrome*, mais de 90% das mulheres que menstruam experimentam alguma mudança pré-menstrual. No quesito alimentação, Santos e colaboradores (2011) demonstraram em seu estudo que as mulheres apresentaram maior consumo de alimentos doces, açúcares, óleos e gorduras na fase lútea do ciclo menstrual (SANTOS *et al.*, 2011).

Costa e colaboradores (2007) detectaram em seu estudo, realizado em Santa Catarina com mulheres adultas, que as mesmas sentiam mais vontade de comer alimentos doces na fase lútea do ciclo. Esse aumento na vontade de alimentos doces e ricos em calorias pode levar a um aumento na ingestão de calorias de até 87% nesse período que antecede o período menstrual (COSTA *et al.*, 2007).

2.3 Tecido adiposo

O tecido adiposo é o principal reservatório de energia do organismo. Nos mamíferos, existem dois tipos de tecido adiposo: o branco e o marrom (LEITE; ROCHA; BRANDÃO, 2009).

O tecido adiposo marrom tem a função de produzir calor (termogênese) e, portanto, participa ativamente na regulação da temperatura corporal. No entanto, seus depósitos são praticamente ausentes em humanos adultos, mas são encontrados em fetos e recém-nascidos (FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2006).

O tecido adiposo branco armazena energia na forma de triglicerídeos e participa da regulação do balanço energético mediante processos de lipogênese e lipólise. Tem por função oferecer proteção mecânica contra choques e traumatismos externos, e permitir um adequado deslizamento entre vísceras e feixes musculares, sem comprometer a integridade e funcionalidade dos mesmos. É um excelente isolante térmico tendo papel importante na manutenção da temperatura corporal (FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2006. LEITE; ROCHA; BRANDÃO, 2009).

Sabe-se atualmente que o tecido adiposo branco também tem uma importante atuação endócrina, através da secreção de substâncias denominadas adipocitocinas ou adipocinas (PÉREZ *et al.*, 2008). Muitos fatores relacionados às adipocinas afetam a ingestão alimentar e inúmeros outros processos do corpo humano, além de se relacionarem na etiologia da obesidade (YU *et al.*, 2011).

2.4 Leptina e receptor da leptina

A leptina é uma adipocina composta por 167 aminoácidos, com peso de 16 kDa, codificada pelo gene da leptina (*LEP*), que está localizado no cromossomo 7q31 (FIGURA 1). O gene *LEP* consiste de três éxons, separados por dois íntrons,

sendo que a região de codificação da proteína se localiza no éxon 2 e 3 (PÉREZ *et al.*, 2008).

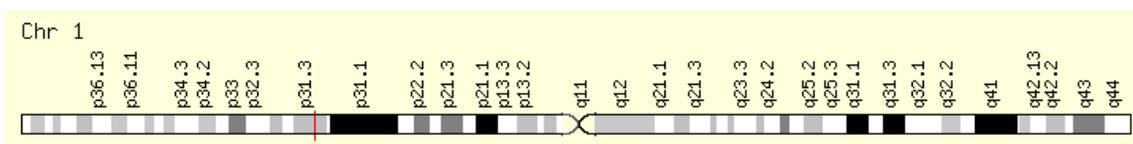
Figura 1 – Localização genômica do gene *LEP*



Fonte: Gene Card, 2014

A sinalização da leptina depende de sua ligação a um receptor monomérico transmembrana, da família dos receptores de citocina da classe I, sendo que seis diferentes isoformas proteicas deste receptor foram descritas (ObRa, ObRb, ObRc, ObRd, ObRe, ObRf). As seis formas são codificadas, via *splicing* alternativo, por um único gene (*LEPR*), localizado no locus cromossômico 1p31 (FIGURA 2). O gene *LEPR* tem tamanho de 70 kb e contém 20 éxons (VELLOSO, 2006).

Figura 2 – Localização genômica do gene *LEPR*



Fonte: Gene Card, 2014

A leptina apresenta características estruturais de citocina. É produzida predominantemente pelo tecido adiposo branco e apresenta relação proporcional direta à massa corporal deste tecido. Porém, a leptina é também expressa, em níveis mais baixos, em outros tecidos, como estômago, placenta, glândulas

mamárias, hipotálamo e hipófise (CONSTANTIN E COSTACHER, 2010). As funções biológicas da leptina incluem a homeostase de energia, a regulação da homeostase da glicose, a reprodução, o crescimento e a resposta imune (SCHWARTZ; BASKIN, 2013).

Os hormônios sexuais, que respondem pela diferente distribuição de gordura em homens e mulheres, também apresentam relação com a leptina. Foi observado que a concentração de leptina é duas a três vezes maior em mulheres que em homens, mesmo mantendo-se o mesmo IMC ou o percentual de gordura corporal (MIYAMOTO *et al.*, 2008). Isso porque foi comprovado que a leptina é influenciada por hormônios esteroides e pode agir estimulando hormônio luteinizante (LH). Estudo em humanos demonstrou que as meninas apresentaram concentrações séricas de leptina mais alta que meninos durante e depois da puberdade (ANDRETTI, 2006).

Goumenou e colaboradores (2003) encontraram relação positiva entre redução da leptina com secreção de LH, sugerindo que a leptina possui mecanismo envolvido na secreção de gonadotróficos (GOUMENOU *et al.*, 2003).

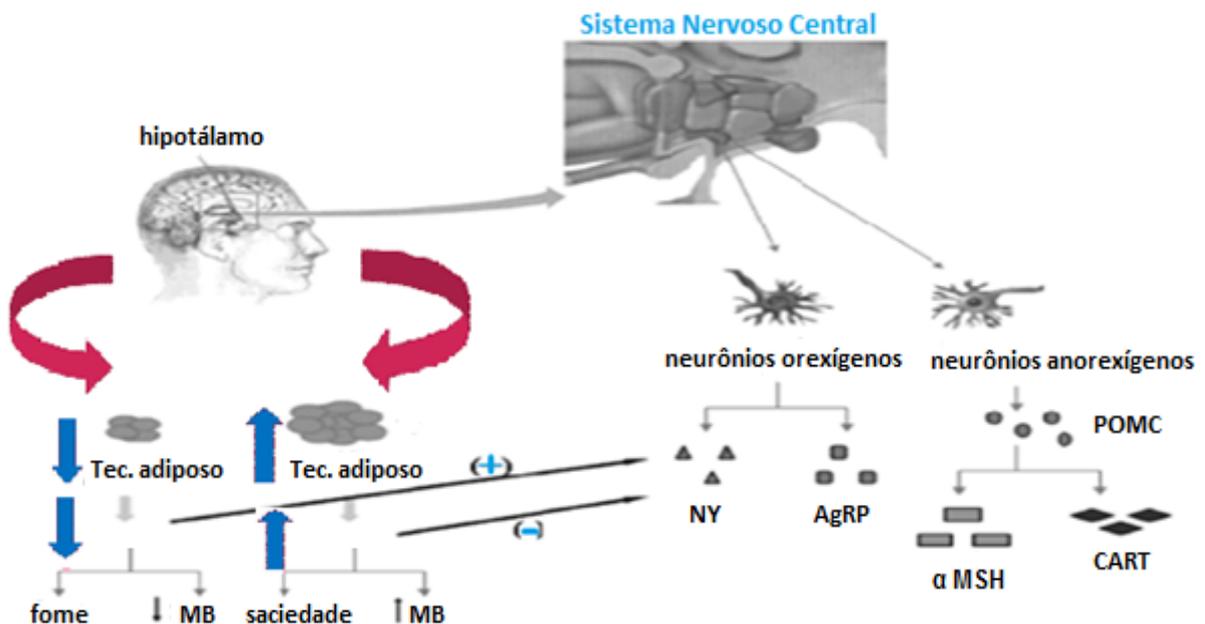
Vários estudos têm sugerido que as variações nos genes *LEP* e *LEPR* podem ser importantes na fisiopatologia da obesidade humana (HINUY *et al.*, 2010) e na modulação do metabolismo dos lipídios e da glicose (JACKSON *et al.*, 2012).

2.4.1 Ação da leptina no sistema nervo central e sinalização intracelular da leptina

O núcleo arqueado (ARC) encontra-se dentro do hipotálamo, numa área de integração entre os diversos sinais oriundos da periferia e do tronco cerebral, determinando ações para controlar o balanço energético do organismo. A leptina é um dos sinais que provém do tecido adiposo, informando o cérebro sobre os estoques de gordura do corpo. A leptina inibe, no ARC, a produção de dois potentes neurotransmissores orexígenos: Neuropeptídeo Y (NPY) e a proteína relacionada ao

gene Agouti (AgRP) e estimula neurotransmissores anorexígenos o pró-ópio-melanocortina (POMC) e transcritos relacionados à anfetamina e cocaína (CART) como pode ser observado na FIGURA 3 (DAMIANI e DAMIANI, 2011).

Figura 3: Ação da leptina no Sistema Nervoso Central



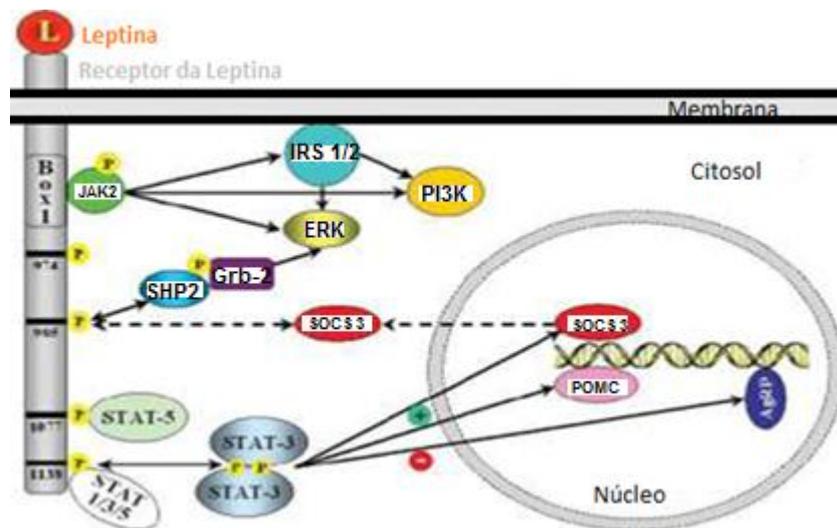
Fonte: Adaptado de Ribeiro *et al*, 2007

A sinalização intracelular da leptina é desencadeada pela ligação da leptina no seu receptor, que promove a ativação de Janus quinase 2 (JAK2), o qual leva à fosforilação de três resíduos de tirosina em LEPR e à ativação da via JAK2/STAT3. O STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) é recrutado pelo receptor e fosforilado, resultando no aumento de sua translocação para o núcleo. No núcleo, o STAT3 liga-se a regiões promotoras de genes orexígenos, peptídeo relacionado ao gene agouti (*AGRP*) e neuropeptídeo Y (*NPY*), e anorexígenos, proopiomelanocortina (*POMC*) e transcritos relacionados à anfetamina e cocaína (*CART*). Esta via também ativa a transcrição do gene supressor de sinalização de

citocinas (SOCS3), que atua inibindo a fosforilação de LEPR e/ou pela sua ligação direta em JAK2 e STAT3. Outro mecanismo de inibição ocorre pela defosforilação de JAK2, mediada pela tirosina fosfatase PTB-1B (GUO *et al.*, 2013).

A leptina também estimula a via fosfatidil inositol 3 quinase (PI3K) pelo substrato do receptor da insulina (IRS). Esta via está envolvida na ativação de genes e modificação da atividade celular pela despolarização de canais iônicos (MORRIS, 2009).

Figura 4 – Sinalização intracelular da leptina



Fonte: Adaptado de Fruhbeck, 2006

2.4.2 Ações periféricas da leptina

Além de a leptina desempenhar a função de balanço energético no sistema nervoso central ela também desempenha ações periféricas (RIESTA *et al.*, 2010), tais como:

- a) Sistema Reprodutivo: Em ratos *ob/ob*, a administração de leptina leva ao aumento da secreção de gonadotrofinas com retorno da fertilidade, indicando a ação dessa proteína na função gonadal e na fertilidade (HERMSDORFF *et al.*, 2006).
- b) Níveis de pressão arterial: Foi demonstrado que a leptina age diretamente no rim, aumentando a excreção renal de sódio e a produção de óxido nítrico, o que pode resultar em queda dos níveis pressóricos (ação depressora). Por outro lado a leptina também gera excitação simpática no rim que, por sua vez, aumenta os níveis da pressão arterial (BOER-MARTINS *et al.*, 2012; MARCHI-ALVES *et al.*, 2010).
- c) Sistema Imune: Receptores para leptina são expressos nas células hematopoiéticas e agem sinergicamente com outras citocinas melhorando a proliferação de leucócitos, especificamente das células T4 (HERMSDORFF *et al.*, 2006).
- d) Homeostase da glicose: Foi constatado que existem receptores de leptina no pâncreas e que esta reduz a excreção de insulina e a hiperinsulinemia em ratos *ob/ob*. Alguns achados sugerem que a leptina tem um poder inibitório agudo e efetivo na secreção pancreática de insulina (EMILSSON *et al.*, 1997) Além disso, ao se avaliar as proteínas ativadas pela leptina e pela insulina na sinalização celular no hipotálamo, fica evidente que ambas atuam sobre vias celulares semelhantes. Esta sobreposição de vias de sinalização sugere que ambos os hormônios controlam de forma recíproca os efeitos gerados pelo outro. Este fenômeno de comunicação entre vias de sinalização denomina-se *cross-talk* molecular (VELLOSO, 2006).

Figura 5 – Funções da leptina

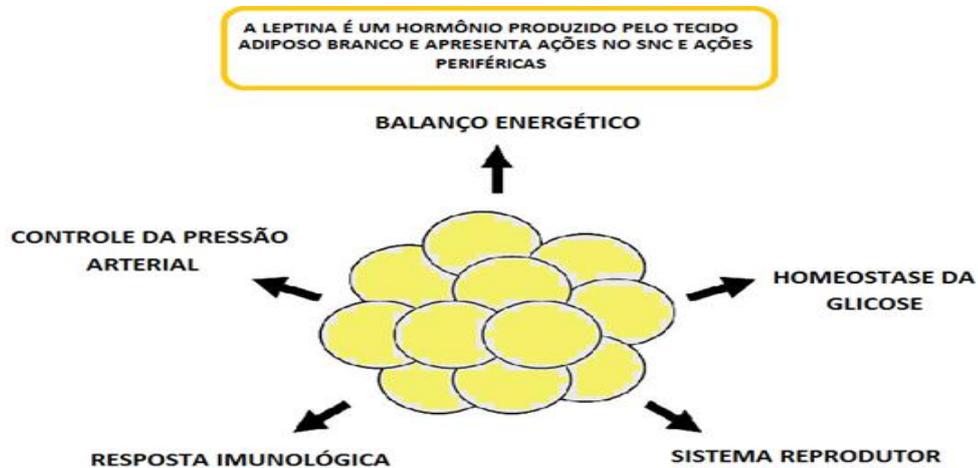


Imagem desenvolvida pela autora

2.4.3 Polimorfismos nos genes *LEP* (rs7799039) e *LEPR* (rs1137101)

O polimorfismo G2548A (rs7799039) consiste em uma troca de um único nucleotídeo que substitui uma adenina (A) por uma guanina (G) na região promotora do gene da *LEP* (LIU, 2011). A frequência alélica em europeus segundo o Projeto International HapMap é G: 0,51 e A: 0,48. (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>, acesso em setembro de 2014).

Segundo Hoffstedt, esse polimorfismo influencia na expressão gênica da leptina avaliada em células adiposas (*in vitro*). Esse estudo demonstrou que indivíduos com genótipo AA apresentaram níveis de RNA mensageiro (RNAm) 60% maiores que os genótipos GA e /GG. Além disso, indivíduos portadores do genótipo AA apresentaram maiores níveis de leptina plasmática quando comparados com indivíduos portadores dos genótipos GA e /GG (HOFFSTEDT *et al.*, 2002).

O polimorfismo Gln223Arg (rs1137101) consiste em uma troca de um único nucleotídeo, que substitui uma adenina (A) por uma guanina (G), no gene da *LEPR*, ocasionando a troca de um aminoácido glutamina (Gln) por um aminoácido arginina

(Arg), no códon 223 do éxon 6 (SANTOS, 2005). A frequência do alelo A deste polimorfismo tem sido maior que a do alelo G em europeus (A: 0,52 e G: 0,47), segundo o Projeto International HapMap (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>, acesso em setembro de 2014).

Tabela 1 – Estudos realizados com os polimorfismos Gln223Arg e G2548A

Polimorfismo	N da amostra	País	Principais Achados	Referência
rs1137101	280 mulheres caucasianas	Bélgica	Neste estudo avaliaram-se três polimorfismos, incluindo o Gln223Arg. Este estudo não encontrou associação entre este polimorfismo com o IMC, peso ou gordura corporal. Mulheres homozigotas GG apresentaram maior acúmulo de gordura abdominal, quando comparadas com homozigotas AA.	Wauters, M. <i>et al.</i> , 2001
rs1137101	89 eutróficos 29 sobrepeso/ obesidade	Grécia	O genótipo AA do polimorfismo Gln223Arg foi associado com obesidade (aumento de IMC e % de gordura corporal).	Yiannakouries, N. <i>et al.</i> , 2001
rs1137101	260 idosos de ambos os gêneros	Brasil	Este estudo não encontrou associação entre os genótipos do polimorfismo Gln223Arg com o IMC, perfil lipídico ou com os níveis de pressão arterial.	Santos, 2005
rs1137101	Adolescentes: 55 obesos 48 não obesos	México	Não foi encontrada diferença significativa nas frequências genóticas do polimorfismo Gln223Arg entre obesos e não obesos. Porém, o genótipo GG apresentou uma alta prevalência em indivíduos com níveis de insulina maiores que 100pmol/l. Os adolescentes com esse perfil de insulina (maiores que 100pmol/l) também apresentaram maiores níveis de leptina, aumento de IMC e pressão arterial.	Guízar-Mendoza, JM. <i>et al.</i> , 2005
rs1137101	150 não obesos 200 obesos	Brasil RJ	Os resultados demonstraram uma associação entre o polimorfismo Gln223Arg e a obesidade (aumento de IMC).	Duarte, SFP. <i>et al.</i> , 2006
rs1137101	Homens: 40 eutróficos 45 sobrepeso 44 obesos	USA	Indivíduos obesos apresentaram maior frequência do genótipo AA do polimorfismo Gln223Arg. O genótipo AA também foi associado com aumento de IMC, circunferência da cintura e de leptina plasmática.	Masuo, K. <i>et al.</i> , 2008
rs1137101	400 homens	UK	Estudo demonstrou que homens com genótipo GG do polimorfismo	Doukas, <i>et al.</i> , 2013

			Gln223Arg apresentavam menos saciedade após a alimentação que indivíduos com genótipo AA.	
rs1137101	284 diabéticos 281 não diabéticos (Multiétnico: Malásios, Chineses e Indianos)	Malásia	Este estudo mostrou que a frequência do genótipo GG do polimorfismo Gln223Arg foi significativamente superior em diabéticos do que em não diabéticos, mas apenas em Chineses. Em Indianos e Malásios não foi encontrada diferença significativa.	Etemad, A. <i>et al.</i> , 2013
rs1137101 e rs7799039	Caucasianos: 303 obesos 606 não obesos	Espanha	Este estudo não encontrou associação entre o polimorfismo G2548A e risco de obesidade. Também não obteve diferença significativa com IMC, circunferência da cintura, circunferência do quadril e perfil lipídico. Em contrapartida, o estudo encontrou associação significativa do polimorfismo Gln223Arg com o risco de obesidade. O genótipo AA, após ajuste de co-variáveis (educação, tabagismo, consumo de álcool e atividade física), mostrou-se associado com uma diminuição no risco de obesidade.	Portolés, O. <i>et al.</i> , 2006
rs1137101 e rs7799039	226 obesos sendo 33 obesos extremos 182 não obesos	Taiwan	O genótipo homocigoto GG, do polimorfismo G2548A, foi associado com obesidade extrema (IMC ≥ 35 kg/m ²). Porém, esse genótipo não foi associado com obesidade moderada. A média de circunferência da cintura foi significativamente maior em indivíduos com o genótipo GG, do polimorfismo G2548A, quando comparados com heterocigotos (G/A) ou homocigoto (AA), no grupo dos obesos.	Wang, <i>et al.</i> , 2006
rs1137101 e rs7799039	150 não obesos 200 obesos	Brasil RJ	Os resultados do estudo sugerem que o polimorfismo Gln223Arg está associado com o aumento de IMC. Um haplótipo contendo os polimorfismos Gln223Arg e G2548A foi associado com o aumento do risco para obesidade.	Duarte, SFP. <i>et al.</i> , 2007
rs1137101 e rs7799039	202 obesos	Romania	O genótipo GG do polimorfismo G2548A foi associado com aumento do risco para obesidade, após ajuste de co-variáveis (idade e sexo). Esse mesmo genótipo foi associado ao aumento de leptina sérica, após ajuste de co-variáveis (idade, sexo e IMC).	Constantin, A. <i>et al.</i> , 2010

Portadores do alelo A, do polimorfismo Gln223Arg, apresentaram níveis maiores de triglicerídeos e glicose, após ajuste de co-variáveis (idade, sexo e IMC).

rs1137101 e rs7799039	160 obesos e 169 não obesos	Tunísia	O genótipo AA do polimorfismo G2548A apresentou associação significativa com o aumento de IMC, de circunferência da cintura, de colesterol total e com a diminuição de HDL-c. O genótipo GG do polimorfismo Gln223Arg apresentou associação significativa com aumento do colesterol total, glicemia, insulina e com a diminuição de HDL-c.	Boumaiza, I. <i>et al.</i> , 2012
rs1137101 e rs7799039	148 obesos e 178 não obesos	Brasil	O genótipo GG do polimorfismo Gln223Arg e lipídios séricos aumentados foram associados com obesidade.	Oliveira, R. <i>et al.</i> , 2013
rs1137101 e rs7799039	160 adultos de ambos os sexos	México	Este estudo não encontrou associação significativa entre os genótipos dos polimorfismos Gln223Arg e G2548A e o IMC, relação cintura quadril, e percentual de gordura corporal.	Carrillo, VJP. <i>et al.</i> , 2013
rs1137101 e rs7799039	Multi-étnico (Malásios, Índios e Chineses) 190 obesos e 218 não obesos	Malásia	Quatro polimorfismos foram avaliados, incluindo o Gln223Arg e G2548A. Os genótipos de ambos não foram associados com obesidade. G2548A não apresentou associação com nenhuma variável antropométrica ou clínica investigada, mesmo após ajustes de covariáveis. Ao ajustar para grupos étnicos, para o polimorfismo Gln223Arg, demonstrou-se que indivíduos homocigotos AA apresentaram níveis de pressão significativamente menores, quando comparados com homocigotos GG. Os indivíduos com genótipo GG também apresentaram maiores índices de adiposidade (↑ de IMC, ↑ de percentual de gordura corporal e ↑ de gordura visceral), quando comparados com indivíduos com genótipo AA. O percentual de músculo esquelético foi significativamente menor em indivíduos com genótipo GG, quando comparados com AA.	Fan and Say. 2014

rs7799039	109 sobrepeso 314 eutróficos	França	O estudo encontrou uma frequência maior do alelo G no grupo sobrepeso, porém quando reajustado para gênero este alelo foi associado apenas a homens com sobrepeso.	Mammès, O. <i>et al.</i> , 2000
rs7799039	118 indivíduos saudáveis	Grécia	Dois polimorfismos foram estudados, incluindo o G2548A. O estudo não encontrou associação significativa entre os polimorfismos e IMC, % de gordura corporal e relação cintura quadril. Porém encontrou significância com níveis mais elevados de leptina livre em portadores do genótipo G/A.	Yiannakouris, <i>et al.</i> , 2003
rs7799039	Mulheres: 100 obesas 128 não obesas	Brasil SP	Mulheres portadoras do alelo G do polimorfismo G2548A apresentaram quatro vezes maior risco de ter obesidade, após ajuste de co-variáveis (idade, hipertensão, doença arterial coronariana, tabagismo e atividade física). O alelo G também foi relacionado com ↑ do IMC e ↑ da leptina plasmática. Não foi encontrada associação entre o polimorfismo e hipertensão, hiperglicemia, dislipidemia e doença arterial coronariana.	Hinuy, <i>et al.</i> , 2008
rs7799039	880 Adolescentes de ambos os sexos	Espanha	Meninos com genótipo AA apresentaram níveis menores de leptina, quando comparados com genótipo AG e GG. A circunferência de quadril também foi menor em genótipos AA, quando comparados com GG. Além disso, o genótipo AA apresentou valores menores de IMC, circunferência da cintura e percentual de gordura corporal. Não foi observada diferença significativa na relação cintura quadril. Meninas com genótipo AA também apresentaram menores níveis de leptina, IMC e circunferência do quadril, quando comparadas com genótipo GG. Não foi observada diferença significativa na relação cintura quadril e no percentual de gordura corporal.	Reistra, P. <i>et al.</i> , 2010
rs7799039	100 obesos 110 não obesos	Brasil	Portadores do alelo G no polimorfismo G2548A revelaram um risco oito vezes maior de ter obesidade quando comparados com genótipo AA. O estudo não encontrou associação entre o polimorfismo e hipertensão, hiperglicemia e dislipidemia.	Hinuy, <i>et al.</i> , 2010

IMC: Índice de massa corporal. Tabela elaborada pela autora.

3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

O presente estudo fez parte dos estudos desenvolvidos pelo grupo “Aspectos nutrigenéticos de parâmetros bioquímicos e antropométricos: implicações para saúde humana”, vinculado ao programa de Pós Graduação Scricto Sensu Mestrado em Biotecnologia do Centro Universitário Univates. É classificado como um estudo transversal e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário UNIVATES, sob protocolo número 110/11.

A amostra foi composta por 378 mulheres adultas, atendidos no Ambulatório de Nutrição da UNIVATES. As mesmas foram abordadas e convidadas a participar do estudo, sendo que, as que aceitaram, assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO 1) .

3.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos na pesquisa indivíduos do sexo feminino, maiores de 18 anos, com vínculo com a UNIVATES, acompanhados no grupo “Aspectos nutrigenéticos de parâmetros bioquímicos e antropométricos: implicações para saúde humana”, e que assinaram o TCLE.

3.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos os indivíduos os que não apresentaram condições de compreender ou assinar o TCLE, gestantes, soropositivos, pacientes com câncer e usuários de medicamentos que interfiram nos níveis glicêmicos, lipídicos e inibidores de apetite.

3.3 Anamnese e recordatório 24 horas

As participantes da pesquisa foram inicialmente avaliadas por estagiárias do Curso de Graduação em Nutrição, do Centro Universitário Univates, que aplicaram uma anamnese (ANEXO 2), coletando dados de estilo de vida e de hábitos alimentares. Nesta anamnese foi realizado o recordatório alimentar de 24 horas, um método de consumo alimentar classificado como retrospectivo. Este método consiste em quantificar todo o consumo de alimentos nas 24 horas anteriores à entrevista, ou durante o dia anterior (COSTA *et al.*, 2006). O registro alimentar de 24 horas é o mais comumente utilizado, por ser um instrumento bem aceito pelos entrevistados, pelo curto tempo de administração, baixo custo e por não promover alterações na dieta habitual do indivíduo (BEATON, 1994). Este recordatório teve por objetivo quantificar a média de carboidratos (HC) consumidos pelas participantes.

O recordatório de 24 horas foi avaliado pelo software *DietWin Profissional 2.0*, para determinar o valor e a composição de macro e micronutrientes da dieta. O valor de referência para o consumo de HC foi a DRIs (*Dietary Reference Intakes*, 1997).

3.4 Medidas antropométricas

As medidas antropométricas foram realizadas por pessoal qualificado e previamente treinado. As medidas coletadas foram: peso, altura, circunferência da cintura e circunferência do quadril.

O peso foi aferido por balança de precisão marca Welmy, em superfície plana. As participantes foram orientadas a ficarem descalças, vestirem avental e retirarem adornos.

A altura foi aferida com a utilização de estadiômetro compacto, da marca *Wiso*, com haste fixa, em parede, sem rodapé e com piso não acarpetado. As participantes foram orientadas a ficarem descalças e sem adornos na cabeça.

O índice de massa corporal (IMC) foi determinado pela divisão do peso, em quilogramas, pelo quadrado da altura, em metros (kg/m^2), e classificado segundo as recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS) em: $< 18,5 \text{ kg/m}^2$ (baixo peso); $18,5$ a $24,9 \text{ kg/m}^2$ (normal); 25 a $29,9 \text{ kg/m}^2$ (sobrepeso); e $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ (obesidade) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1995).

A medida da circunferência da cintura (CC) foi realizada com fita métrica inextensível, marca *Cescorf*, no nível natural da cintura, ponto médio entre a crista ilíaca anterior superior e a última costela, com precisão de 0,1 cm. Os valores considerados ideais serão valores abaixo de 80,0 cm para as mulheres (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1997).

A circunferência do quadril foi aferida no ponto de maior protuberância dos glúteos, com o auxílio de fita métrica inelástica, de material resistente e flexível, da marca *Cescorf*.

A razão cintura-quadril (RCQ) foi obtida pela divisão dos perímetros da cintura (cm) e do quadril (cm). O valor encontrado pode ser utilizado como indicador para gordura visceral e ser considerado um indicador de risco para doença cardiovascular. De acordo Lohman e colaboradores (1988), os pontos de corte de risco são $\geq 0,85$ para mulheres.

3.5 Percentual de gordura corporal

O percentual de gordura corporal foi obtido pela impedância bioelétrica horizontal (Biodynamics), onde as participantes seguiram as seguintes orientações: jejum, ausência de cafeína por 24 horas e de álcool por 48 horas, bexiga vazia, não ter praticado atividade física um dia antes do teste e não estar em período menstrual. O percentual de gordura corporal foi utilizado para classificar o indivíduo segundo a composição corpórea. A referência de percentual de gordura se deu segundo Pollock e Wilmore (1993), sendo ideal de 23 a 25% para o sexo feminino, na faixa etária da amostra.

3.6 Exames laboratoriais

A coleta de sangue para as análises bioquímicas (perfil lipídico e glicose de jejum) foi realizada por pesquisadores treinados, fazendo uso de material descartável e de EPI's (Equipamentos de Proteção Individual), para evitar qualquer possibilidade de contaminação. Às participantes da pesquisa foi requisitado estarem em jejum de, no mínimo, doze horas.

As dosagens do perfil lipídico, Colesterol Total (CT), Triglicerídeos (TG) e lipoproteína de alta densidade (HDL-c), e da glicose jejum foram realizadas de acordo com o protocolo do kit comercial Bioclin®, em equipamento automatizado Mindray BS120, no Laboratório de Análises Clínicas da Instituição, por método enzimático colorimétrico. A lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) foi calculada através da Equação de Friedewald (1972): colesterol LDL (mg/dL) = Colesterol total - colesterol HDL - (Triglicerídeos/5).

Os valores de referência para a glicose de jejum foram avaliados de acordo com as Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: até 99 mg/dl normal, de 100-125 mg/dl pré-diabetes e maior que 125 mg/dl diabetes. (DIRETRIZES DA

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2012-1013). O perfil lipídico teve por referência a V Diretriz Brasileira de Dislipidemias, onde o colesterol total deve ser < que 200 mg/dl; o LDL-c < 130 mg/dl; o HDL-c > 60 mg/dl e os triglicerídeos < 150 mg/dl. (V DIRETRIZ BRASILEIRA DE DISLIPIDEMIAS E PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE DO DEPARTAMENTO DE ATEROSCLEROSE DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2013).

3.7 Extração do DNA e amplificação dos polimorfismos

Para as análises moleculares dos polimorfismos, rs7799039 e rs1137101, foi extraído o DNA genômico, a partir do sangue total, de acordo com um protocolo de extração de DNA adaptado da técnica descrita por Lahiri e Nurnberger (1991).

Os polimorfismos foram amplificados pela técnica de discriminação alélica TaqMan (*Applied Biosystems, Foster City, CA*), em equipamento de PCR em Tempo Real *StepOne (Applied Biosystems)*, de acordo com o protocolo do fabricante.

3.8 Análise estatística

As frequências alélicas foram estimadas por contagem direta e o Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi calculado com base nessas frequências pelo teste do qui-quadrado. A comparação das características clínicas, laboratoriais e antropométricas da amostra entre os diferentes genótipos foi realizada através do teste do qui-quadrado (variáveis categóricas) ou através de modelos lineares univariados (variáveis contínuas). Variáveis que não seguiam a distribuição normal foram logaritimizadas. Em caso de resultados significativos, comparações *post-hoc* foram realizadas pelo teste de Tukey.

4 RESULTADOS

A idade média da amostra foi de 25,1 anos ($\pm 6,2$). As frequências alélicas da variante rs7799039 foram 0,58 (G) e 0,42 (A) e para o polimorfismo rs1137101 foram 0,57 (A) e 0,43 (G). As frequências genotípicas, em ambos os polimorfismos, não revelaram um desvio significativo dos valores esperados para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg. As frequências alélicas genotípicas estão descritas na TABELA 2.

Tabela 2 – Frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos investigados

Genótipo	n (%)	Valor P ^a
<i>LEP</i> rs7799039	GG	129 (34,1)
	GA	181 (47,9)
	AA	68 (18,0)
	Alelo G	0,58
	Alelo A	0,42
<i>LEPR</i> rs1137101	AA	122 (32,3)
	GA	189 (50,0)
	GG	67 (17,3)
	Alelo A	0,57
	Alelo G	0,43

^a Equilíbrio de Hardy-Weinberg

As comparações entre as variáveis clínicas, laboratoriais e antropométricas da amostra, entre os diferentes genótipos, para ambos os polimorfismos, estão descritas na TABELA 3. Não foram observadas associações significativas com o consumo de álcool e nicotina para nenhum dos polimorfismos. Da mesma forma,

com relação aos parâmetros bioquímicos avaliados, glicemia e perfil lipídico (CT, HDL, LDL e triglicerídeos), também não foram detectadas associações significativas (TABELA 3).

Nossos resultados evidenciaram associações significativas do polimorfismo *LEP* G2548A com os parâmetros antropométricos peso, IMC, CC, RCQ e % gordura corporal (TABELA 3). As análises *post-hoc* revelaram que as mulheres homozigotas AA apresentaram valores médios de peso, IMC, CC, RCQ e % gordura corporal significativamente maiores, quando comparadas com as heterozigotas AG (IMC, CC e % gordura: $P < 0,001$; peso: $P < 0,01$; RCQ: $P < 0,05$) e com as homozigotas GG (% gordura: $P < 0,001$; IMC, CC e RCQ: $P < 0,01$; peso: $P < 0,05$) (FIGURA 6, A, B, C, D, E).

Para o polimorfismo *LEPR* Gln223Arg associações significativas foram detectadas com os parâmetros antropométricos peso, IMC e CC (TABELA 3). Nas análises *post-hoc*, no entanto, apenas a variável IMC manteve-se significativa, na qual foi observado que mulheres homozigotas GG apresentaram valores médios de IMC maiores do que as heterozigotas GA ($P < 0,05$) (FIGURA 6, B).

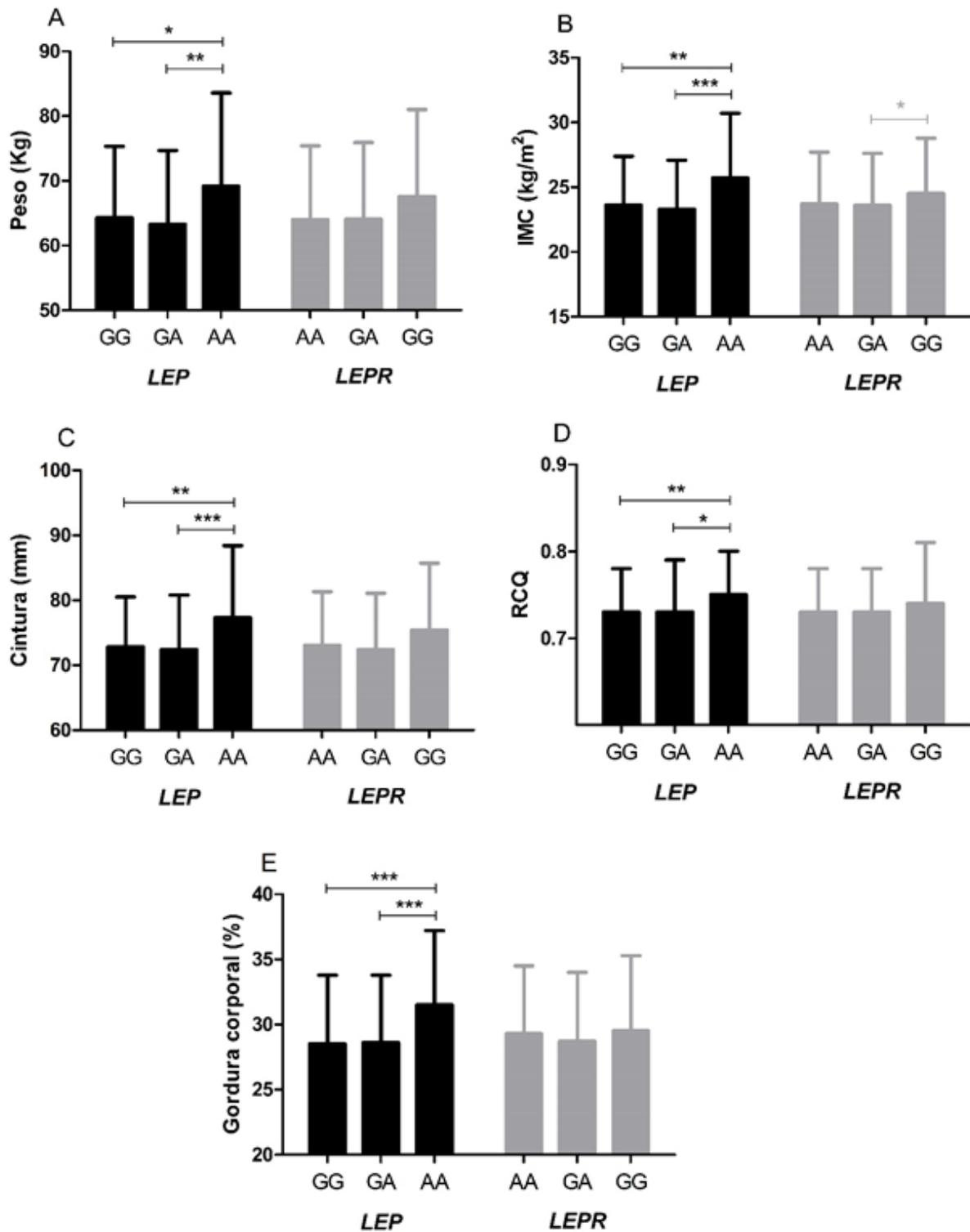
Tabela 3 – Características clínicas, laboratoriais e antropométricas da amostra de acordo com os genótipos investigados.

	LEP rs779039				Valor P	LEPR rs1137101			Valor P
	Todas (n = 378)	GG (n = 129)	GA (n = 181)	AA (n = 68)		AA (n = 122)	GA (n = 189)	GG (n = 67)	
Idade (anos)	25,1 (6,2)	25,3 (6,8)	24,8 (6,0)	25,7 (5,9)	0,561	24,3 (4,5)	25,4 (6,6)	26,6 (7,4)	0,597
Tabagismo <i>lifetime</i> (sim)	13 (3,4)	5 (3,9)	5 (2,78)	3 (4,4)	0,806 ^b	2 (1,6)	7 (3,7)	4 (5,9)	0,281 ^b
Uso de álcool (sim)	205 (54,2)	74 (57,4)	98 (54,1)	33 (48,5)	0,735	69 (56,6)	95 (50,3)	41 (61,2)	0,743
Carboidratos (g R24 horas)	216,3 (82,9)	219,7 (81,8)	209,8 (77,9)	227,7 (96,7)	0,280	208,9 (72,1)	218,1 (88,9)	225,1 (83,9)	0,407
Bioquímica									
Glicemia (mg/dl)	85,8 (7,7)	86,0 (7,6)	85,3 (8,0)	86,9 (7,1)	0,206	85,7 (7,2)	85,6 (7,7)	86,6 (8,7)	0,453
Colesterol total (mg/dl)	177,1 (38,9)	175,1 (32,5)	176,9 (40,5)	181,3 (42,2)	0,850	175,5 (38,1)	179,3 (40,2)	173,2 (36,6)	0,396
Colesterol HDL (mg/dl)	63,5 (15,5)	63,1 (15,1)	63,9 (14,4)	62,9 (19,2)	0,714	64,7 (16,8)	63,6 (14,8)	60,6 (15,1)	0,115
Colesterol LDL (mg/dl)	94,3 (31,8)	92,5 (29,9)	93,9 (32,2)	98,8 (34,4)	0,592	91,1 (31,7)	96,3 (33,2)	94,6 (27,4)	0,459
Triglicerídeos (mg/dl) ^a	4,6 (0,4)	4,5 (0,4)	4,5 (0,4)	4,5 (0,5)	0,739	4,5 (0,4)	4,5 (0,4)	4,4 (0,4)	0,294
Parâmetros antropométricos									
Peso (kg)	64,7 (12,0)	64,3 (11,0)	63,3 (11,4)	69,2(14,4)	0,001	64,0 (11,4)	64,1 (11,8)	67,6 (13,4)	0,037
IMC (kg/m ²)	23,8 (4,1)	23,6 (3,8)	23,3 (3,8)	25,7 (5,0)	0,001	23,7 (4,0)	23,6 (4,0)	24,5 (4,3)	0,011
Cintura (mm)	73,4 (8,9)	72,8 (7,7)	72,4 (8,4)	77,3 (11,1)	0,001	73,0 (8,3)	72,4 (8,7)	75,4 (10,3)	0,043
RCQ	0,73 (0,05)	0,73 (0,05)	0,73 (0,06)	0,75 (0,05)	0,012	0,73 (0,05)	0,73 (0,05)	0,74 (0,07)	0,933
Gordura corporal (%)	29,1 (5,4)	28,5 (5,3)	28,6 (5,2)	31,5 (5,7)	0,001	29,3 (5,2)	28,7 (5,3)	29,9 (5,8)	0,136

Os dados estão expressos como média e (desvio padrão) ou n e (%);

^aTransformado em logaritmo natural; ^bTeste exato de Fisher.

Figura 6 – Análise dos *post hoc* sobre parâmetros antropométricos



$P \leq 0,050^*$
 $P \leq 0,010^{**}$
 $P \leq 0,001^{***}$

5 DISCUSSÃO

Diversos estudos de todo o mundo relacionam os polimorfismos G2548A, no gene da leptina e Gln223Arg, no gene do receptor da leptina, com obesidade (SANTOS, 2005; DUARTE *et al.*, 2006; MASEIO *et al.*, 2008; PORTOLÈS *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2006; DUARTE *et al.*, 2007; BOUMAIZA *et al.*, 2012; HINUY *et al.*, 2008; RIESTRA *et al.*, 2010; HINUY *et al.*, 2010).

Porém, muitos estudos não replicaram os resultados de associação destes polimorfismos com obesidade (CARRILO *et al.*, 2013; FAN e SAY, 2014, YIANNAKOURIES *et al.*, 2003).

Nosso estudo encontrou associação do polimorfismo no gene da leptina, G2548A com dados antropométricos, revelando que portadoras do genótipo AA apresentaram valores médios de peso, IMC, CC, RCQ e % de gordura corporal maiores, quando comparados com portadoras dos genótipos AG e GG. Vale ressaltar que a diferença de peso foi de quase 5 kg a mais em mulheres portadoras do genótipo AA, quando comparadas com o genótipo GG. Atualmente já se sabe que a perda de 5 a 10 % de gordura corporal é suficiente para melhorar a sensibilidade à insulina e reduzir os riscos das co-morbidades em obesos (SANTOS *et al.*, 2011). O presente estudo detectou uma diferença de 3% de gordura a mais em portadoras do genótipo AA quando comparadas com o genótipo GG em mulheres saudáveis. Hoffstedt (2002) demonstrou que esse polimorfismo influencia na expressão gênica da leptina, avaliada em células adiposas (*in vitro*), onde indivíduos com genótipo AA apresentaram níveis de RNAm 60% maiores que os genótipos GA/GG. Além disso, indivíduos portadores do genótipo AA apresentaram

maiores níveis de leptina plasmática, quando comparados com indivíduos portadores dos genótipos GA/GG. Romero e Zanesco (2006) mostraram que indivíduos obesos apresentam níveis plasmáticos de leptina mais elevados, cerca de cinco vezes mais que aqueles encontrados em sujeitos magros. A resistência à leptina se explicaria por uma baixa sensibilidade à ação do hormônio ou os altos níveis séricos de leptina levariam a uma resposta inadequada (deficiência relativa de leptina). Assim, postula-se que um acúmulo excessivo de leptina poderia levar a uma "*down-regulation*" dos receptores centrais e a um reajuste do seu efeito inibidor sobre o apetite. A teoria de resistência à leptina ganhou força quando um estudo de escalonamento de dose de leptina recombinante obteve resultados negativos ao tentar avaliar a perda de peso ao se injetar leptina recombinante. Essa condição parece estar associada a vários fatores de risco para doenças cardiovasculares e outros estados patológicos, como obesidade, síndrome metabólica, resistência à insulina, diabetes mellitus tipo 2 e hipertensão arterial sistêmica. (GOMES *et al*, 2010)

Um estudo do tipo caso controle, incluindo indivíduos obesos e não obesos, realizado na Tunísia por Boumaiza e colaboradores (2012), também detectou uma associação do genótipo AA com aumento de risco para obesidade, incluindo o aumento de IMC. Portelès e colaboradores (2006) não encontraram associação significativa deste polimorfismo com o IMC e a CC, da mesma forma que Yannakouris e colaboradores (2003) que, em estudo realizado na Grécia, não encontraram associação com o IMC, a RCQ e a % de gordura corporal. Outros estudos, realizados pelo mundo, apresentaram desfechos contrários ao encontrado neste estudo, sendo o caso de Mammès e colaboradores (2000), Hinuy e colaboradores (2008), Reistra e colaboradores (2010) e Hinuy e colaboradores (2010) que detectaram associações entre o genótipo GG com a obesidade e com alterações de parâmetros antropométricos.

Neste estudo o polimorfismo do receptor da leptina Gln223Arg, foi associado com valores mais elevados de peso, IMC e CC nas homozigotas GG. Porém não foi associado com a RCQ nem com o % de gordura corporal. Vale ressaltar que as mulheres com o avançar da idade e entrada no climatério (alterações hormonais) apresentam um acúmulo de gordura visceral com distribuição central ou abdominal predominante, que caracteriza o perfil androide, este associado com aumento de

doenças cardiovasculares (RASKIN *et al.*, 2000). Este estudo encontrou associação do aumento de CC em mulheres portadoras do genótipo de risco em ambos os polimorfismos investigados, enfatizando que a média de idade ficou em 25 ($\pm 6,2$) anos. Um estudo realizado na Bélgica por Wauters e colaboradores (2001) demonstrou que mulheres portadoras do genótipo GG apresentaram associação com maior acúmulo de gordura abdominal. Da mesma forma que Portelès e colaboradores (2006) demonstraram que portadores do genótipo AA apresentavam risco diminuído de obesidade. Fan e Say (2014) também associaram o genótipo GG, do polimorfismo Gln223Arg, com o aumento de IMC, de % de gordura corporal e de gordura visceral, quando comparados com indivíduos portadores do genótipo AA. Outros estudos foram caracterizados por desfechos contrários, como é o caso de Yiannakouries e colaboradores (2001) e Maseio e colaboradores (2008), que associaram o genótipo AA com indivíduos sobrepeso e com valores aumentados de IMC e CC. E ainda os estudos que não encontraram associação entre este polimorfismo com obesidade ou com dados antropométricos, como Wang e colaboradores (2006) e Carrillo colaboradores (2013).

Essa diferença de resultados pode ocorrer devido à etnia, idade e sexo. Nos próprios estudos brasileiros existe divergência nos resultados que podem ser explicados pela miscigenação do povo brasileiro, constituída por uma grande variedade racial, que ocorreu devido à mistura de diversos grupos (IBGE, 2000).

O presente estudo não encontrou associação entre os genótipos do polimorfismo G2548A com o perfil lipídico e a glicemia. O mesmo ocorreu nos dois estudos brasileiros realizados por Hinuy e colaboradores (HINUY *et al.*, 2008; HINUY, *et al.*, 2010), que avaliaram amostra de obesos e não obesos nos dois estudos. Oliveira e colaboradores (2013) realizaram um estudo em São Paulo e não encontraram associação entre os genótipos deste polimorfismo com perfil lipídico e glicemia. Portelès e colaboradores (2006), que avaliaram a população espanhola, também não encontraram associação com o perfil lipídico. Porém, Boumaiza e colaboradores (2012) encontraram associação entre o genótipo AA e aumento de colesterol total com diminuição de HDL-c.

Em relação ao polimorfismo no gene *LEPR* Gln223Arg Santos (2005), Portelès e colaboradores (2006) não encontraram associação entre este polimorfismo e perfil lipídico. Assim como o estudo realizado na Finlândia por Saukko e colaboradores (2010) que associaram este polimorfismo com aumento de risco para aterosclerose, mas não encontraram associação com perfil lipídico. Nosso estudo também não encontrou associação com perfil lipídico. Já o estudo realizado na România por Constantin e colaboradores (2010) associou o genótipo AA com aumento dos níveis de triglicerídeos e glicose jejum. Boumaiza e colaboradores (2012) também encontraram associação, porém foi o genótipo GG que foi associado com aumento do colesterol total e diminuição do HDL-c. Etemad, e colaboradores (2013) detectaram, em estudo na Malásia, uma associação entre o genótipo GG e a diabetes.

É possível que o fato deste estudo não ter encontrado associação entre genótipos destes polimorfismos com perfil lipídico e a glicemia esteja relacionado com a composição da amostra investigada, predominantemente saudável.

Poucas pesquisas envolvem a interação de nutrientes e genética. Doukas e colaboradores (2013) demonstraram que homens com genótipo GG do Gln223Arg apresentavam menos saciedade após a alimentação que indivíduos com genótipo AA. Bienertová-Vasku (2010) realizou um estudo caso-controle, avaliando possíveis associações de polimorfismos com obesidade, estilo de vida e hábitos alimentares e detectou que portadores do genótipo GG do polimorfismo Gln223Arg expressaram uma tendência de maior consumo de energia no jantar.

A influência do consumo de carboidratos ainda é bastante controversa. Segundo Carvalho e Alfnas (2008) o elevado consumo de carboidratos tem sido associado ao aumento da obesidade, das dislipidemias, da intolerância à glicose e da resistência à insulina, estando dessa forma entre os fatores de risco para as doenças cardiovasculares. Além disso, o consumo de dietas com alto teor de carboidratos pode aumentar as concentrações de triglicerídeos plasmáticos e reduzir as concentrações de HDL-c.

Este estudo avaliou consumo de carboidratos e não foi associado com os genótipos dos polimorfismos analisados. Porém, pode-se observar que o consumo

de carboidratos excedeu a recomendação da DRIs (130g/d) em todos os genótipos avaliados. Estudo realizado por Rathnayake e colaboradores (2014) em mulheres mostrou que a dieta das mesmas oferecia 70% da energia provinda de carboidratos, sendo uma média de 275,57 g/dia. Esse dado foi associado com o aumento de gordura abdominal nas mulheres investigadas. Um estudo realizado no Sul do Brasil por Barazzetti e colaboradores (2013) também encontrou uma média de consumo de carboidratos superior à recomendada em mulheres da terceira idade ($210 \pm 72,2$ g/d), enfatizando que a maioria da amostra estava com sobrepeso ou obesidade.

6 CONCLUSÃO

Apesar dos inúmeros estudos relacionarem estes dois polimorfismos (G2548A e Gln223Arg) com obesidade, outras pesquisas não encontram esse desfecho. Além disso, existe a contradição entre os genótipos associados à obesidade, mesmo em estudos brasileiros.

Este estudo confirmou a associação destes polimorfismos e aumento dos parâmetros antropométricos, indicando que os mesmos estão relacionados com a predisposição a obesidade.

As limitações deste estudo referem-se à ausência da avaliação dos níveis de leptina, assim como dos teores dietéticos de carboidrato refinado. Outra limitação a ser destacada, refere-se à amostra da pesquisa. O estudo limitou-se à análise de indivíduos saudáveis, o que não possibilitou testar a ideia de um estudo caso-controle com obesos.

Através deste estudo pode-se observar que os achados sobre estes dois polimorfismos é contraditório, desta forma deve-se enfatizar estudos sobre o impacto destes dois polimorfismos no fenótipo de indivíduos do sul do Brasil.

REFERÊNCIAS

ANDRETTI, A.C.C. Avaliação antropométrica e dos níveis plasmáticos de leptina em mulheres inférteis do setor de reprodução assistida do HCPA. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006

BARAZZETTI, R.; SIVIERO, J.; BONATTO, S. Estado nutricional, consumo de calorias e macronutrientes de mulheres participantes de uma universidade da terceira idade no sul do país. **Estud. interdiscipl. envelhec.**, Porto Alegre, v. 18, n. 2, p. 331-347, 2013.

BEATON, George H. Approaches to analysis of dietary data: relationship between planned analyses and choice of methodology. **Am J Clin Nutr**, v. 59, p. 253-61, 1994.

BIENERTOVÁ-VASKU, J.; *et al.* Genotype x nutrient association of common polymorphisms in obesity-related genes with food preferences and time structure of energy intake. **British Journal of Nutrition**, v. 103, p. 352–359, 2010

BOER-MARTINS, L.C.; FARIA, A.P.C.; MORAES, C.H.; MORENO, H.J. Leptina e Aldosterona na Atividade Simpática na Hipertensão Resistente, com ou sem Diabetes Tipo 2. **ArqBrasCardiol**, v. 99(1), p. 642-648, 2012.

BORTOLI, C.; *et al.* Ingestão Dietética de Gordura Saturada e Carboidratos em Adultos e Idosos com Dislipidemias Oriundos do Projeto Veranópolis. **Rev Bras Cardiol**, v. 24(1), p. 33-41, 2011

BOUMAIZA, I.; *et al.* Relationship Between Leptin G2548A and Leptin Receptor Q223R Gene Polymorphisms and Obesity and Metabolic Syndrome Risk in Tunisian Volunteers. **Genetic testing and molecular biomarkers**, v.16, n. 7, 2012. doi: 10.1089/gtmb.2012.0324

BRASIL. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Arquivos Brasileiros de Cardiologia. Volume 101, Nº 4, Suplemento 1, Outubro 2013.

BRASIL. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2012-2013.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **POF 2008-2009: desnutrição cai e peso das crianças brasileiras ultrapassa padrão internacional.** Disponível em:

<http://ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_vizualiza.php?idnoticia=1699&id_pagina=1>. Acesso em: 29 set 2013.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Censo Demográfico 2000 e Censo Demográfico 2000: manual do recenseador.** Rio de Janeiro: IBGE, 2000.

CARRILLO-VAZQUEZ, J.P.; *et al.* G-2548a leptin promoter and q223r leptin receptor Polymorphisms in obese mexican subjects. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v. 8 (1), p. 34-43, 2013. doi:10.3844/ajabssp.2013.34.43

CARVALHO, G.Q.; ALFENAS, R.C.G. Índice glicêmico: uma abordagem crítica acerca de sua utilização na prevenção e no tratamento de fatores de risco cardiovasculares. **Rev. Nutr., Campinas**, v. 21(5), p. 577-587, set./out., 2008

CONDE, W.L.; BORGES, C. O risco de incidência e persistência da obesidade entre adultos brasileiros segundo seu estado nutricional ao final da adolescência. **Rev Bras Epidemiol**, v. 14(1), p. 71-9, 2011.

CONSTANTIN, A.; COSTACHE, G. The emerging role of adipose tissue-derived leptin in Inflammatory and immune responses in obesity: an update. **Proc. Rom. Acad.**, Series B, v. 1, p. 3–12, 2010

COSTA, A.G.V.; PRIORE, S.E.; SABARENSE, C.M.; FRANCESCHINI, S.C.C. Questionário de freqüência de consumo alimentar e recordatório de 24 horas: aspectos Metodológicos para avaliação da ingestão de lipídeos. **Rev. Nutr., Campinas**, v. 19(5), p. 631-64, 2006

COSTA, Y.R.; FAGUNDES, R.L.M.; CARDOSO, B.R. Ciclo menstrual e consumo de alimentos. **Rev Bras Nutr Clín**, v. 22(3), p. 203-9, 2007

DAMIANI, D.; DAMIANI, D. Sinalização cerebral do apetite. **Rev Bras Clin Med.** São Paulo, v. 9(2), p.138-45, 2011.

D'ANGELO, C.S. and KOIFFMANN, C. Copy Number Variants in Obesity-Related Syndromes: Review and Perspectives on Novel Molecular Approaches. **Journal of Obesity**, 2012.

DOUGKAS, A.; YAQOUB, P.; GIVENS, D.I.; REYNOLDS, C.K.; MINIHANE, A.M. The impact of obesity-related SNP on appetite and energy intake.

British Journal of Nutrition, v. 110, p. 1151–1156, 2013.
doi:10.1017/S0007114513000147

DUARTE, S.F.P.; *et al.* p.Q223R Leptin Receptor Polymorphism Associated with Obesity in Brazilian Multiethnic Subjects. **American journal of human biology**, v. 18, p. 448–453, 2006.

DUARTE, S.F.P.; FRANCISCHETTI, E.A.; GENELHU, V.A.; CABELLO, P.H.; PIMENTEL, M.M.G. LEPR p.Q223R, β 3-AR p.W64R and LEP c.-2548G>A gene variants in obese Brazilian subjects. **Genet. Mol. Res**, v. 6 (4), p. 1035-1043, 2007.

EMILSSON, V.; LIU, Y.L.; CAWTHORNE, M.A.; MORTON, N.M.; DAVENPORT, M. Expression of the functional leptin receptor RNAm in pancreatic islet and direct inhibitory action of leptin on insulin secretion. **Diabetes**, v. 46, p. 313-316, 1997.

ETEMAD, A.; *et al.* Analysis of Gln223Arg Polymorphism of Leptin Receptor Gene in Type II Diabetic Mellitus Subjects among Malaysians. **Int. J. Mol. Sci**, v. 14, p. 19230-19244, 2013. doi:10.3390/ijms140919230

FAN, S.H.; SAY, Y.H.; Leptin and leptin receptor gene polymorphisms and their association with plasma leptin levels and obesity in a multi-ethnic Malaysian suburban population. **Journal of Physiological Anthropology**, v. 33, p.15, 2014.

FERNANDES, A.E.; FUJIWARA, T.H.; MELO, E. de. Causa Comum de Obesidade. **Abeso**, 54 – 11. Dezembro 2011.

FONSECA-ALANIZ, M.H.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M.I.C.; LIMA, F.B. O Tecido Adiposo Como Centro Regulador do Metabolismo, **Arq Bras Endocrinol Metab** v. 50, n. 2, Abril 2006.

FRIEDEWALD, William T.; LEVY, Robert I.; FREDRICKSON, Donald S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin Chem**, v. 18, p. 499-502, 1972.

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

GUÌZAR-MENDOZA, J.M.; *et al.* Association analysis of the Gln223Arg polymorphism in the human leptin receptor gene, and traits related to obesity in Mexican adolescents. **Journal of Human Hypertension**, v. 19, p. 341–346, 2005.

GOMES, F.; *et al.* Obesidade e Doença Arterial Coronariana: Papel da Inflamação Vascular. **Arq Bras Cardiol**, v. 94(2), p. 273-279, 2010.

GOMES, G.V.B. Estudo do promotor gênico da Leptina como marcador potencialmente associado a obesidade. **Anais da MCC**, Salvador, v.1, n.3, setembro, 2012.

GOUMENOU, A.G.; MATALLIOTAKIS, I.M.; KOUMANTAKIS, G.E.; PANIDIS, D.K. The role of leptin in fertility. **Eur J Obstetr Ginecol Reprod Biol**, v. 106(2), p. 118-24, 2003.

GUO,S et al. Oncogenic role and therapeutic target of leptin signaling in breast cancer and cancer stem cells. **Biochimica et Biophysica Acta** 1825 (2012) 207–222 HAPMAP. Acesso em: <<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em setembro de 2013.

HERMSDORFF, H.H.M.; VOLP, A.C.P.; SANTOS, R.G.C.; VIANA, M.L.; BRESSAN, J. Efeito do Perfil de Macronutrientes da Dieta na Leptinemia. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 50, n. 5, 2006.

HERMSDORFF, H.H.M.; VIEIRA, M.A.Q.M.; MONTEIRO, J.B.R. Leptina e sua influência na patofisiologia de distúrbios alimentares. **Rev. Nutr., Campinas**, v. 19(3), p. 369-379, maio/jun., 2006

HINUY, H.M.; *et al.* Leptin G-2548A promoter polymorphism is associated with increased plasma leptin and BMI in Brazilian women **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 52/4, 2008

HINUY, H.M.; *et al.* Relation ship between variants of the leptin gene and obesity and metabolic biomarkers in Brazilian individuals. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.54, n. 3 São Paulo abr./mar. 2010.

HOFFSTEDT, J.; ERIKSSON, P.; MOTTAGUI-TABAR, S.; ARNER, P. A Polymorphism in the Leptin Promoter Region (-2548 G/A) Influences Gene Expression and Adipose Tissue Secretion of Leptin. **Horm Metab Res**, v. 34(7), p. 355-359. 2002 doi: 10.1055/s-2002-33466

JACKSON, K.G.; *et al.* The leptin receptor Gln223Arg polymorphism (rs1137101) mediates the post prandial lipaemic response, but only in males. **Atherosclerosis**, v. 225, p. 135-14, 2012.

LAHINI, D.K.; NURNBERGER, J.I.J.R. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p. 5444-5444, 1991.

LADEIRO, F.M.; QUARANTINI, L.C. Obesidade: Controle Neural e Hormonal do Comportamento Alimentar. **R. Ci. med. biol.**, Salvador, v.10, n.3, p.236-245, set./dez. 2011.

LEITE, L.D.; ROCHA, E.D.M.; BRANDÃO-NETO, J. Obesidade: uma doença inflamatória. **Revista Ciência & Saúde**, Porto Alegre, v. 2, n. 2, p. 85-95, jul./dez. 2009.

LIU, C. Polymorphisms in three obesity-related genes (LEP, LEPR, and PON1) and breast cancer risk: a meta-analysis. **Tumor Biol**, v. 32, p. 1233–1240, 2011

- LOHMAN, T.G.; ROCHE, A.F.; MARTORELL, R. Anthropometric standardization reference manual. **Human Kinetics Books**, Illinois, 1988.
- MAMMÈS, O.; *et al.* Association of the G-2548A polymorphism in the 5' region of the *LEP* gene with overweight. **Ann. Hum. Genet.**, v. 64, p. 391±394, 2000.
- MARCHI-ALVES, L.M.; NOGUEIRA, M.S.; MENDES, I.A.C.; GODOY, S. Leptina, hipertensão arterial e obesidade: importância das ações de enfermagem. **Acta Paul Enferm**, v. 23(2), p. 286-90, 2010.
- MASUO, K.; *et al.* Leptin-Receptor Polymorphisms relate to obesity through blunted leptin mediated sympathetic nerve activation in a caucasian male population. **Hypertens Res**, v. 31, n. 6, 2008.
- MIYAMOTO, M.V.; MELO, C.M.; Sandra M. L. RIBEIRO, S.M Comparação entre o estado nutricional de Mulheres idosas e mulheres jovens: Relação com a leptina e o igf-i. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 41 (1), p. 58-66, 2008.
- MORRIS, D.L; RUI, L. Recent advances in understanding leptina signaling and leptina resistance. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*; v. 297 (6), p. 1247-1259, 2009.
- MOTA, G.R.da; ZANESCO, A. Leptina, Ghrelina e Exercício Físico. **Arq Bras Endocrinol Metab**, 2007.
- OLIVEIRA, R. Interação entre polimorfismos de genes envolvidos na homeostase energética e na sensibilidade à insulina e a resposta a uma intervenção dietética para perda de peso corporal em indivíduos obesos. Tese (doutorado), Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. 2011
- OLIVEIRA, R. de.; *et al.* Leptin receptor gene polymorphisms are associated with adiposity and metabolic alterations in Brazilian individuals. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 57(9), 2013.
- OLIVEIRA, L.P.M.; *et al.* Fatores associados a excesso de peso e concentração de gordura abdominal em adultos na cidade de Salvador, Bahia, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 25(3), p. 570-582, 2009
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Obesity and overweight**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. Acesso em: 12 abril 2014.
- PÉREZ, J.C.A.; FLORES, G.B.; MACEDO, R.G.; CRUZA, F.J.A.A.M. Leptina y su relación com la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2. **Gac Méd Méx**, v. 144 n. 6, 2008.
- POLLOCK, M.L. & WILMORE, J.H. Exercícios na Saúde e na Doença: Avaliação e Prescrição para Prevenção e Reabilitação. **MEDSI Editora Médica e Científica Ltda.**, p. 233-362, 1993.

- PORTOLÈS, O.; *et al.* Effect of genetic variation in the leptin gene promoter and the leptin receptor gene on obesity risk in a population-based case-control study in Spain. **European Journal of Epidemiology**, v. 21, p. 605–612, 2006. doi 10.1007/s10654-006-9045-6
- RASKIN, D.B.F.; PINTO-NETO, A.M.; PAIVA, L.H.S.C.; RASKIN, A.; MARTINEZ, E.Z. Fatores Associados à Obesidade e ao Padrão Andróide de Distribuição da Gordura Corporal em Mulheres Climatéricas. **RBGO**, v. 22, n. 7, 2000.
- RATHNAYAKE, K.M.; *et al.* High carbohydrate diet and physical inactivity associated with central obesity among premenopausal housewives in Sri Lanka. **BMC Research Notes**, v. 7:564, 2014
- RIBEIRO, S.M.L.; *et al.* Leptina: Aspectos Sobre o Balanço Energético, Exercício Físico e Amenorréia do Esforço. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 51/1; 2007.
- RIESTRA, A.G.A.; *et al.* Influence of the leptin G-2548A polymorphism on leptin levels and anthropometric measurements in healthy Spanish adolescents. **Annals of Human Genetics**, v. 74, p. 335–339, 2010. doi: 10.1111/j.1469-1809.2010.00586.x
- ROMERO, C.E.M.; ZANESCO, A. O papel dos hormônios leptina e grelina na gênese da Obesidade. **Rev. Nutr.**, v.19, n.1, Campinas, Jan./Feb. 2006.
- SANTOS, A.F.R. O polimorfismo Gln223Arg do gene do receptor da leptina e a sua associação com fatores de risco cardiovascular. Tese, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2005
- SANTOS, L.A.S dos; *et al.* Estado nutricional e consumo alimentar de mulheres jovens na fase lútea e folicular do ciclo menstrual. **Rev. Nutr., Campinas**, v. 24(2), p. 323-331, 2011
- SCHUCH, J.B.; VOIGT, F.; MALUF, S.W.; ANDRADE, F.M. de. Nutrigenética: a interação entre hábitos alimentares e o perfil genético individual. **R. bras. Bioci**, Porto Alegre, v. 8, n. 1, p. 73-84, jan./mar. 2010.
- SCHWARTZ, M.W.; BASKIN, D.G. Leptin and the brain: then and now. **The Journal of Clinical Investigation**, v.123, n. 6, June, 2013.
- SERRANO, H.M.S.; *et al.* Composição Corpórea, Alterações Bioquímicas e Clínicas de Adolescentes com Excesso de Adiposidade. **Arq Bras Cardiol**, v. 95(4), p. 464-472, 2010
- STEEMBURGO, T.; AZEVEDO, M.J.; MARTINEZ, J.A. Interação entre gene e nutriente e sua associação à obesidade e ao diabetes melito. **Arq Bras Endocrinol Metab**, 2009

SAUKKO, M.; KESANIEMI, A.; UKKOLA, O. Leptin Receptor Lys109Arg and Gln223Arg polymorphisms are associated with early Atherosclerosis. **Metabolic syndrome and related disorders**, v. 8, n. 5, 2010. doi: 10.1089/met.2010.0004

VELLOSO, L.A. O Controle Hipotalâmico da Fome e da Termogênese – Implicações no Desenvolvimento da Obesidade. **ArqBrasEndocrinolMetab**, v. 50, n. 2, Abril, 2006.

VUCENIK, I; Joseph P. Obesity and cancer risk: evidence, mechanisms, and recommendations. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 2012.

WANG, T.N.; *et al.* G-2548A polymorphism of the leptin gene is correlated with extreme obesity in Taiwanese aborigines. **Obesity**, v. 14, n. 2, 2006.

WANG, J.; *et al.* Leptin-Induced Endothelial Dysfunction Is Mediated by Sympathetic Nervous System Activity. **MD.J Am Heart Assoc**, 2013. doi: 10.1161/JAHA.113.000299.

WAUTERS, M.; *et al.* Polymorphisms in the leptin receptor gene, body composition and fat distribution in overweight and obese women. **International Journal of Obesity**, v. 25, p. 714±720, 2001.

World Health Organization. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Geneva:WHO;1995.

World Health Organization. Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic. Report. Geneva; 1997.

YIANNAKOURIS, N.; *et al.* The Q223R Polymorphism of the Leptin Receptor Gene Is Significantly Associated with Obesity and Predicts a Small Percentage of Body Weight and Body Composition Variability, 2001

YIANNAKOURIS, N.; MELISTAS, L.; YANNAKOULIA, M.; MUNGAL, K.; MANTZOROS, C.S. The .2548G/A polymorphism in the human leptin gene promoter region is associated with plasma free leptin levels; interaction with adiposity and gender in healthy subjects. **Hormones**, v. 2(4), p. 229-236, 2003.

YU, Z. *et al.* Genetic Polymorphisms in Adipokine Genes and the Risk of Obesity: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Obesity**, v. 20, p. 396–406, 2011. doi:10.1038/oby.2011.148

ANEXOS

Anexo 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido

Você está sendo convidado (a) a participar da pesquisa chamada “**Aspectos nutrigenéticos de parâmetros bioquímicos e antropométricos: implicações para saúde humana**”, que está sendo desenvolvida por um grupo de professores e alunos do Centro Universitário UNIVATES com o objetivo de investigar a interação entre a alimentação e polimorfismos genéticos, ou seja, verificar se as variações genéticas podem influenciar na maneira como o seu metabolismo responde à alimentação.

Como parte da sua consulta no Ambulatório de Nutrição você responderá um questionário sobre seus hábitos de vida e alimentares, e também descreverá tudo o que você comeu nas últimas 24 horas. Você também irá realizar a verificação da Pressão Arterial e Avaliação Antropométrica (verificação de peso, altura, dobras cutâneas), sendo todos os procedimentos realizados por profissionais capacitados e registrados pelo pesquisador.

Em uma segunda data, a ser combinada entre você e o pesquisador, será realizada a coleta de sangue e exame de Bioimpedância, que deverão ocorrer no turno da manhã com o participante em jejum. O aparelho de Bioimpedância determina a quantidade e o percentual de massa magra e massa gorda em seu corpo. Durante o teste você deverá ficar em repouso e deitado em uma maca. Serão colocados quatro eletrodos na superfície da sua pele, sendo dois em sua mão direita e dois em seu pé direito. O teste leva menos de 1 minuto para ser finalizado, e você não deverá sentir desconforto ou dor durante o procedimento. A coleta de sangue será realizada por um profissional treinado e serão coletados 10 ml de sangue de uma veia do braço, e você poderá sentir um desconforto da picada durante a coleta. Através desta coleta serão verificados valores de colesterol total, HDL, glicose, triglicerídeos e extração de DNA para análise genética. O material biológico será devidamente armazenado por 5 anos após o término do projeto, de acordo com as exigências legais.

Os benefícios deste estudo poderão ser obtidos apenas em longo prazo e voltados para a população, não havendo benefício direto para o participante, apenas os resultados dos exames laboratoriais e de Bioimpedância. Os seus dados pessoais serão sempre tratados confidencialmente e a sua identidade será preservada. Os

resultados deste estudo serão publicados com fins científicos, mas não haverá identificação pessoal ou publicação do seu nome. Sua participação no estudo é voluntária, você pode retirar o seu consentimento e desistir de participar em qualquer momento da pesquisa, sem que isso traga qualquer prejuízo para você no trabalho ou ensino. A sua possibilidade de desistência ou não-participação na pesquisa, não mudará em nada o seu atendimento no Ambulatório de Nutrição ou em qualquer outro serviço prestado.

Este projeto está inteiramente de acordo com as normas vigentes na Resolução CNS196/96.

Esta pesquisa não implicará em nenhum gasto para o participante, bem como não haverá nenhuma forma de pagamento pela sua participação.

A responsável por esta pesquisa é a Professora Dra. Júlia Pasqualini Genro, que poderá ser contatada para qualquer esclarecimento pelo telefone 051-84438332. O Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVATES, que aprovou a execução deste projeto, também poderá ser contatado pelo telefone: (51) 3714-7000 Ramal 5339.

Este termo será assinado em duas vias, sendo que uma delas ficará com você e a outra será arquivada pelos pesquisadores.

Declaro que autorizo a minha participação nesta pesquisa e que fui devidamente informado (a), de uma forma clara e detalhada, tendo a oportunidade de tirar todas as minhas dúvidas livre de qualquer tipo de constrangimento.

Data: __/__/_____

Nome do participante da pesquisa

Assinatura do participante da pesquisa

Nome do pesquisador
que aplica o questionário

Assinatura do pesquisador

Anexo 2 – Anamnese alimentar e registro 24 horas

AMBULATÓRIO DE NUTRIÇÃO
ANAMNESE ALIMENTAR

Nome: _____

Vínculo com a UNIVATES: () Aluno () Funcionário () Professor

DN: ____/____/____

Idade: _____

Data: ____/____/____

Objetivo: _____

Renda familiar mensal (em reais): _____

Quantas pessoas moram na casa (vivem desta renda): _____

Gasto familiar mensal com alimentação (em reais): _____ () Não sei

Nível escolaridade:

() ensino fundamental (1 grau) incompleto, até que série fez: _____

() ensino fundamental (1 grau) completo

() ensino médio (2 grau) completo

() graduação (3 grau) completo

() pós graduação (abre: mestrado, doutorado, especialização)

() estudante graduação

() estudante pós graduação

Hábitos de vida:

Trabalha? () sim () não, Se sim: _____ horas/dia

Função: _____

Como você classifica o nível de stress do seu trabalho, de 0 a 10: _____

Posição: () sentado () em pé () sentado/em pé

Pratica atividade física? () sim () não, Se sim:

Atividade física que pratica: _____

Frequência: _____ Duração: _____ hs/sem.

Segunda Atividade física que pratica: _____

Frequência: _____ Duração: _____ hs/sem.

Terceira Atividade física que pratica: _____

Frequência: _____ Duração: _____ hs/sem.

Outros: _____

Frequência: _____ Duração: _____ hs/sem.

Fumante: () sim _____ cigarros/dia () não () ex-tabagista

Alguém fumante em sua casa? () Sim, Quantas (além de você) _____ () Não

Ingere álcool: () sim () não () às vezes

Tipo de bebida:

() vinho, Frequência de ingestão: _____ x semana Quantidade ingerida: _____ ml/dia

() cerveja, Frequência de ingestão: _____ x semana Quantidade ingerida: _____ ml/dia

() destilado, Qual: _____ Frequência de ingestão: _____ x semana

Quantidade ingerida: _____ ml/dia

Horas de sono: _____ hs/dia

Hábitos Alimentares:

Líquidos que ingere: () água, Quantidade: _____ ml/dia

() chá, Quantidade: _____ ml/dia

() chimarrão, Quantidade: _____ ml/dia

() refrigerantes, Quantidade: _____ ml/dia

() suco, Quantidade: _____ ml/dia ()

Outro _____ Quantidade: _____ ml/dia

Quantidade de líquido total do dia: _____ litros
 Utiliza para adoçar: () açúcar () adoçante, Qual adoçante: _____ Qtde em gotas: _____

Consome leite: () sim () não -Quantos copos/dia: _____

Tipo de leite: () integral () semi-desnatado () desnatado

Frequência que ingere doces: _____

Tipos de doce que consome e quantidade: _____

Consumo de frituras: () 1 x semana () 2 x semana () 3 x semana () mais de 4 x semana
 () não consome

Ingere carnes: () sim () não

Tipo de carne consumida:

() gado, Frequência: _____ x semana

() porco, Frequência: _____ x semana

() peixe, Frequência: _____ x semana

() ave, Frequência: _____ x semana

Como geralmente essa carne é preparada? _____

() Mal passada () Bem passada

Belisca: () sim () não Tipo de alimento: _____

Motivo da belisca: _____

Utiliza sal adicional na comida: () sim () não Quais preparações/dia: _____

Utiliza condimentos: () sim () não

() Caldos de carnes, Frequência/Quantidade: _____

() Catchup, Frequência/Quantidade: _____

() Mostarda, Frequência/Quantidade: _____

() Maionese, Frequência/Quantidade: _____

() Pimenta, Frequência/Quantidade: _____

Você tem o hábito de tomar café da manhã: () sim () não

Local que costuma fazer as refeições:

Desjejum: _____ Almoço: _____

Jantar: _____ Lanches: _____

Preferências alimentares (quais): _____

Aversões alimentares (quais): _____

Alergias alimentares (quais): _____

Alergias medicamentosas (quais): _____

Intolerâncias alimentares (quais): _____

Já fez dieta? () sim () não, Quais? _____

Teve orientação: () sim () não -Se sim, quem orientou? _____

Resultado da dieta: _____

Utiliza suplementos alimentares () sim () não -Qual: _____

História Clínica:

DM: () sim () não Qual: _____

HAS: () sim () não Pressão arterial: _____

Cardiopatias: () sim () não Qual: _____

Colesterol elevado: () sim () não

Triglicerídeos elevados: () sim () não

TGI: () gastrite () úlcera () RGE () intestinais _____

Intestino: () regular () preso Frequência de evacuação: _____ x semana

Câncer: () sim () não Qual: _____

Obesidade: () sim () não

Medicamentos que utiliza: _____

História familiar :**DM:** () sim () não Qual: _____

() Parentesco Primário (pais e irmãos): () Materno () Paterno

() Parentesco Secundário (avós, tios e primos): () Materno () Paterno

HAS: () sim () não

() Parentesco Primário (pais e irmãos): () Materno () Paterno

() Parentesco Secundário (avós, tios e primos): () Materno () Paterno

Cardiopatias: () sim () não Qual: _____

() Parentesco Primário (pais e irmãos): () Materno () Paterno

() Parentesco Secundário (avós, tios e primos): () Materno () Paterno

Colesterol elevado: () sim () não

() Parentesco Primário (pais e irmãos): () Materno () Paterno

() Parentesco Secundário (avós, tios e primos): () Materno () Paterno

Triglicerídeos elevados: () sim () não

() Parentesco Primário (pais e irmãos): () Materno () Paterno

() Parentesco Secundário (avós, tios e primos): () Materno () Paterno

Câncer: () sim () não Qual: _____

() Parentesco Primário (pais e irmãos): () Materno () Paterno

() Parentesco Secundário (avós, tios e primos): () Materno () Paterno

Obesidade: () sim () não

() Parentesco Primário (pais e irmãos): () Materno () Paterno

() Parentesco Secundário (avós, tios e primos): () Materno () Paterno

Exames Laboratoriais:

Hemograma: hemoglobina: _____ hematócrito: _____ outros: _____

Glicemia em jejum: _____

Colesterol total: _____ LDL: _____ HDL: _____

Triglicerídeos: _____

Ácido úrico: _____

Creatinina: _____

Eletrólitos: _____

TSH: _____ T3: _____ T4: _____

Outros: _____

Recordatório Alimentar 24 horas

Desjejum _____ hs:

Colação _____ hs:

Almoço _____ hs:

Sobremesa:

Lanche _____ hs:

Janta: _____ hs:

Ceia: _____ hs:

