

MARCIA REGINA MESSAGGI GOMES DIAS

ESTUDO DA MUTAÇÃO PRO115GLN DO GENE PPAR γ 2 E DO POLIMORFISMO
G972R DO GENE IRS1 NUMA AMOSTRA POPULACIONAL DE INDIVÍDUOS
EUTRÓFICOS E OBESOS

*Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado
apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas
UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia
Nutricionista – Márcia Regina Messaggi Gomes Dias.*

Campinas, 25 de agosto de 2003.

*Profa. Dra. Laura Sterian Ward
- Orientadora -*

CAMPINAS

2003

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SECÃO CIRCULANTE

200402892

MARCIA REGINA MESSAGGI GOMES DIAS

ESTUDO DA MUTAÇÃO PRO115GLN DO GENE PPAR γ 2 E DO POLIMORFISMO
G972R DO GENE IRS1 NUMA AMOSTRA POPULACIONAL DE INDIVÍDUOS
EUTRÓFICOS E OBESOS

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-
Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas para obtenção
do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra Laura Sterian Ward

CAMPINAS

2003

Nº CHAMADAT/UNICAMP	
D543e	
V	EX
TOMBO BCI	57016
PROC.	16-P-119104
C ☐	D ☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	27/02/04
Nº CPG	

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

CM00193B32-9

BIB ID 310 645

D543e

Dias, Marcia Regina Messaggi Gomes

Estudo da mutação PRO115GLN do gene PPAR γ 2 e do polimorfismo G972R do gene IRS1 numa amostra populacional de indivíduos eutróficos e obesos / Marcia Regina Messaggi Gomes Dias. Campinas, SP : [s.n.], 2003.

Orientador : Laura Sterian Ward

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Obesidade. 2. Resistência à insulina. 3. Genes. I. Laura Sterian Ward. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof(a). Dr(a). Laura Sterian Ward

Membros:

Prof(a). Dr(a). Laura Sterian Ward

Prof(a). Dr(a). Mário José Abdalla Saad

Prof(a). Dr(a). Denise Giácomo da Motta

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 25/08/2003

*Dedico este trabalho aos meus pais **Dorival e Ivone**,*

*aos meus irmãos **Cesar e Ana Carolina***

*e a minha avó **Isaura** (in memoriam).*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Laura Sterian Ward, pela dedicação, pelos ensinamentos, apoio, paciência e grande incentivo nas horas difíceis.

À Profa. Dra. Elza Olga Ana Muscelli Berardi, pela dedicação, competência e incentivo no decorrer do trabalho.

Às Profas. Dra. Regina Innocêncio e Dra. Sarah Monte Alegre, pelos conselhos e atenção.

À Conceição Aparecida da Silva, Brenno Astiarraga e Aglécio Luiz de Souza, pela dedicação, competência e amizade.

Aos amigos da Unidade Metabólica Juliano, Iara, Mary, Maria Fernanda, Josiane e Ricardo

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular do Câncer Janaína, Elaine, Patricia, Fabiana, Nilton, Juliana, Gabriela, Joseane e Natassia.

Aos voluntários, por acreditar e confiar em nosso trabalho.

Às minhas grandes amigas Juliana S Sabino Martins, Giovana Marinzeck de Pádua, Jomara Souza Martins e Daniela Miguel Marin pelo enorme incentivo, apoio e confiança em todos os momentos da nossa amizade.

Às minhas amigas Letícia Zandoná e Alessandra Ferraz Bettega Queiroz, muito obrigada pela força e pelos conselhos.

Às minhas amigas e primas Ana Cristina Messaggi G Vendramini e Maria Carolina Koyama pelo apoio, incentivo e conselhos nas horas difíceis.

Ao Maurício, pela compreensão e paciência.

Aos meus pais e irmãos pelo investimento, apoio e conselhos.

SUMÁRIO

	<i>PÁG.</i>
I-LISTA DE ABREVIATURAS	xix
LISTA DE TABELAS	xxvii
LISTA DE FIGURAS	xxxí
II-RESUMO	xxxv
1. INTRODUÇÃO.....	40
1.1. Fatores Fisiopatogênicos Envolvidos na Obesidade	43
1.2. Parâmetros de definição de classes de risco na obesidade	44
1.3. Obesidade e Resistência à Insulina	46
1.4. Fatores Genéticos X Obesidade X Resistência à Insulina	47
1.5. PPAR γ	48
1.6. IRS-1	53
2. OBJETIVOS.....	58
2.1. Objetivo Geral.....	59
2.2. Objetivos Específicos.....	59
3. MATERIAIS E MÉTODOS	60
3.1. Casuística	61
3.1.1. Subgrupos de Estudo	62
3.2. Métodos	63

3.2.1. Estudo Metabólico	63
3.2.2. Métodos laboratoriais usados na caracterização metabólica	66
3.2.3. Medidas Antropométricas.....	68
3.2.4. Medidas Hemodinâmicas	68
3.2.5. Estudo Genético	69
3.3. Metodologia Estatística	74
4. RESULTADOS.....	76
4.1. Características da população de estudo.....	77
4.1.1. Descrição das variáveis do grupo total.....	77
5.DISSCUSSÃO.....	91
6.CONCLUSÃO.....	99
7.SUMMARY.....	101
8.REFERÊNCIA BIBLIOGRAFICAS.....	104

LISTA DE ABREVIATURAS

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
Ác Úrico	Ácido Úrico
AGG	Arginina
BIA	Bioimpedância Elétrica
Bpm	Batimentos por minuto
C / Q	Relação cintura quadril
CA	Califórnia
CC	Circunferência da cintura
Clamp (CLP)	Clamp euglicêmico – hiperinsulinêmico
Col	Colaboradores
CQ	Circunferência do quadril
DAC	Doença Cardiovascular
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetra
EMC	Estudo metabólico completo
EMP	Estudo metabólico parcial
FC	Frequência Cardíaca
G972R	Glicina 972 Arginina
GEMOCA	Laboratório de Genética Molecular do Câncer
GGG	Glicina
H ₂ O	Água
HDL	High Density Lipoprotein

HOMA	Homeostatic Model Assesment
IGF -1	Insulin – like growth factor-1
IMC	Índice de Massa Corpórea
INAN	Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição
IR	Receptor de insulina
IRS-1	Receptor de insulina tipo 1
IRSs	Substratos do receptor de insulina
JNC	Joint National Comittee
Kg	Quilograma
L	Litro
LDL	Low Density Lipoprotein
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MM	Massa Magra
MmHg	Milímetros de Mercúrio
NaCl	Cloreto de Sódio
NHANES III	Third National Health and Nutrition Examination Surgery
Ns	não significativo
O ₂	Oxigênio
OGTT	Teste de Tolerância Oral a Glicose (do inglês: Oral Glucose Tolerance Test)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Pressão Arterial
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAM	Pressão Arterial Média

PAS	Pressão Arterial Sistólica
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PI-3 Kinase	Fosfaditil Kinase iositol
PPAR γ	Receptor Gama Ativado Proliferador de Peroxisomo
PPARs	Receptores Ativados Proliferadores de Peroxisomo
PRO115GLN	Prolina 115 Glicina
QR	Quociente Respiratório
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SH ₂	Src homology 2
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
WHO	World Health Organization

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Casuística	62
Tabela 2. Reagentes usados na extração de DNA de sangue periférico	70
Tabela 3. Reagentes usados na reação de PCR para PPAR γ 2 e IRS-1	73
Tabela 4. Primers para PPAR γ 2 e IRS-1	73
Tabela 5. Condições utilizadas para amplificação de PCR para PPAR γ 2 e IRS-1	74
Tabela 6. Características antropométricas, hemodinâmicas e metabólicas de acordo com os sexos	79
Tabela 7. Características antropométricas, hemodinâmicas e metabólicas entre eutróficos, obesos moderados (Ob. Mod.) e obesos mórbidos (Ob. Mor).	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Gel de agarose a 0,8% de amostras de DNA extraídas de sangue periférico	71
Figura 2. Percentual de gordura entre os sexos	80
Figura 3. Distribuição da população estudada de acordo com o estado nutricional.	81
Figura 4. Composição corporal segundo o estado nutricional pela BIA.	84
Figura 5. Gasto energético basal – calorimetria indireta - estado nutricional.	85
Figura 6. Gasto energético basal em relação a massa magra e por Kilo de peso corpóreo – Calorimetria Indireta.	86
Figura 7. Gel de agarose a 2% - Amplificação do gene PPAR γ 2	87
Figura 8. Amplificação dos produtos de PCR após digestão enzimática – PPAR γ 2	88
Figura 9. Amplificação do gene IRS-1 – Gel de agarose 2%	88
Figura 10. Amplificação do gene IRS-1 após digestão enzimática	89

RESUMO

A obesidade é uma doença considerada como uma epidemia mundial. Apresenta altas taxas de morbidade e mortalidade associadas a várias causas diretas, como hipertrofia cardíaca, arritmias e aumento do débito cardíaco, além de estar intimamente associada à hipertensão arterial e ao diabetes *mellitus*. É vista como uma doença poligênica e multifatorial, e um número crescente de mutações e polimorfismos gênicos populacionais vem sendo a ela associados.

O gene do Receptor Ativado Proliferador de Peroxisomo Gama (*PPAR* γ), um fator de transcrição implicado na diferenciação do adipócito e no metabolismo de lipídeos e glicose, está claramente envolvido na regulação do metabolismo do tecido adiposo em seres humanos. Ristow et al descreveram uma mutação Pro115Gln no *PPAR* γ 2 restrita a indivíduos com obesidade mórbida e que aceleraria a diferenciação do adipócito, podendo ser, portanto, um fator causal da obesidade.

Também se sabe que a resistência à insulina induzida pela deficiência do receptor de insulina de tipo 1 (*IRS-1*) conduz a um aumento da pressão arterial e dos níveis plasmáticos de triglicérides. Um polimorfismo no gene do *IRS-1*, com substituição de glicina (GGG) por arginina (AGG) no códon 972, foi implicado na resistência à insulina.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a relação da obesidade e dos distúrbios metabólicos a ela relacionados com mutações e/ou polimorfismos para os genes *IRS-1* e *PPAR* γ 2.

Para tanto, estudamos 67 indivíduos eutróficos, 37 obesos moderados e 27 obesos mórbidos, totalizando 40 homens e 91 mulheres, de 18 a 67 anos ($29,2 \pm 1,7$ anos de idade

para o sexo masculino e $32,9 \pm 1,2$ anos de idade para o sexo feminino). Foram analisados parâmetros antropométricos, hemodinâmicos, bioquímicos, bioimpedanciometria (BIA), calorimetria indireta e o índice HOMA-IR para avaliação de resistência insulínica. O estudo genético foi realizado através da pesquisa de mutações em DNA extraído de sangue periférico de todos os casos, usando-se PCR-restrição enzimática.

Os indivíduos obesos possuíam maiores níveis de pressão arterial diastólica e sistólica ($p < 0,001$), além de frequência cardíaca mais elevada do que os eutróficos ($p = 0,003$). Também apresentavam níveis mais elevados de colesterol total e triglicérides ($p = 0,01$, $p < 0,03$, respectivamente) do que os eutróficos, assim como de ácido úrico ($p < 0,0001$).

A análise genética mostrou que apenas 5 (3,8 %) indivíduos possuíam a mutação no gene *PPAR γ 2*, todos homozigotos, enquanto que polimorfismo do gene *IRS-1* foi encontrado em 12 (9,1 %) casos em heterozigose. Não houve correlação entre o perfil genético e nenhum dos parâmetros antropométricos, hemodinâmicos, bioquímicos ou indicadores de resistência insulínica medidos.

INTRODUÇÃO

1. Introdução

A obesidade é uma doença de alta prevalência nos países ocidentalizados, sendo atualmente considerada como uma epidemia mundial. Está distribuída em quase todas as raças, sexos e localização demográfica (BRAY, 1992; COITINHO, 1991), tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (LANCHA JÚNIOR et al, 2000; POPKIN & DOAK, 1998).

A obesidade pode relacionar-se ao aumento de atividades que não necessitam de elevado gasto energético e atividades de lazer que são mais sedentárias do que ativas. O aumento da prevalência observado entre adultos ocorre em todas as classes sócio-econômicas, com um aumento considerável entre aqueles indivíduos pertencentes a famílias de baixa renda. Ao final da década de 80, as mulheres brasileiras de mais baixa renda aumentaram a probabilidade de se tornarem obesas e conseqüentemente a população brasileira apresenta uma maior proporção de obesidade na faixa de renda intermediária do que na faixa de alta renda (MONTEIRO, 1995).

Dados têm demonstrado que a obesidade está associada a custos econômicos substanciais. Somente nos Estados Unidos, os custos médios diretos da obesidade totalizaram cerca de US\$ 52 bilhões em 1995, representando 5,7% do total do gasto da previdência social. Além disso, quando os custos indiretos são considerados, o total de custos associados atinge US\$ 99 bilhões (WOLF, 1998). Dados do levantamento “Third National Health and Nutrition Examination Surgery” (NHANES III) demonstraram que 20% dos homens adultos nos Estados Unidos e 25% das mulheres possuem um IMC acima

de 30 Kg/m², e adicionalmente um terço dos adultos são classificados como portadores de sobrepeso (IMC de 25 – 30 Kg/m²) (FLEGAL, 1998).

Na Europa, mais da metade dos adultos com idades entre 35 e 65 anos apresentam sobrepeso ou obesidade (WHO, 1998).

No Brasil, 28% dos homens e 37% das mulheres têm excesso de peso; 5% dos homens e 11% das mulheres têm obesidade leve e moderada e 0,1% dos homens e 0,5% das mulheres têm obesidade mórbida, segundo dados do Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição (INAN) (COITINHO, 1991).

A obesidade representa um enorme problema de saúde pública para a sociedade moderna (BRAY, 1987), considerando que a capacidade de trabalho de seus portadores é prejudicada, não somente pelo excesso de peso, mas também pelas doenças associadas a este excesso.

A necessidade de compreensão da obesidade em seus múltiplos aspectos fisiopatológicos vem da sua associação com altas taxas de morbidade e mortalidade (LEE et al, 1993; LISSNER et al, 1991), principalmente no que diz respeito ao aparelho cardiovascular, onde são descritas hipertrofia cardíaca (KISSEBACH, 1994; LAUER et al, 1991; MUSCELLI, 1996), arritmias e aumento do débito cardíaco (MESSERLI, 1982). Há ainda uma forte associação da obesidade com hipertensão arterial e diabetes *mellitus* (MODAN et al, 1985; STAMLER et al, 1978).

1.1. Fatores Fisiopatogênicos Envolvidos na Obesidade

A obesidade é um distúrbio do metabolismo energético caracterizado pelo armazenamento excessivo de energia, sob a forma de gordura, no tecido adiposo.

Os mecanismos fisiopatológicos que levam ao aumento de peso e ao estoque excessivo de tecido adiposo estão apenas parcialmente delineados. Sabe-se que a obesidade resulta do desequilíbrio crônico entre a ingestão alimentar e o gasto energético, conduzindo ao balanço energético positivo representado pelo estoque de gordura como reserva energética. Alguns fatores genéticos e ambientais estão implicados neste fenômeno (FROGUEL, 2000), acreditando-se que os fatores genéticos teriam ação permissiva para os fatores ambientais (susceptibilidade genética) e em alguns casos poderiam, isoladamente, ser determinantes da obesidade constitucional (ARNER, 2000).

Entre os fatores ambientais, destacam-se a alimentação e a atividade física, condicionado a fatores psicossociais que tenham relevância em determinados pacientes (HALPERN et al, 1998). As variáveis nutricionais, metabólicas e psicossociais interagem entre si e com os fatores genéticos, facilitando o desenvolvimento do fenótipo da obesidade (HALPERN et al, 1998), um distúrbio poligênico e multifatorial (MÜNZBERG et al, 1998).

A relação entre o fenótipo da obesidade e a doença cardiovascular é complexa e influenciada por fatores genéticos e constitucionais (SENTI et al, 2000).

1.2. Parâmetros de definição de classes de risco na obesidade

O Índice de Massa Corpórea (IMC) - divisão do peso corporal em quilogramas pelo quadrado da altura em metros (Kg/m^2) - tem sido utilizado para definir clinicamente a obesidade (GARROW e WEBSTER, 1985). A Organização Mundial da Saúde (WHO,1989), bem como o National Institute of Health, classificam indivíduos com o IMC maior que 25 Kg/m^2 e menor que 30 Kg/m^2 como portadores de sobrepeso e aqueles com o IMC maior ou igual que 30 Kg/m^2 como obesos (PI-SUNYER,1998).

Um parâmetro que tem merecido crescente valorização clínica é o tipo de obesidade, ou seja, a distribuição da gordura corpórea de acordo com a relação entre a medida das circunferências da cintura e do quadril (KISSEBACH,1989; VAGUE, 1956). Definem-se assim dois tipos de obesidade: ginecóide ou glúteo-femoral e andróide ou central. Nas últimas décadas, inúmeros autores vêm demonstrando, através de estudos longitudinais e transversais, que a adiposidade central, especialmente a intra-abdominal, é mais deletéria à saúde do que a periférica. A distribuição central da gordura é, por si só, um fator de risco para doenças cardiovasculares e, associada à obesidade, agrava ainda mais este risco (KAHN, 1994; KISSEBACH et al, 1982; LAPIDUS et al, 1984).

Vários métodos são utilizados para determinar ou estimar a composição corporal, bem como a distribuição da gordura corpórea com variações significativas na acurácia. Em estudos clínicos e populacionais, pode-se utilizar variáveis antropométricas como a medida da cintura, a relação cintura-quadril, as medidas de pregas cutâneas e o diâmetro sagital, pois o aumento do risco de aparecimento de complicações é proporcional ao aumento dessas medidas. Existe, entretanto, uma dificuldade em estabelecer critérios de risco para

um único valor como ponto de corte entre o normal e o patológico. O Consenso Latino-Americano em Obesidade adota os seguintes valores para medidas da cintura que representam risco cardiovascular aumentado: 94 cm para os homens e 80 cm para as mulheres conforme WHO (1998). Considera-se como indivíduos de risco muito aumentado os homens com cintura acima de 102 cm e as mulheres com mais de 88 cm (CONSENSO LATINO-AMERICANO, 1998; WHO, 1998).

O IMC, a relação cintura - quadril e a circunferência da cintura também têm sido correlacionados com fatores de risco para doença cardiovascular, gordura intra - abdominal e mortalidade. Dessas medidas, a circunferência da cintura parece ser o melhor marcador individual de obesidade e está mais fortemente correlacionada com fatores de risco e gordura abdominal do que o IMC ou mesmo a relação da cintura - quadril e ainda é mais confiável que esta. Além disso, a gordura abdominal parece ser um preditor de risco independente quando o IMC não está aumentado significativamente. Embora a circunferência da cintura e o IMC estejam interrelacionados, a circunferência da cintura fornece uma predição independente de risco acima ou abaixo daquele do IMC (LEAR et al, 2002). Há estudos demonstrando que a obesidade abdominal também é um fator de risco para o diabetes *mellitus* tipo 2 e para doenças coronarianas, independentemente de um IMC elevado (LARSSON et al, 1984; CHAN et al, 1994). Exames de necrópsia têm mostrado que a circunferência da cintura apresenta estreita correlação com o peso em todas as faixas de IMC e constitui a indicação mais precisa de gordura visceral (POUNDER, 1998). A relação cintura - quadril e a circunferência da cintura são marcadores usuais de gordura intra - abdominal, embora não tenham sempre muita acurácia. Estudos também

demonstram que a obesidade do tipo andróide constitui fator de risco para a hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia e intolerância a glicose ou diabetes *mellitus*, compondo a tétrede fatal, também chamada síndrome plurimetabólica ou síndrome X (PEIRES, 1988; LANDIN, 1989; REAVEN, 1988; KAPLAN, 1989), composta de várias alterações metabólicas. O marcador mais importante dessa síndrome é a resistência à insulina, a qual tem implicações fisiopatológicas com os demais componentes da síndrome.

1.3. Obesidade e Resistência à Insulina

A obesidade, o diabetes *mellitus* e a hipertensão arterial, componentes da síndrome plurimetabólica, possuem uma característica comum: a hiperinsulinemia e resistência à insulina (REAVEN, 1988; MUSCELLI, 1997). Tanto a obesidade como o diabetes *mellitus* tipo 2 contribui para a resistência à insulina a nível hepático, com inadequada supressão da produção de glicose e menor supressão da lipólise pela insulina no que se refere às vias metabólicas das gorduras (BONADONNA, 1990).

A resistência à insulina é definida por FERRANNINI (1999), como sendo uma resposta biológica diminuída a uma ou mais de suas ações. A hiperinsulinemia tem sido conceituada como uma concentração de insulina relativamente elevada no jejum ou em resposta à ingestão oral de glicose (SCHMIDT et al, 1996). Devido à frequência e fisiopatologia da resistência à insulina, a sua avaliação passou a ter uma maior importância, sendo que o “clamp euglicêmico hiperinsulinêmico”, descrito na década de 70 por De Fronzo et al, 1979, é considerado ainda o método padrão - ouro para avaliar a sensibilidade à insulina. No entanto, este método possui algumas limitações, principalmente na sua execução já que esta técnica exige um longo período (2 a 3 horas), pessoal qualificado e

treinado, além de infra-estrutura dispendiosa, portanto, é considerado um método limitado na aplicação clínica ou em pesquisas envolvendo grandes grupos de pessoas. Diante dessas dificuldades, nas últimas décadas desenvolveram-se vários modelos de avaliação, com o objetivo de ter um método aplicável em estudos clínicos e epidemiológicos. Dentre estes métodos, pode-se citar índices derivados da medida da insulinemia e glicemia coletadas em jejum e, derivados de múltiplas coletas durante sobrecarga oral de glicose. Os métodos mais usados são o HOMA-IR (MATHEWS et al, 1985) e QUICKI (KATZ et al, 2000), os quais utilizam valores de glicemia e insulina de jejum. Vários autores validaram estes métodos embora tenham apresentado valores discrepantes em relação ao clamp mas que não diminuem sua utilidade em grandes estudos (AVIGNON et al, 1999; HANSON et al, 2000; HAFFNER et al, 1996; ALBAREDA et al, 2000). Assim, pode-se de forma prática estimar a sensibilidade à insulina a partir dos métodos do HOMA-IR ou QUICKI com amostras de soro colhidas em jejum.

1.4. Fatores Genéticos X Obesidade X Resistência À Insulina

Embora o ambiente possa contribuir para a resistência à insulina, é provável que o fator mais importante seja um perfil genético herdado. Variações na distribuição étnica e evidência de transmissão familiar sugerem que a ação insulínica é também determinada geneticamente (CLAUSEN et al, 1995). Existe uma considerável variação na sensibilidade insulínica na população em geral, possivelmente relacionada a mutações sutis e/ou polimorfismos em alguns componentes genéticos. Um número crescente dessas mutações e desses polimorfismos populacionais vem sendo identificados, tornando necessário entender como eles interagem com os fatores de risco ambientais levando a um aumento na

predisposição para aterosclerose, diabetes *mellitus* tipo 2 e outros estados patológicos conhecidos que estão associados à resistência à insulina (PEDERSEN, 1999).

Vários estudos recentes têm dedicado especial atenção aos adipócitos devido ao fato de que vem crescendo rapidamente o conhecimento sobre os mecanismos que direcionam a diferenciação destas células, antigamente vistas apenas como participantes passivas da geração da obesidade (VIDAL-PUIG, 1997). Sabe-se que as células adiposas têm um papel ativo na regulação da homeostase energética e composição corporal (VIDAL-PUIG, 1997).

1.5.PPAR γ

A família do *PPAR* (peroxisome proliferator activated receptors) é composta pelos Receptores Ativados do Proliferador do Peroxisomo. Foi caracterizada em 1994 como pertencente à superfamília dos receptores nucleares hormonais do tipo esteróide (WAHLI et al, 1991; FÈVE et al, 1998).

Os PPARs formam heterodímeros com receptores retinóides (receptor X retinóide ou RXR) que modulam a expressão dos genes que contém os elementos de resposta do PPAR, denominados PPRES (Elementos Responsivos do Proliferador do Peroxisomo). Estes PPRES são identificados em vários genes específicos da diferenciação adipocitária. O receptor do retinóide (RXR) e o PPAR possuem sítios de ligação que podem ser ocupados por diferentes ligantes (ZHANG, 1996; HU et al, 1996).

Os peroxissomas são organelas caracterizadas pela presença de enzimas oxidativas que transferem átomos de hidrogênio de diversos substratos para o oxigênio e também por

conter a maior parte de catalase celular, enzima que converte peróxido de hidrogênio em H_2O e O_2 . A atividade da catalase é importante pois o peróxido de hidrogênio que se forma nos peroxissomas é um oxidante energético e prejudicaria a célula se não fosse eliminado rapidamente. Os peroxissomas também possuem enzimas envolvidas na beta-oxidação dos ácidos graxos e do ácido glicólico. Calcula-se que 30% dos ácidos graxos sejam oxidados em acetil-CoA nos peroxissomas. Participam ainda da metabolização do ácido úrico.

Certas proteínas da membrana e a maioria das enzimas dos peroxissomas, como por exemplo a catalase e a urato-oxidase, são sintetizadas nos polirribosomas livres da matriz citoplasmática. Acredita-se que estas proteínas são reconhecidas pela membrana dos peroxissomas, sendo algumas retidas na membrana e outras, principalmente as enzimas, introduzidas na matriz da organela.

O Receptor Ativado Proliferador de Peroxisomo Gama (*PPAR γ*) é um fator de transcrição implicado na diferenciação do adipócito e no metabolismo de lipídeos e glicose (MEIRHAEGHE, 1998), exercendo funções de diferenciação de adipócitos e depósito de gordura, podendo ser um modulador da resistência à insulina (BEAMER, 1997). Pesquisas recentes sugerem um papel do *PPAR γ* no metabolismo lipídico e energético o que tem levado ao estudo do *PPAR γ* como um gene candidato para obesidade, resistência à insulina e diabetes *mellitus* tipo 2 (YEN, 1997). Por causa de seu papel pleiotrópico no metabolismo de lipídeos e da glicose, o *PPAR γ* é claramente um gene candidato para regulação do metabolismo do tecido adiposo em humanos (MEIRHAEGHE, 1998).

O receptor *PPAR γ* possui 3 isoformas: *PPAR γ 1*, *PPAR γ 2* e *PPAR γ 3*, as quais são codificadas por promotores alternativos e junções diferenciais do mesmo gene (VALVE,

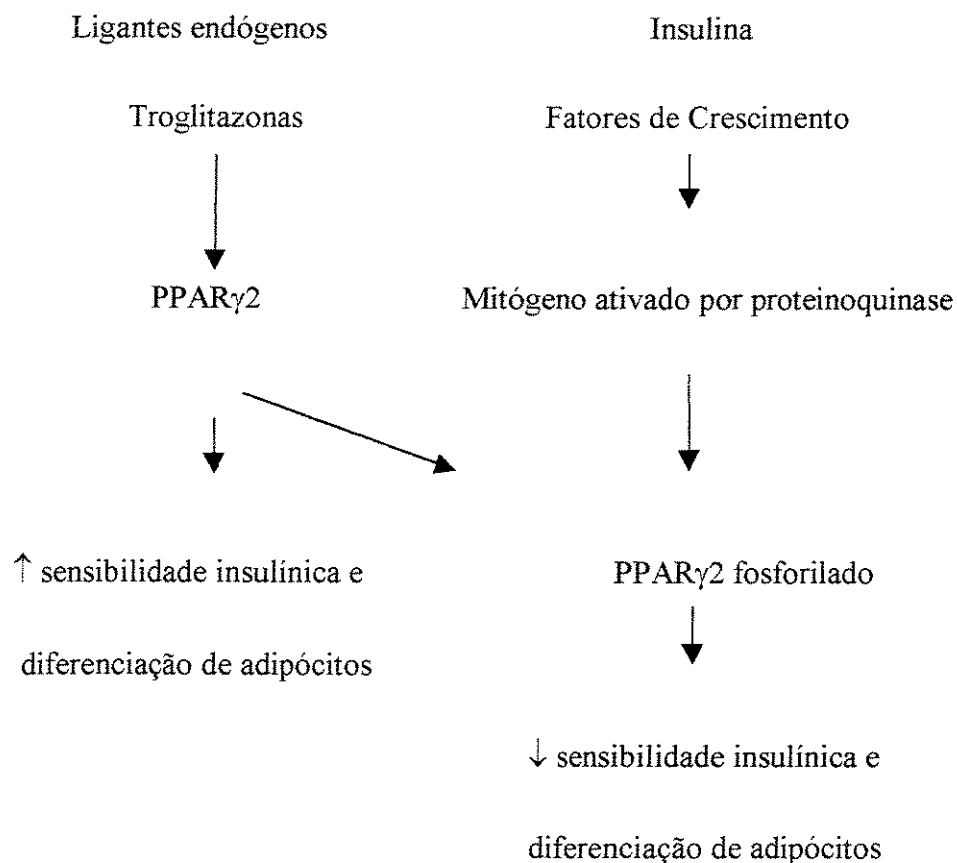
1999; HOTTA et al, 1998). Comparado ao *PPAR γ 1*, o *PPAR γ 2* humano tem 28 aminoácidos adicionais. O *PPAR γ 1* é expresso em diversos tecidos incluindo tecido adiposo, cardíaco, hepático e músculo esquelético, enquanto que o *PPAR γ 2* é expresso quase exclusivamente em tecido adiposo (YEN, 1997) e influenciado pela obesidade e por fatores nutricionais (VALVE, 1999). As 2 isoformas *PPAR γ 1* e *PPAR γ 2* são produzidas por ação de 2 promotores diferentes (BEAMER et al, 1997). A isoforma γ 2 é muito mais potente do que a isoforma γ 1 e pode estar implicada na obesidade, resistência à insulina e diabetes (BEAMER, 1998). Já a isoforma *PPAR γ 3* parece estar expressa no cólon e no tecido adiposo (VALVE, 1999). Além disso, a isoforma γ 2 é muito mais potente do que a isoforma γ 1, sugerindo um papel distinto para o *PPAR γ 2* na obesidade, resistência à insulina e diabetes (BEAMER et al, 1998).

Alterações na regulação, atividade ou expressão do *PPAR γ* podem participar do mecanismo molecular das patologias com alteração na homeostase lipídica e resistência à insulina.

Tem-se mostrado recentemente que o nível de RNAm do *PPAR γ* não é diferente em tecido adiposo subcutâneo abdominal de pacientes magros e pacientes obesos com ou sem diabetes *mellitus* tipo 2 (RIEUSSET, 1999). Em contraste, observou-se correlação significativa entre o IMC desses indivíduos e a medida dos níveis de RNAm do *PPAR γ 1* e γ 2, sugerindo que a obesidade pode estar associada a uma expressão aumentada do *PPAR γ 2* no tecido adiposo subcutâneo. Entretanto, alguns estudos indicam que a expressão *PPAR γ* pode estar aumentada no músculo esquelético durante a obesidade, de forma que, até o

momento, a relação entre a obesidade humana e possíveis alterações na expressão do *PPAR γ* não estão claramente estabelecida (RIEUSSET, 1999).

O *PPAR γ* é também uma molécula alvo para as glitazonas, uma classe de drogas antidiabéticas que aumentam a sensibilidade insulínica in vivo em humanos e em vários modelos de animais com resistência à insulina (RIEUSSET, 1999). As glitazonas possuem alta afinidade para o *PPAR γ* e supostamente sua ação na sensibilidade insulínica e suas ações lipogênicas ocorrem através deste receptor (BEAMER, 1997). O esquema a seguir demonstra essa ação:



Isso sugere uma relação entre a ação insulínica, funções do *PPAR γ* e maturação de adipócitos. Estes efeitos anabólicos conduzem ao acúmulo de gordura e o desenvolvimento de tecido adiposo (RIEUSSET, 1999). Há evidências de que os ligantes endógenos para *PPAR γ* são ácidos graxos e derivados de prostaglandinas. Ligantes sintéticos para *PPAR γ* incluem as glitazonas. In vitro, estes agentes estimulam a diferenciação de adipócitos e aumentam a sensibilidade insulínica. Estudos em humanos têm mostrado que as glitazonas reduzem a resistência à insulina e a hipertrigliceridemia (BEAMER, 1997). A estimulação do *PPAR γ* pelo seu provável ligante endógeno, 15-deoxi- ρ - prostaglandina J_2 , resulta em ativação da área reguladora do gene específico do adipócito, incluindo o adipócito P₂ e o gene carboxikinase fosfoenolpiruvato (BEAMER, 1997).

O *PPAR γ 2*, é um regulador da diferenciação do adipócito e estoque energético, sendo um fator de transcrição que direciona a diferenciação dos pré-adipócitos para adipócitos. Em muitos dos experimentos de transfecção do *PPAR γ 2* em fibroblastos usando-se vetores retrovirais, estes fibroblastos foram convertidos eficientemente para adipócitos. O *PPAR γ 2* não-fosforilado tem uma habilidade reduzida para promover o processo de diferenciação de adipócitos enquanto que fosforilado reduz um aminoácido único (serina) na posição 114 no gene humano *PPAR γ 2*, sugerindo um mecanismo de regulação negativa para limitar a diferenciação de adipócito e acumulação lipídica. A fosforilação de serina ocorre em um sítio de consenso típico para mitógeno ativado por proteinoquinase e está caracterizada pela sequência prolina-aminoácido-serina-prolina. Tem sido sugerido que mutações ao redor ou dentro deste sítio de fosforilação possam estar associadas com obesidade (RISTOW et al, 1998). Ristow et al (1998) descreveram em

alemães uma mutação Pro115Gln no *PPAR* γ 2 que aceleraria a diferenciação do adipócito e poderia, portanto ser um fator causal da obesidade. O tecido adiposo é o maior sítio de expressão da isoforma *PPAR* γ 2, podendo apresentar diferenças na sensibilidade insulínica relacionada à sua ação e à do *PPAR* γ . Assim, supõe-se que exista uma correlação entre esta herança gênica, obesidade, resistência à insulina e DM tipo 2 (YEN, 1997). É possível que existam diferenças raciais na frequência desta mutação. Desta forma, a importância da mesma em diferentes populações e em grupos de obesos ou diabéticos não é clara já que não foi observada em obesos mórbidos franceses (CLEMENT, 2000).

1.6. *IRS-1*

A insulina é um hormônio protéico produzido e secretado pelas células β da ilhota pancreática que tem como principal função o estímulo à captação de glicose por tecidos alvos. Além de seus efeitos no controle da homeostase da glicose, a insulina participa na modulação da expressão de diversos genes através da regulação da transcrição do DNA, dos efeitos estimulatórios ou inibitórios sobre o ritmo de tradução, do controle da síntese de DNA e mesmo regulando o transporte de íons e aminoácidos em praticamente todas as células (CHEATHAM & KAHN, 1995).

A insulina é o principal hormônio responsável pela regulação do metabolismo da glicose, e portanto pelo equilíbrio energético. A insulina inicia seus efeitos metabólicos e promotores de crescimento através da ligação a um receptor específico na membrana plasmática. O receptor de insulina (IR) é uma glicoproteína existente em praticamente todos os tecidos de mamíferos. Pertence à família dos receptores de fatores de crescimento com atividade tirosina quinase intrínseca (RTK) (FREYCHET et al, 1971;

CUATRECASAS, 1972; KAHN, 1985; VIRKAMÄKI, UEKI, KAHN, 1999). A associação da insulina com seu receptor, isto é, a formação do complexo hormônio-receptor, representa a interação inicial do hormônio com a célula alvo (FREYCHET, 1971).

O receptor de insulina é uma glicoproteína heterotetramérica constituída por 2 subunidades α e duas subunidades β ligadas entre si por pontes dissulfeto, formando uma estrutura β - α - α - β (CZECH, 1985). A subunidade β do receptor de insulina é uma proteína com atividade quinase capaz de catalisar, após o estímulo insulínico, a transferência de grupos fosfato do ATP para tirosinas de outras proteínas intracelulares ou para si próprio, fenômeno este chamado de autofosforilação (KASUGA et al, 1982). A atividade tirosina quinase do receptor é inicialmente estimulada pela ligação da insulina e depois grandemente aumentada pela autofosforilação e aparentemente é inibida pela subunidade alfa desocupada (WHITE & KHAN, 1994). Existem consideráveis evidências de que a atividade tirosina quinase é essencial para a sinalização insulínica, e qualquer diminuição da mesma é acompanhada por perda na capacidade do receptor em sinalizar os efeitos metabólicos e de crescimento (EBINA et al, 1987).

O IRS-1 é um dos importantes substratos de receptor de insulina e transmite vários sinais. É considerado também um importante substrato intracelular para IGF – 1 (insulin-like growth factor -1), hormônio de crescimento e várias interleucinas e interferons (ARAKI et al, 1997). Sabe-se ainda que o IRS-1 está presente em todos os tecidos que são sensíveis à insulina ou ao IGF-1, incluindo sítios responsáveis pela produção de glicose, depuração de glicose e secreção da célula β pancreática. Ao servir como um “multi-sítio”, com vários sítios de fosforilação em tirosina na sua seqüência, o IRS-1 funciona como

acceptor para vários sinais protéicos com a finalidade de obter uma variedade de diferentes funções celulares que são reguladas pela insulina (SIGAL, 1996). Após estimulação pela insulina, o IRS-1 sofre auto-fosforilação sobre os resíduos de tirosina, os quais por sua vez estimulam a atividade do receptor tirosinaquinase em direção a outros substratos (ARAKI et al, 1997).

Os substratos do receptor de insulina (IRSs), são proteínas citoplasmáticas estruturalmente divididas em duas regiões, as quais determinam sua especificidade. A porção SH2 (Src homology 2, "counterpart of viral src"), parte importante da estrutura de algumas proteínas citoplasmáticas, caracteriza-se por sua capacidade de interagir, através de alta afinidade, com as seqüências tirosina-fosforiladas de receptores e outras fosfoproteínas (ANDERSON et al, 1990; KOCH et al, 1991; MCGLADE et al, 1992).

Os defeitos genéticos em um ou mais degraus na ação celular da insulina e IGF-1 podem envolver as vias bioquímicas de tecidos que regulam a secreção insulínica, a produção de glicose hepática e de tecidos extra-hepáticos que produzam ou extraiam glicose (ALMIND et al, 1993). Abe et al (1998) descreveram que a resistência à insulina induzida pela deficiência de IRS-1 conduz a um aumento da pressão arterial e dos níveis plasmáticos de triglicérides, implicando num envolvimento da resistência à insulina em ambos os fatores de risco coronariano (ALMIND et al, 1993).

Um polimorfismo no gene do *IRS-1*, com substituição de glicina (GGG) por arginina (AGG) no códon 972 tem sido demonstrado mais freqüentemente em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 do que em pacientes controle e talvez contribua para resistência à insulina (KREMPLE, 1998). Tal polimorfismo ocorre perto de um resíduo de

fosforilação da tirosina (o códon 987) que, após estimulação da insulina, se liga na unidade regulatória do PI-3. Assim, a alteração conformacional e de carga produzida pelo polimorfismo em 972 serviria como potencial fator de anormalidade no transporte da glicose e, segundo sugerem experimentos em adipócitos de rato, também na atividade antilipolítica da insulina (WHITE, 1994; OKADA, 1994).

Alguns estudos tem identificado a substituição da glicina pela arginina no códon 972 no gene *IRS-1* como associado com ação da insulina prejudicada (BARONI et al, 2001). Estudos in vitro tem mostrado que esta mutação está associada com uma redução substancial na atividade PI3-Kinase insulina-estimulada e na junção da sub unidade regulatória P85 da PI3-Kinase para *IRS-1* (BARONI et al, 2001).

Em animais transgênicos, a deficiência de IRS-1 foi associada com resistência à insulina e ratos com mutações nulas em ambos receptores de insulina e genes do *IRS-1* se tornam resistentes à insulina e desenvolvem hiperplasia célula β compensatória (BARONI et al, 2001). Um trabalho relata uma redução de 50% na sensibilidade à insulina em obesos com a mutação G972R do gene *IRS-1* (CLAUSEN et al, 1995). Em adição, encontrou-se que esta mesma mutação estava associada com um aumento no risco significativo para DAC, particularmente em indivíduos obesos (BARONI et al, 1999).

Embora esses achados sugiram fortemente uma interação entre esta mutação G972R do gene *IRS-1* e obesidade, nenhum estudo tem avaliado os possíveis efeitos na variação deste gene no desenvolvimento da obesidade, particularmente obesidade visceral com resistência à insulina. Além disso, os efeitos das formas polimórficas ou mutadas do *IRS-1*

na obesidade associada a resistência à insulina ainda são pouco compreendidos. (BARONI ET AL, 2001)

OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a relação da obesidade com a mutação PRO115GLN do gene *PPAR γ 2* e com o polimorfismo no códon 972 do gene *IRS-1*.

2. 2. Objetivos Específicos

- Comparar as características antropométricas, metabólicas e hemodinâmicas de indivíduos eutróficos, obesos moderados e obesos mórbidos de ambos os sexos, na população do estudo.
- Verificar a prevalência do mutante Pro115Gln do gene *PPAR γ 2* na população do estudo.
- Verificar a prevalência do polimorfismo no códon 972 do gene *IRS-1* na população do estudo.
- Verificar uma possível associação entre a presença do mutante Pro115Gln do *PPAR γ 2* e os parâmetros antropométricos, hemodinâmicos e as variáveis metabólicas estudadas na população do estudo.
- Verificar uma possível associação entre a presença do polimorfismo no códon 972 do *IRS-1* e os parâmetros antropométricos, hemodinâmicos e as variáveis metabólicas estudadas na população do estudo.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. Materiais e Métodos

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular do Câncer e na Unidade Metabólica do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas.

3.1. Casuística

Os voluntários foram selecionados de acordo com o IMC, utilizando a recomendação da Organização Mundial de Saúde (WHO, 1998) para a classificação do estado nutricional. Neste estudo foram considerados indivíduos eutróficos aqueles que possuíam um IMC entre 18,5 e 24,9 kg/m²; indivíduos com IMC maior ou igual a 25 e menor ou igual a 39,9 kg/m² foram denominados obesos moderados e aqueles com IMC maior ou igual a 40 kg/m² foram denominados de obesos mórbidos.

A casuística alcançada neste estudo está representada na tabela 1. Os indivíduos obesos foram selecionados nos Ambulatórios de Medicina Interna e de Cirurgia da Obesidade no Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). A população estudada foi informada dos objetivos e dos procedimentos referentes ao trabalho e todos aqueles aceitaram participar desta pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Informado conforme determinado pelo Comitê de Ética da FCM/UNICAMP, o qual aprovou o presente projeto.

Os critérios de exclusão, tanto para os pacientes obesos como para os indivíduos eutróficos foram a presença de: doença cardiovascular, hipertensão arterial com ou sem uso de medicamento, hipotireoidismo ou hipertireoidismo, diabetes *mellitus*, neoplasias, gravidez, intolerância aos carboidratos, quadros infecciosos, doenças crônico-degenerativas referidas

pelos pacientes e/ou confirmadas nos seus prontuários. Foram excluídos posteriormente aqueles indivíduos que, embora sem antecedente prévio ou fator de risco, tenham demonstrado Teste de Tolerância a Glicose compatível com diabetes *mellitus* tipo 2 durante nosso projeto.

Tabela 1. Casuística.

	IMC (Kg/m ²)	Estudo Metabólico Completo (EMC)	Estudo Metabólico Parcial (EMP)	N Total
Obesos Mórbidos	≥40	7	20	27
Obesos Moderados	≥ 25 e < 40	7	30	37
Eutróficos	≥ 18,5 e < 25	22	45	67

3.1.1. Subgrupos de Estudo

Como demonstrado na tabela 1 o grupo de estudo foi subdividido em: estudo metabólico completo (EMC) e estudo metabólico parcial (EMP).

O subgrupo EMC realizou uma avaliação metabólica que incluiu clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico e Teste Oral de Tolerância a Glicose (TOTG). Esses indivíduos já estavam sendo acompanhados na Unidade Metabólica do Departamento de

Clínica Médica da FCM/UNICAMP pela equipe da Prof^a Dr^a Elza O A Muscelli Berardi, participando de outros protocolos de pesquisa.

Os indivíduos do subgrupo EMP não realizaram clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico nem o TOTG.

3.2. Métodos

3.2.1. Estudo metabólico

Os indivíduos do subgrupo EMC compareceram em duas ocasiões separadas na Unidade Metabólica FCM/UNICAMP, não havendo internação hospitalar em nenhuma delas. No primeiro dia, foram submetidos ao TOTG e no segundo ao clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico, havendo um intervalo mínimo de sete dias entre os dois estudos.

- TOTG: neste teste os indivíduos realizaram jejum noturno de 12 horas mantendo ingestão livre de água. O teste foi realizado em ambiente tranquilo com temperatura controlada ao redor de 20 a 25°C. A ingestão de glicose foi antecedida por um período de 120 minutos, que se denominou de período basal (tempo 0 ou T0). Após a ingestão de 75 gramas de glicose, seguiu-se o período experimental de 120 minutos de duração. Foram coletadas amostras de sangue nos tempos -120', -30', 0', 30', 60' e 120' relativos à ingestão de glicose (T0).

- Clamp euglicêmico hiperinsulinêmico (CLP): utilizou-se uma infusão de 40uU insulina/m² de superfície corporal com duração de 120 min, seguindo a técnica de DeFronzo (De FRONZO, 1979). Os pacientes foram orientados a comparecer à Unidade Metabólica em jejum de alimentos por um período de 12h, com livre ingestão de água.

Foram realizadas duas punções venosas utilizando-se cateter de teflon agulhado do tipo abocath número 20 ou 22. O primeiro cateter foi colocado em antebraço, na fossa cubital, em posição convencional para infusões e conectada a um sistema de três vias. O outro foi colocado no punho, em posição retrógrada, para coleta de todas as amostras de sangue. As amostras foram coletadas desprezando os 2 primeiros mililitros, por estarem diluídos com solução de heparina. A mão foi mantida durante todo o período em caixa térmica com temperatura entre 50 e 60°C para “arterialização” do sangue venoso. Um período basal de 120 minutos precedeu o CLP.

Considerou-se tempo zero do período experimental aquele do início da infusão concomitante de insulina e glicose. A dose calculada de insulina foi diluída numa solução de 47ml de soro fisiológico a 0,9% e 3 mL de sangue do próprio paciente, com objetivo de evitar adesão do hormônio à parede da seringa. Usou-se uma bomba de infusão volumétrica 3M modelo 600 para seringas de 60 ml. No período de 1 a 4 min, a velocidade de infusão da insulina propiciava um aporte de 4mU/Kg/min e de 4 a 7 minutos o aporte era de 2mU/Kg/min. A partir deste momento, a velocidade de infusão era constante para injetar 1 miliunidade de insulina/quilograma de peso corporal por minuto até 120 minutos. Na outra via, foi infundida glicose a 10%, utilizando uma bomba de infusão volumétrica 3M modelo AVI-270. A velocidade de infusão foi calculada e ajustada de acordo com dosagens seriadas da glicemia, em intervalos de 5 minutos. Desta maneira, alterava-se a infusão de glicose para não ocorrer variações maiores que 10% (para mais ou para menos), relativas à glicemia basal do indivíduo.

- Avaliação da Composição Corporal: a avaliação da composição corporal foi realizada através da Impedânciometria (BIA) (FULCHER, 1991), utilizando impedanciômetro da marca Biodynamics modelo 310. Os pacientes foram orientados a: não consumir bebida alcoólica, chá, café e chocolate e não realizar atividade física intensa 24 horas antes do exame.

- Avaliação da Taxa Metabólica: a estimativa da taxa metabólica foi feita através de calorimetria indireta (FERRANNINI, 1988) realizada em condições basais, utilizando calorímetro da Marca SensorMedics, modelo VMax29n, acoplado a uma canopy, durante cerca de 30 minutos no período basal. No decorrer do exame, os pacientes deveriam permanecer em silêncio e acordados para evitar alterações respiratórias. Neste procedimento, avaliou-se o consumo de oxigênio (O₂) e a eliminação de gás carbônico (CO₂), através de medidas a cada minuto do O₂ e CO₂ inspirados e expirados, em litros por minuto e do volume de ar corrente.

- Variáveis Metabólicas: Colesterol Total, HDL - colesterol, LDL – colesterol, Triglicérides, Ácido Úrico, Glicemia e Insulina de jejum.

Os indivíduos do subgrupo EMP compareceram à Unidade Metabólica para realizar os seguintes exames:

- Avaliação da Composição Corporal através da BIA
- Avaliação da Taxa Metabólica através de calorimetria indireta
- Variáveis Metabólicas: Colesterol e Frações, Ácido Úrico, Glicemia e Insulina em jejum.

3.2.2. Métodos laboratoriais usados na caracterização metabólica

As amostras de sangue foram centrifugadas a 4°C, Centrifuge 5804R, marca Eppendorf, a 2000–3000 rpm, por 10–15 minutos, divididas em alíquotas e armazenadas em freezer –20°C até o dia da dosagem.

Glicose plasmática: foi dosada em triplicata por técnica de oxidação de glicose em equipamento automatizado, glucose analyser (Beckman, Fullerton, CA) modelo 6517. Os indivíduos foram classificados de acordo com os critérios da American Diabetes Association, 1997 para glicemia de jejum: normal: < 110 mg/dL; glicemia de jejum alterada: ≥ 110 mg/dL a < 126 mg/dL; diabetes: ≥ 126 mg/dL.

Concentração de insulina no plasma: foi medida por radioimunoensaio usando kits específicos (Linco Research Inc). Este Kit tem reação cruzada com a pró-insulina menor que 2%. Níveis de insulina normal de jejum variam de 5 a 10μU/mL. Nesta população utilizamos valores de P90.

Colesterol sérico: foi medido por método enzimático, realizado em equipamento automatizado Cobas Mira Plus Roche, com o Kit para dosagem COLESTAT, marca Wiener (Argentina).

HOMA IR: para avaliar a sensibilidade : $(I0 * G0) / 22,5$; (MATTHEWS et al, 1985)

Onde: I0= insulinemia de jejum, mg/dl e I0= glicemia de jejum, μU/mL

HDL colesterol sérico: foi medido por método enzimático AA, realizado em equipamento automatizado Cobas Mira Plus Roche, com o Kit para dosagem HDL Colesterol Reactivo Precipitante, marca Wiener (Argentina).

Triglicérides: foram medidos por método enzimático, com o Kit TG COLOR, marca Wiener, em espectrofotômetro marca Spectronic Instruments, modelo Genesys 5 (USA).

Para o perfil lipídico foram considerados os valores recomendados pelo NCEP em 1993. Os indivíduos foram considerados portadores de hipercolesterolemia quando o colesterol total foi ≥ 170 mg/dL para aqueles com idade até 19 anos e ≥ 200 mg/dL para maiores de 20 anos de idade; portadores de hipertrigliceridemia quando os triglicérides fossem ≥ 130 mg/dL para menores de 19 anos e ≥ 140 mg/dL para maiores de 20 anos.

Os valores recomendados para LDL e HDL são:

	2 a 19 anos	adultos
Colesterol – LDL	< 110 mg/dL	< 130 mg / dL
Colesterol – HDL	> 40 mg/dL	> 50 mg/ dL

Ácido Úrico: utilizou-se método enzimático AA no equipamento Cobas Mira Plus Roche com o Kit para dosagem URICOSTAT enzimático, Wiener. Os valores de normalidade de acordo com o Kit foram: homens 2,5 – 6 mg/dl; mulheres: 2 – 5 mg/dl

3.2.3. Medidas Antropométricas

A descrição da padronização de medidas antropométricas compreendeu os seguintes passos:

Mensuração de peso: foi realizada através de uma balança marca Welmy com divisão de 100g, com os indivíduos vestindo roupas leves e sem sapatos.

Altura: foi medida utilizando estadiômetro conectado à balança com divisão de 1 mm. O indivíduo estava sem sapatos, de costas para o estadiômetro.

Circunferência da cintura: foi medida na menor circunferência entre a última costela e a crista ilíaca, ao final da expiração, com fita métrica inelástica.

Circunferência do quadril: foi determinada em sua circunferência máxima, incluindo a extensão máxima das nádegas, com fita métrica inelástica.

IMC: foi calculado pela divisão do peso, em quilos, pela altura, em metros, ao quadrado.

3.2.4. Medidas Hemodinâmicas

Pressão arterial e frequência cardíaca: foram medidas após o exame da calorimetria indireta com o paciente deitado e em repouso por pelo menos 30 minutos após o exame. Utilizou-se um esfigmomanômetro de mercúrio padrão, sendo considerados o primeiro e os últimos sons de Korotkoff para a pressão sistólica e a diastólica, respectivamente. Para os pacientes obesos, as medidas da pressão foram realizadas com aparelho adequado ao diâmetro do braço. Pressão arterial elevada foi definida como pressão sistólica maior que

140 mmHg e/ou pressão diastólica maior que 90 mmHg, de acordo com o VI JNC (SHEPS et al, 1998).

Todos os indivíduos responderam um questionário com o objetivo de obter os seguintes dados: antecedentes pessoais e familiares de diabetes *mellitus*, hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia, cardiopatias ou outras patologias; presença e frequência de tabagismo, etilismo, uso de medicamentos, número de dietas seguidas.

3.2.5. Estudo Genético

A amostra de sangue foi coletada em tubo com EDTA, processada imediatamente e armazenada no Laboratório de Genética Molecular do Câncer (GEMOCA) da FCM/UNICAMP. Foi realizado isolamento do DNA genômico de leucócitos periféricos e a extração do DNA seguiu os procedimentos usados na rotina do laboratório GEMOCA, resumida abaixo.

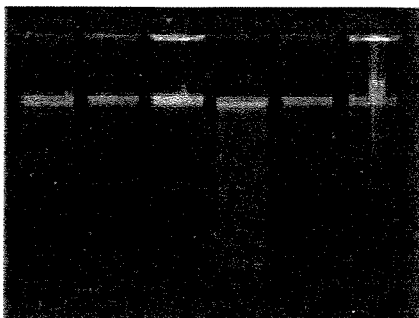
A extração de sangue periférico foi iniciada pela lise de hemácias, utilizando tampão de lise de hemácias e posterior lise de leucócitos com respectivo tampão de lise de leucócitos e SDS seguindo-se incubação a 37°C durante 30 minutos. A tabela 2 detalha os reagentes utilizados na extração de DNA de sangue periférico.

Tabela 2. Reagentes usados na extração de DNA de sangue periférico.

Reagentes	Concentração
Tampão de Lise de Hemáceas	NaCl (10 mM)
	MgCl ₂ (5 mM)
	Tris HCl 10 mM pH 7,5
Tampão de Lise de Leucócitos	NaCl (5 N)
	EDTA (0,2 M)
	Tris HCl (10 mM) Uréia , pH 7,5
SDS	20%
Fenol Saturado com Tris	Fenol , Tris (10 mM , pH 8,0)
Clorofórmio Álcool-Isoamílico	24 : 1
Acetato de Sódio	3 M
Etanol	100 %
Etanol	70 %
TE	Tris (10 mM) , EDTA (1 mM)

Os produtos de extração obtidos pelos procedimentos de extração foram avaliados e quantificados com o auxílio de espectrofotometria e em gel de agarose a 0,8 % como mostra a figura 1.

Figura 1. Gel de agarose a 0,8% de amostras de DNA extraídas de sangue periférico.



PPAR γ 2

O DNA obtido foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) para a região que flanqueia a sequência contendo o sítio de fosforilação da serina do *PPAR γ 2*. Usando um primer sense em que se acrescentavam 3 bases de pares, gerou-se uma mutação acima do local da substituição da prolina na posição 115 da sequência do *PPAR γ 2*, onde se inseriu um sítio para restrição enzimática pela HincII (RISTOW, 1998). A reação de PCR foi feita utilizando um termociclador da marca Progene. Os reagentes utilizados nesta PCR estão descritos na tabela 3 e suas condições estão listadas na tabela 5. Os primers usados estão descritos na Tabela 4. Os produtos obtidos na reação de amplificação por PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2%. Aliquotas de 8 μ l do produto das reações de PCR foram misturadas com 2 μ l de azul de bromofenol (azul de bromofenol 0,25%; sacarose 40%) e aplicadas no gel de agarose a 2%. Após a migração o gel foi tratado com brometo de etídeo (8mg/dL) e a visualização foi feita sob iluminação ultra - violeta. Utilizou-se um marcador de peso molecular (Ladder 100 bp) para a calibração da reação.

Os resultados da amplificação foram visualizados excitando o brometo de etídeo incorporado ao DNA com luz ultra-violeta, sendo fotografados e arquivados através de um sistema Kodak de visualização e fotografia. O produto de PCR foi então submetido a uma enzima de restrição Hinc II utilizando-se 0,5 µl da enzima, 5,0 µl de tampão e 12,0 µl do produto de PCR. Os produtos resultantes foram visualizados em gel de agarose 3,5% tratado com brometo de etídeo, sendo que os fragmentos digeridos pela enzima foram de 129 bp para indivíduos não portadores; 104 bp e 25 bp para portadores do polimorfismo em homozigose.

IRS-1

O gene *IRS-1* também foi amplificado por PCR. Os reagentes utilizados estão listados na tabela 3 e suas condições descritas na tabela 5. Os primers usados estão descritos na Tabela 4. O produto desta PCR foi submetido a uma enzima de restrição mVal, a qual reconhece a sequência correspondente para a substituição GGG (glicina) por AGG (arginina) no códon 972. Nesta reação enzimática utilizou-se 1,0 µl da enzima mVal, 1,9 µl de tampão e 16,1 µl de PCR. Os produtos resultantes foram visualizados em gel de agarose 3,5% tratado com brometo de etídeo, sendo que os fragmentos digeridos pela enzima foram de 23, 81 e 158bp para indivíduos não portadores e 23, 81, 158, 107 e 51bp para portadores do polimorfismo em heterozigose (HITMAN et al, 1995).

Tabela 3. Reagentes usados na reação de PCR para *PPAR γ 2* e *IRS-1*.

Reagentes	Concentração <i>PPARγ2</i>	Concentração <i>IRS-1</i>
10 X PCR Buffer	KCl (25 mM)	KCl (25 mM)
	Tris HCl (10 mM) PH 8,4	Tris HCl (10 mM) PH 8,4
MgCl ₂	1,5 Mm	1,5 mM
dAtp, dCtp, dGtp, dTtp	0,1 mM	0,1 mM
Primer sense	10 μ M	10 μ M
Primer anti sense	10 μ M	10 μ M
Taq DNA Polymerase	3U	5U
DNA genômico	2-3 ng	2-3 ng

Tabela 4. Primers - *PPAR γ 2* e *IRS-1*.

Primer	Sequência
<i>PPARγ2</i>	s 5' TGC AAT CAA AGT GGA GCC TGC ATG TC 3'
	as 5' CAG AAG CTT TAT CTC CAC AGA C 3'
<i>IRS-1</i>	s 5' CTT CTG TCA GGT GTC CAT CC 3'
	As 5' TGG CGA GGT GTC CAC GTA GC 3'

s – fita sense as – fita antisense

Tabela 5. Condições utilizadas para amplificação da reação de PCR para *PPAR γ 2* e *IRS-1*.

Temperatura	Tempo	Número de Ciclos
94° C	5 minutos (<i>IRS-1</i>)	1
	3 minutos (<i>PPARγ2</i>)	
94° C	1 minuto (<i>IRS-1</i>)	1
	3 minutos (<i>PPARγ2</i>)	
60,5° C (<i>IRS-1</i>)	45 segundos (<i>IRS-1</i>)	35
61° C (<i>PPARγ2</i>)	45 segundos (<i>PPARγ2</i>)	
72° C	1 minuto	1
72° C	7 minutos (<i>IRS-1</i>)	1
	10 minutos (<i>PPARγ2</i>)	

3.3. Metodologia Estatística

Todas as informações obtidas e os resultados foram digitados em banco de dados, utilizando-se o programa Excel. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa Statistical Analysis System (SAS) for Windows, versão 8.2. SAS Institute Inc, 1999-2001, Cary, NC, USA.

Para a comparação dos resultados entre os sexos masculino e feminino utilizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney. A comparação entre os grupos eutróficos, obesos moderados e obesos mórbidos foi feita pela análise Anova-Fatorial. Para verificar a diferença de distribuição de frequência das variáveis categóricas entre grupos foram feitas tabelas de contingência e utilizados os testes de associação do Qui-quadrado (X^2) ou teste de Fisher quando indicado.

RESULTADOS

4. Resultados

4.1. Características da população de estudo.

Serão apresentados separadamente as características do:

Grupo Total – engloba todos os indivíduos analisados independente de haverem realizado estudo metabólico completo ou parcial. Permite comparação dos parâmetros antropométricos, hemodinâmicos e bioquímicos entre os sexos.

Subgrupos de estudo – estudo metabólico parcial e completo. Permite comparação dos parâmetros antropométricos, hemodinâmicos e bioquímicos entre os grupos eutrófico e obeso.

4.1.1. Descrição das variáveis do grupo total.

A classificação do estado nutricional da população estudada foi feita através das recomendações da OMS e posteriormente subdividida por sexo. As características antropométricas, hemodinâmicas e metabólicas de acordo com os sexos estão demonstradas na Tabela 6 onde também apresentamos o resultado da comparação estatística entre homens e mulheres .

Nota-se que a amostra possui na sua maioria indivíduos do sexo feminino (n=91), o que corresponde à característica dos pacientes que freqüentam os Ambulatórios de Medicina Interna e de Cirurgia da Obesidade no Hospital das Clínicas da UNICAMP.

A idade da população variou de 18 a 67 anos, sendo a média de $29,2 \pm 1,7$ anos para o sexo masculino e de $32,9 \pm 1,2$ anos para o feminino ($p=0,03$ – teste Mann Whitney).

Apesar de apresentarem diferença estatística de peso e altura, não houve diferença no IMC de homens e mulheres. A distribuição da gordura avaliada pela circunferência da cintura e a relação cintura-quadril apresentou valores mais elevados para o sexo masculino ($p=0,04$ e $p=0,0001$ respectivamente). O sexo feminino apresentou um maior valor do HDL-colesterol ($p=0,03$), enquanto que o sexo masculino um maior valor de ácido úrico ($p<0,0001$).

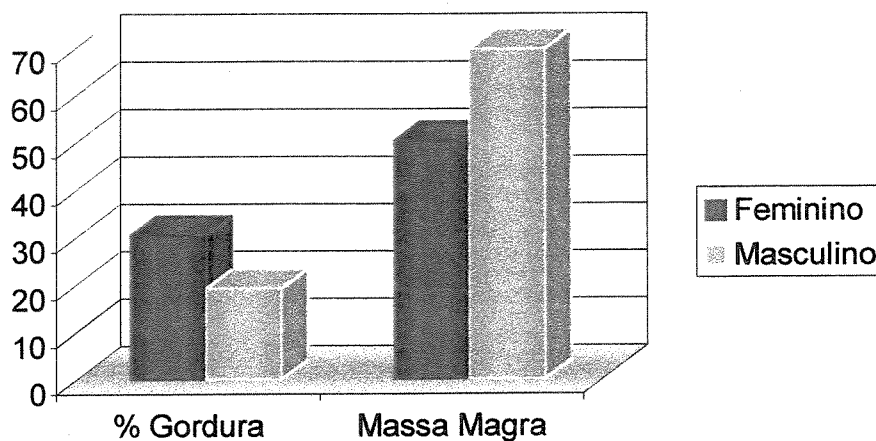
TABELA 6 . CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS, HEMODINÂMICAS E METABÓLICAS DE ACORDO COM OS SEXOS.

Variáveis	Sexo Masculino (n = 40)	Sexo Feminino (n= 91)	P#
Idade (anos)	29,2 ± 1,7	32,9 ± 1,2	0,03
Peso (kg)	92,3 ± 5,8	77,2 ± 3,4	0,0006
Altura (cm)	174,7 ± 1,0	161,2 ± 0,7	< 0,001
IMC (kg/m ²)	30,3 ± 1,97	29,7 ± 1,27	ns
Cintura (cm)	99,6 ± 4,42	91,3 ± 2,55	0,04
Relação cintura quadril	0,88 ± 0,01	0,82 ± 0,01	0,0001
Pressão arterial sistólica (mmHg)	120 ± 1,52	120 ± 1,61	ns
Pressão arterial diastólica (mmHg)	79 ± 1,0	79 ± 1,14	ns
Frequência cardíaca (bpm)	71,9 ± 1,41	74,2 ± 0,74	ns
Colesterol total (mg/dL)	172 ± 7	182 ± 3	ns
Colesterol HDL(mg/dL)	41 ± 2	47 ± 1	0,03
Colesterol LDL(mg/dL)	113 ± 6	114 ± 3	ns
Triglicérides (mg/dL)	102 ± 8	98 ± 5	ns
Ácido úrico (mg/dL)	7 ± 0,2	5 ± 0,1	< 0,0001
Glicemia (mg/dL)	86,6 ± 2,27	85,1 ± 1,49	ns
Insulina (pmol/l)	18,22 ± 1,77	17,6 ± 1,0	ns
HOMA IR	4,1 ± 0,5	3,8 ± 0,3	ns
HOMA B	11,1 ± 2,1	10 ± 0,8	ns

p # - valores de p para masculino vs feminino; p< 0,05 entre eutróficos e obesos definidos por IMC e classificados por sexo. Análise Mann - Whitney.

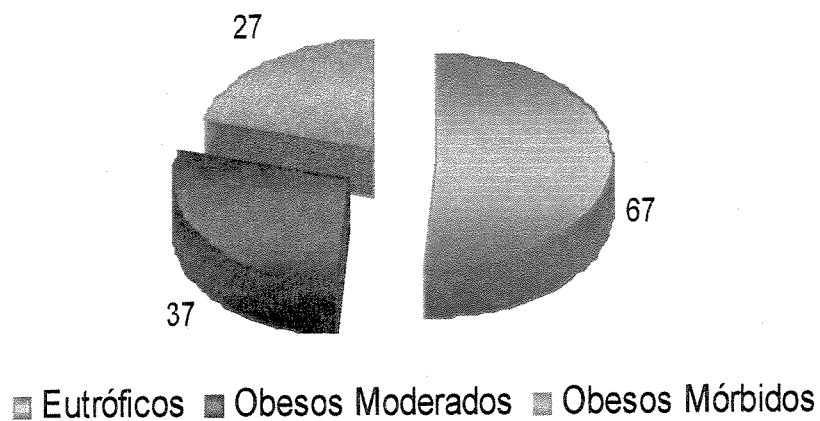
O percentual de gordura analisado pela BIA apresentou valores de percentagem de gordura maior para o sexo feminino do que para o sexo masculino ($30,4 \pm 1,12$ e $19,2 \pm 1,89$ respectivamente; $p < 0,0001$) e menores valores de massa magra em Kg ($50,4 \pm 1,34$ e $69,8 \pm 2,33$) para o sexo feminino e masculino, respectivamente ($p < 0,0001$). A figura 2 demonstra a distribuição do percentual de gordura e de massa magra avaliados pela BIA em ambos os sexos.

Figura 2: Percentual de gordura entre os sexos.



O estado nutricional de toda nossa população de estudo está representado na Figura 3.

Figura 3. Distribuição da população estudada de acordo com o estado nutricional.



Apresentamos na Tabela 7 as características antropométricas, hemodinâmicas e metabólicas da população estudada classificada de acordo com seu estado nutricional.

Tabela 7. Características antropométricas, hemodinâmicas e metabólicas entre eutróficos, obesos moderados (Ob. Mod.) e obesos mórbidos (Ob. Mor).

Variáveis	Eutróficos (n = 67)	Ob. Mod. (n= 37)	Ob. Mor (n= 27)	P
Idade (anos) ^a	26,5 ± 1,0	39 ± 2,0	35 ± 1,8	< 0,001
Peso (kg)	60,5 ± 1,14	78,6 ± 2,25	139,2 ± 5,7	< 0,001
Altura (cm) ^b	167 ± 1,0	161 ± 1,4	165 ± 1,71	0,0018
IMC (kg/m ²)	21,5 ± 0,2	30 ± 0,66	50,6 ± 1,72	< 0,001
Cintura (cm)	76 ± 0,94	96 ± 1,76	134 ± 3,49	< 0,001
Relação cintura quadril	0,79 ± 0,008	0,86 ± 0,014	0,91 ± 0,016	0,0001
PA sistólica (mm Hg)	113,8 ± 1,0	120,2 ± 1,69	134,3 ± 3,0	< 0,001
PA diastólica (mm Hg)	75 ± 0,89	78,8 ± 0,97	88 ± 2,32	< 0,001
Frequência cardíaca (bpm) ^c	72 ± 0,9	73,7 ± 1,2	77,1 ± 1,19	0,003
Colesterol total (mg/dL) ^f	173 ± 4,3	191 ± 5,5	178 ± 6,4	0,01
Colesterol HDL (mg/dL)	49 ± 1,56	44 ± 1,76	36 ± 1,58	< 0,001
Colesterol LDL (mg/dL) ^h	108 ± 4,16	123 ± 4,15	116 ± 5,88	0,02
Triglicérides (mg/dL) ^g	86 ± 5,48	102 ± 7,2	125 ± 7,2	< 0,03
Ácido úrico (mg/dL) ⁱ	5 ± 0,18	5,4 ± 0,23	6,9 ± 0,31	< 0,0001
Glicemia (mg/dL) ^d	80 ± 1,82	91,9 ± 1,8	91 ± 2,0	< 0,003
Insulina (pmol/l)	12,4 ± 0,49	17,7 ± 1,0	31 ± 2,6	< 0,001
HOMA IR	2,49 ± 0,12	4 ± 0,31	6,9 ± 0,61	< 0,001
HOMA B ^e	13 ± 1,33	9,2 ± 1,28	5 ± 0,68	0,006

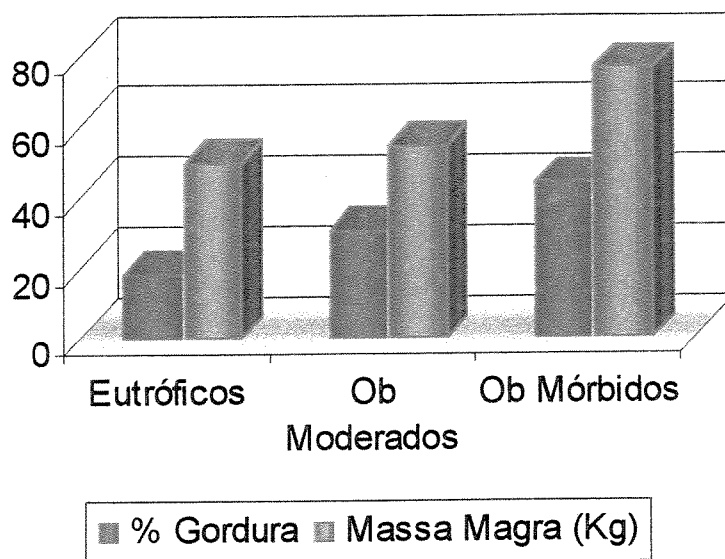
p # Análise Anova-Fatorial. a) p< 0,0001 Eutróficos vs Ob. Mod. e vs Ob. Mor.; b) p=0,0018 Eutróficos vs Ob. Mod.; c) p=0,003 Eutróficos vs Ob. Mor.; d) p< 0,0001 Eutróficos vs Ob. Mod. e p=0,0003 Eutróficos vs Ob. Mor.; e) p< 0,0006 Eutróficos vs Ob. Mor.; f) p=0,01 Eutróficos vs Ob.

Mod.; g) $p < 0,03$ Eutróficos vs Ob. Mod. e Ob. Mod. vs Ob. Mor.; h) $p = 0,02$ Eutróficos vs Ob. Mod.; i) $p < 0,0001$ Eutróficos vs Ob. Mor. e Ob. Mod. vs Ob. Mor.

Nota-se que novamente houve uma diferença estatística entre os grupos (Eutróficos, Obesos Moderados e Obesos Mórbidos) em relação à idade. Mesmo agrupando o grupo dos obesos em uma única categoria, essa diferença de idade ainda se mantinha já que nossos controles eutróficos provinham principalmente de alunos e colegas de serviço enquanto que a população obesa predominante era de pacientes do HC/UNICAMP onde são raros os obesos jovens.

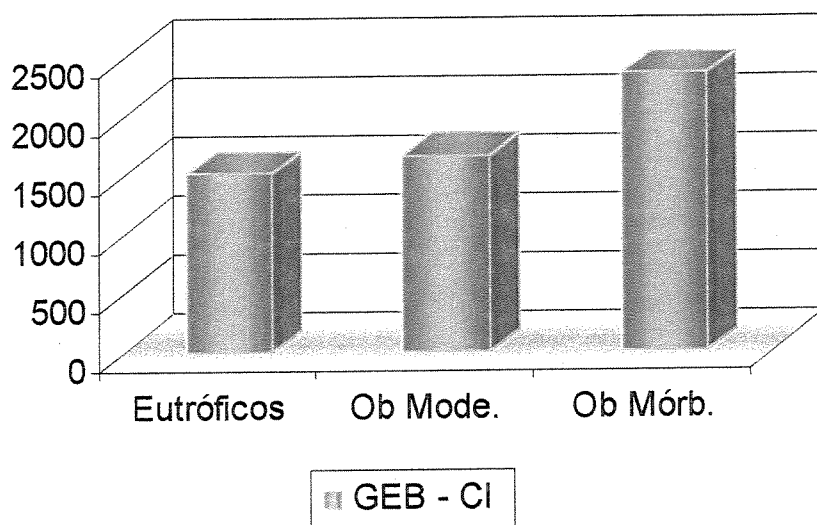
Em relação à distribuição da gordura, tanto a circunferência da cintura como a relação cintura – quadril estavam aumentadas nos obesos ($p < 0,001$: circunferência cintura e $p = 0,0001$: relação cintura - quadril). Em relação ao percentual de gordura e o valor da massa magra em Kg, os eutróficos apresentaram um % de gordura ao redor de $18,1 \pm 0,87$, bem inferior aos obesos moderados ($30,5 \pm 1,2$ %) e aos obesos mórbidos ($43,7 \pm 0,97$ %). Os valores de massa magra também foram inferiores para os eutróficos ($49,5 \pm 1,3$ Kg) em relação aos obesos moderados ($54,1 \pm 2$ Kg) e aos obesos mórbidos ($76,3 \pm 3$ Kg) sendo proporcional ao peso e para sustentação do peso corpóreo. A figura 4 ilustra os resultados da composição corporal segundo o estado nutricional pela BIA.

Figura 4: Composição corporal segundo o estado nutricional pela BIA.



Em relação ao gasto energético basal, mostramos na figura 5 uma comparação entre os indivíduos eutróficos, obesos moderados e obesos mórbidos. O gasto energético avaliado pela calorimetria indireta (CI) foi diferente entre os eutróficos, obesos moderados e obesos mórbidos ($p < 0,0001$ – Anova-Fatorial).

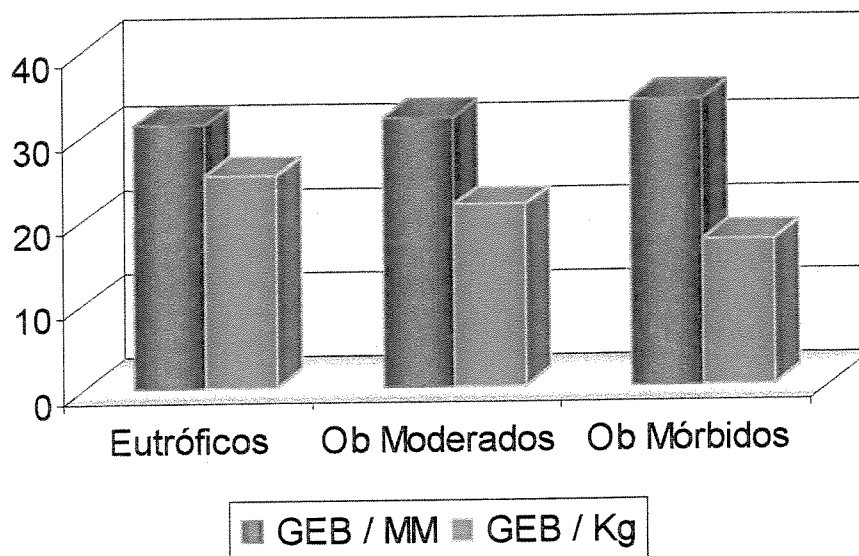
Figura 5: Gasto energético basal – calorimetria indireta - estado nutricional.



A figura 6 demonstra esse gasto energético basal em relação à massa magra por quilo de peso. Quando comparamos o gasto energético total dos grupos divididos enquanto à massa magra, observamos que não há uma diferença no gasto energético. Através da análise Anova-Fatorial obtivemos valores de $p=0,47$ quando comparamos eutróficos e obesos moderados; $p=0,93$ para eutróficos versus obesos mórbidos e $p=0,61$ para obesos moderados versus obesos mórbidos.

Comparando o gasto energético basal pela CI em relação ao peso corpóreo em quilos, verifica-se que há uma diferença estatística entre esse gasto entre eutróficos, obesos moderados e obesos mórbidos ($p < 0,0001$).

Figura 6: Gasto energético basal em relação a massa magra e por peso corpóreo em quilos – Calorimetria Indireta.



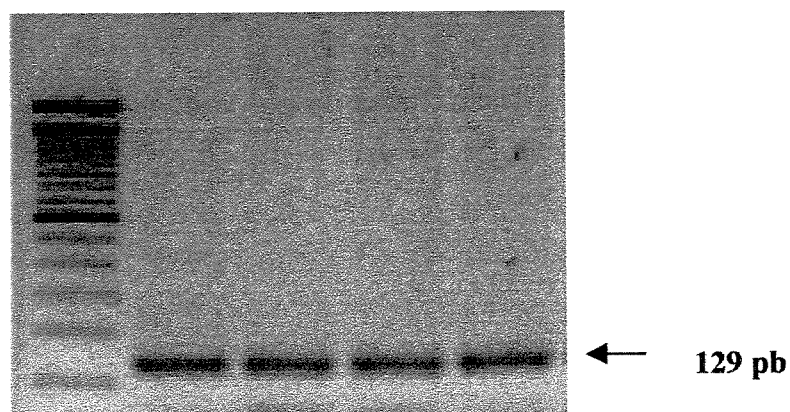
Em relação aos parâmetros hemodinâmicos, tanto a pressão arterial diastólica quanto a sistólica e a frequência cardíaca eram mais elevadas nos obesos do que nos eutróficos ($p < 0,001$, $p < 0,001$ e $p = 0,003$, respectivamente).

Entre as variáveis metabólicas, o perfil lipídico mostrou que os obesos possuíam níveis mais elevados de colesterol total e LDL - colesterol ($p = 0,01$ e $p = 0,02$, respectivamente). Em relação ao HDL-colesterol houve diferença estatística entre eutróficos, obesos moderados e obesos móbidos, sendo que os obesos móbidos eram o que apresentavam um pior valor de HDL-colesterol. Os valores de triglicérides também eram mais elevados nos obesos ($p < 0,03$). O ácido úrico era mais elevado mais elevado nos

obesos, com um valor de $p < 0,0001$ entre magros e obesos mórbidos e o mesmo para obesos moderados versus obesos mórbidos.

A figura 7 demonstra a amplificação por PCR para o gene *PPAR γ 2*.

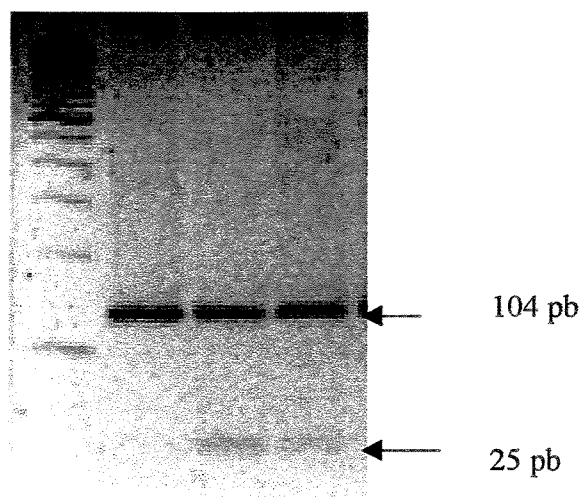
Figura 7. Gel de agarose a 2% para amplificação do gene *PPAR γ 2*.



Na coluna 1 temos um marcador de peso molecular de 100 pares de bases (bp) usado para a calibração da reação. Nas demais colunas, há a amplificação do gene *PPAR γ 2* (129 bp) para a região que flanqueia a sequência contendo o sítio de fosforilação da serina do *PPAR γ 2*.

A figura 8 demonstra o resultado da amplificação de PCR após digestão enzimática para verificação da presença ou não da mutação para o gene *PPAR γ 2*.

Figura 8. Amplificação dos produtos de PCR após digestão enzimática - *PPAR γ 2*.



Observa-se a presença de 2 bandas, indicativas da digestão nas colunas 2 e 3.

A figura 9 mostra uma reação de PCR exemplificando os resultados obtidos na amplificação do gene do *IRS-1*. Estes produtos de PCR foram submetidos a restrição enzimáticas, como exemplificamos através da Figura 10.

Figura 9. Amplificação do gene *IRS-1* – Gel de agarose 2%.

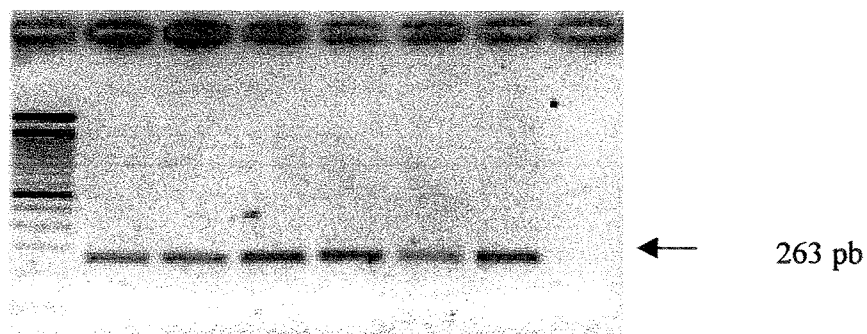
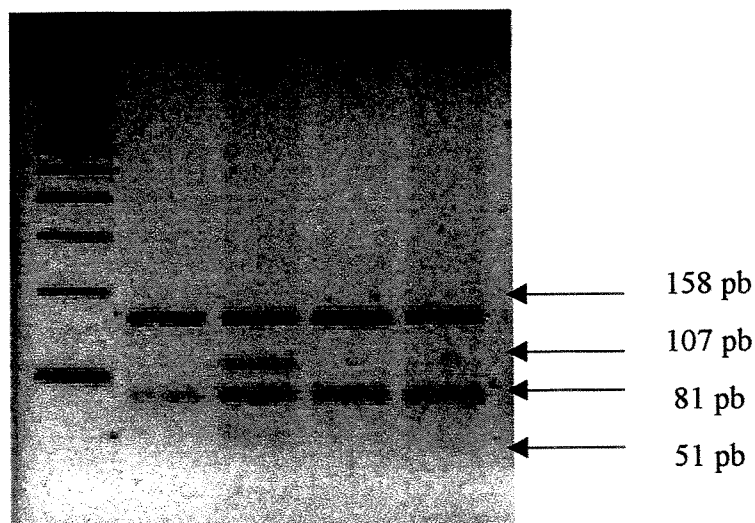


Figura 10. Amplificação do gene *IRS-1* após digestão enzimática.



Do total de 131 casos submetidos a análise genéticas, apenas 5 (3,8%) indivíduos possuíam a mutação no gene *PPAR γ 2*, todos eles em homozigose. Dentre estes 4 indivíduos, 2 eram eutróficos, 1 obeso moderado e 2 obesos mórbidos. Em relação a resistência insulínica, usando-se a HOMA IR, classificamos 1 destes 4 indivíduos como HOMA IR $P > 90$ e, portanto, resistente à insulina. Trata-se de um obeso mórbido.

Quanto ao polimorfismo do gene *IRS-1*, a prevalência encontrada foi de 12 (9,1%) casos, todos em heterozigose. Entre estes 12 indivíduos, 7 eram eutróficos, 3 obesos moderados e 2 obesos mórbidos. Novamente usando o valor HOMA IR em percentis, encontramos apenas 1 indivíduo entre estes 12 que apresentava um valor de HOMA IR acima do percentil 90 e era classificado como obeso mórbido.

Não encontramos qualquer relação entre o perfil genotípico para *PPAR* γ 2 ou para *IRS-1* com o perfil bioquímico, hemodinâmico ou os parâmetros antropométricos estudados.

DISCUSSÃO

A obesidade é uma doença crônica grave associada a uma série de comorbidades. Especificamente, os pacientes com excesso de peso estão sujeitos a vários fatores de risco cardiovascular, incluindo a resistência à insulina, diabetes *mellitus* tipo 2, hipertensão arterial e dislipidemia. Estudos prospectivos demonstram que a mortalidade crescente associada à obesidade é, em grande parte, devida a doenças cardiovasculares. O estudo de Framingham (LISSNER et al, 1991) e outros demonstraram, em adultos, a forte associação de obesidade e doença cardiovascular. Em uma análise dos dados do “US Cancer Prevention Study II”, a mortalidade cardiovascular ao longo de 14 anos em mais de 300.000 adultos não-tabagistas e sem histórico de doença cardíaca aumentou de acordo com o IMC tanto em homens quanto em mulheres (CALLE et al, 1999). Entre as mulheres que nunca foram tabagistas incluídas no “Nurse’s Health Study”, outro grande estudo um acompanhamento de 16 anos, as pacientes obesas apresentaram um risco quatro vezes maior de óbito decorrente de uma doença cardiovascular do que as mulheres mais magras (MANSON et al, 1995).

Os efeitos nocivos para a saúde dependem não somente do acúmulo excessivo de tecido adiposo, mas também da composição corporal (WHO, 1997; GIROLAMI, 1996) e da distribuição regional do tecido adiposo no corpo (GIROLAMI, 1996). Estima-se que a cada 10% de aumento no peso corporal haja aproximadamente 20% de aumento na incidência de doenças coronarianas (PEREIRA et al, 1999). A distribuição central da gordura é, por si só, um fator de risco para doenças cardiovasculares. Quando associada à obesidade, a distribuição central da gordura agrava ainda mais este risco (KAHN, 1994; KISSEBACH et al, 1982; LAPIDUS et al, 1984). No presente estudo, a distribuição da

gordura avaliada pela circunferência da cintura e a relação cintura-quadril sugere que os homens da população examinada possuem acentuado risco de doenças cardiovasculares. O percentual de gordura analisado pela BIA, entretanto, apresentou valores percentuais de gordura mais elevados para o sexo feminino ($p < 0,0001$) que possui menores valores de massa magra em Kg ($p < 0,0001$). Também sabemos que as mulheres com maior adiposidade abdominal demonstram um aumento de risco cardiovascular semelhante ao dos homens (REXRODE, 1998). Vários autores têm demonstrado que a distribuição central de gordura associa-se a uma piora no metabolismo de glicose e a doença cardiovascular (KISSEBACH et al, 1982; YAMASHITA et al, 1996), mesmo em mulheres magras (REXRODE et al, 1998).

Em relação aos parâmetros hemodinâmicos observados em nosso estudo, tanto a pressão arterial diastólica quanto a sistólica eram mais elevadas entre os obesos (tabela 7), o que era acompanhado pela frequência cardíaca. Essas observações corroboram as da literatura indicando que os fenômenos hemodinâmicos relacionados ao excesso de peso podem levar diretamente a repercussões cardiovasculares como hipertrofia cardíaca, arritmias e aumento do débito cardíaco (MESSERLI, 1982). Deve-se lembrar que há também pesquisas demonstrando forte associação entre gordura abdominal e hipertensão (BLAIR, 1984; WHITE, 1986), fechando o círculo vicioso que envolve o ganho de peso e a doença cardiovascular.

Em relação aos parâmetros bioquímicos, observamos valores de HDL-colesterol mais baixos entre os homens, mais uma vez acentuando o risco cardiovascular da população masculina estudada. A relação entre o HDL e a doença coronariana

aterosclerótica vem sendo investigada desde que, em 1951, Barr et al mostraram que elas possuem relação inversa. Em 1975, Miller e Miller salientaram o possível papel protetor da HDL, mas foram principalmente os resultados de pesquisas prospectivas, com longo acompanhamento de grandes amostras populacionais, que definiram seu valor prognóstico. Em 1984, foi publicada a experiência adquirida com quatro grandes estudos norte-americanos (“Framingham Study”, “Lipid Research Clinics Prevalence Mortality Follow – up Study”, “Coronary Primary Prevention Trial” e “MRFIT”), estabelecendo definitivamente HDL-colesterol como fator de risco independente para doença aterosclerótica coronariana, tanto para homens como para mulheres. Merece também ser ressaltado que, segundo diferentes pesquisas, o risco aterogênico é potencializado quando há simultaneidade de baixos valores de HDL-colesterol e elevados de LDL-colesterol. Esse fato foi bem evidenciado pela pesquisa realizada na cidade de Münster, na Alemanha, que concluiu 19.698 pessoas de ambos os sexos, entre 16 e 65 anos (GIANNINI, 1998). O perfil lipídico observado em nossa população de sexo masculino é muito preocupante já que eles possuem baixos níveis de HDL e concomitantes níveis elevados de LDL-colesterol (tabela 6). Quando analisamos a população obesa, estes fatores são ainda mais evidentes. O perfil lipídico desfavorável, juntamente com níveis séricos elevados de triglicérides, colesterol total e LDL e baixos níveis de HDL, tem sido repetidamente associado a risco para doença cardíaca (WHO, 1990). O aumento nos níveis séricos de triglicérides também têm sido correlacionados como fator de risco independente para doença cardiovascular, mesmo com valores normais de colesterol total e LDL (CULLEN, 2000). Além disso, o risco cardiovascular aumenta em seis vezes caso esteja associado a baixos valores de HDL (CULLEN, 2000).

Também observamos que os obesos mórbidos envolvidos neste estudo apresentavam elevação de níveis de ácido úrico (tabela 7). Níveis séricos elevados de ácido úrico também têm sido associados ao desenvolvimento de doença aterosclerótica coronariana e do próprio infarto do miocárdio (BRAND et al, 1985). O estudo prospectivo “The Olivetti Heart Study” demonstrou forte associação entre hiperuricemia e risco de desenvolvimento de hipertensão arterial, especialmente no sexo masculino (JOSSA et al, 1994). Associação entre hiperuricemia e os vários elementos da síndrome plurimetabólica também têm sido relatadas com frequência. No “Gothenbourg Study of Women” foram relatadas correlações altamente significantes entre níveis plasmáticos de ácido úrico e os valores da colesterolemia, trigliceridemia, glicemia, IMC e relação cintura – quadril. Assim, parecem existir sólidas evidências da associação de níveis séricos elevados de ácido úrico com morbidade/mortalidade cardiovascular. Os mecanismos pelos quais o ácido úrico poderia estar influenciando tanto a morbidade como as mortalidades cardiovasculares, entretanto, não são ainda adequadamente conhecidos (BENGTSSON et al, 1988).

Nossos dados também indicam que os indivíduos obesos, à semelhança do descrito amplamente na literatura, possuem hiperinsulinemia (tabela 7). A hiperinsulinemia em obesos está relacionada à hipersecreção hormonal (POLONSKI, 1998; FERRANNINI, 1997; MUSCELLI, 1997). Resistência à insulina com hiperinsulinemia representa fator de risco coronariano, particularmente quando associadas à hipertensão, intolerância à glicose, obesidade, hipertrigliceridemia e baixos níveis séricos de HDL-colesterol (KREMLER et al, 1998). Mais ainda, sugere-se que a hiperinsulinemia predispõe à doença isquêmica independentemente dos outros fatores de risco

cardiovascular, embora os mecanismos implicados ainda estejam obscuros (KREMPLER et al, 1998). Em particular, o papel específico da resistência à insulina ou hiperinsulinemia precisa ser esclarecido. Uma possível explicação envolve uma elevada oferta de ácidos graxos livres ao fígado, devido à maior massa adiposa, associada à menor supressão da lipólise pela insulina. Logo, a menor utilização de glicose pode ser consequência da competição entre glicose e lipídeos, já que a infusão de lipídeos em pessoas normais diminui a captação de glicose (FERRANNINI, 1983). E, neste caso, tanto a oxidação como a síntese de glicogênio estão afetadas. Entretanto, este é um ponto controverso já que Colberg (1995) encontrou associação de obesidade visceral e resistência à insulina com reduzida utilização de ácidos graxos pelo músculo no período pós absoritivo. Contudo, é importante observar que os mecanismos principais da resistência à insulina abrangem os receptores de insulina e a ativação subsequente dos substratos intracelulares (sinalização insulínica) e também as variadas vias metabólicas intracelulares.

Em relação à análise genética, verificou-se que da amostra total apenas 5 (3,8%) indivíduos possuíam a mutação no gene PPAR γ 2. Ristow e col (1998) estudaram 358 indivíduos alemães, incluindo 121 indivíduos obesos (com IMC > 29 Kg/m²) e 237 indivíduos de peso normal. Encontraram quatro indivíduos obesos carreadores da mutação, representando portanto uma prevalência de 1,12% da sua população. No entanto, esta mutação que não foi evidenciada por Ristow em nenhum dos 237 indivíduos normais. Todos os indivíduos com o alelo mutante eram significativamente obesos, com um IMC variando de 37,9 a 47,3 Kg/m², comparando com uma média de 33,6 Kg/m² dos outros indivíduos obesos. Ristow sugeriu que a conversão da prolina pela glicina na posição 115

no gene *PPAR γ 2* aceleraria a diferenciação de adipócitos, o que poderia causar a obesidade. Nosso estudo, embora mostrando uma prevalência maior do que na população alemã, também identificou a mutação em 2 indivíduos eutróficos além de confirmar sua existência em obesos, já que 1 de nossos pacientes era obeso moderado e 2 obesos mórbidos. Não houve correlação entre a presença da mutação e nenhum dos parâmetros antropométricos, bioquímicos ou hemodinâmicos estudados. Tais dados sugerem que a mutação nada mais seja do que uma variante anômala do gene, de pequena repercussão clínica.

Mais recentemente, Clement e col (2000), estudaram a possível associação dessa mutação Pro115Gln com vários fenótipos clínicos e metabólicos em três grandes populações independentes de indivíduos não obesos e não diabéticos; diabéticos tipo 2 e obesos caucasianos franceses severamente obesos. O estudo não encontrou nenhuma mutação num total de 1069 indivíduos, incluindo 626 obesos. Terrett e col (2000), também verificaram a prevalência da mutação em 1786 indivíduos caucasianos diabéticos de tipo 2 incluindo um grupo de 61 obesos e em 618 indivíduos controle normais. Este estudo também não detectou nenhuma mutação Pro115Gln no gene *PPAR γ 2*. Um terceiro estudo em 752 indivíduos com IMC de ≥ 31 Kg/m² e 869 indivíduos não obesos controles tampouco encontrou a variante Pro115Gln (EK et al, 1999). Witchel e col (2001), procurou verificar se a variante Pro115Gln do gene *PPAR γ 2* afetaria a diferenciação de adipócitos e a sensibilidade à insulina estudando 63 crianças que apresentavam puberdade precoce e hiperandrogenismo. Nenhuma das crianças apresentou a mutação pesquisada.

Quanto ao polimorfismo do gene *IRS-1*, a prevalência encontrada em nosso estudo foi de 9,1%, sendo 7 indivíduos eutróficos, 3 obesos moderados e 2 obesos mórbidos.

Novamente não encontramos correlação entre a presença do polimorfismo e qualquer das características relacionadas à obesidade que pesquisamos. Sigal e col (1996) encontraram a mutação G972R do gene *IRS-1* em 5,7% de 192 indivíduos diabéticos e em 6,9% de 104 controles, números muito parecidos com os que nós encontramos. Embora Almind e col (1993) sugerissem que a mutação está relacionada ao diabetes *mellitus*, nenhum estudo conseguiu demonstrar maior prevalência na população de diabéticos do que entre indivíduos normais (HAGER, 1993; HITMAN, 1993; IMAI, 1994; LAAKSO, 1994).

CONCLUSÃO

Vários estudos relatam que alguns fatores genéticos e ambientais estão implicados na obesidade (FROGUEL, 2000), sendo que os fatores genéticos teriam ação permissiva para os fatores ambientais e em alguns casos poderiam, isoladamente, ser determinantes da obesidade constitucional (ARNER, 2000). É claro que as variáveis nutricionais, metabólicas e psicossociais interagem entre si e com os fatores genéticos, facilitando o desenvolvimento do fenótipo da obesidade (HALPERN et al, 1998).

A obesidade e a composição corporal desempenham papel importante nas alterações das variáveis metabólicas e verificaram alterações de acordo com o estado nutricional de ambos os sexos.

Embora tenha demonstrado uma prevalência significativa das variáveis dos genes do *PPAR γ 2* e do *IRS-1* em nossa população, não conseguimos correlacionar tais genes com nenhum parâmetro de resistência à insulina nem tampouco com outros fatores relacionados. Nossos dados não favorecem a hipótese de uma influência dos genes do *PPAR γ 2* e do *IRS-1* na fisiopatogenia da obesidade e da resistência insulínica. Entretanto, a população por nós genotipada é relativamente pequena, de modo que não podemos descartá-la. No entanto, mais estudos são necessários para elucidar quais mecanismos estariam sendo relevantes do desenvolvimento da obesidade.

SUMMARY

Obesity is a complex, multifactorial disease that develops from the interaction between genotype and environment. It may be defined as a syndrome characterized by an increase in body fat storage and its prevalence has increased dramatically in industrialized and developing nations. There are several reasons for medical concern regarding overweight and obesity. It increases the risk for several diseases, especially cardiovascular diseases, type 2 Diabetes Mellitus and hypertension.

The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (*PPAR*)- γ is a transcription factor that belongs to the same family of nuclear receptors as steroid and thyroid hormone receptors. *PPAR*- γ is a nuclear ligand-dependent transcription factor that promotes adipocyte differentiation and influences insulin sensitivity. A number of genetic variants in the *PPAR* γ gene have been identified. These include a very rare gain-of-function mutation (Pro115Gln) that was associated by Ristow et al with obesity.

The Insulin Receptor Substrate -1 (*IRS*-1) functions as a key proximal signaling molecule for both insulin receptor and insulin-like growth factor-1 receptor signaling pathways. *IRS*-1 is the principal substrate for insulin and insulin-like growth factor-1 (*IGF*-1) receptors; it is present throughout tissues that are insulin sensitive, including sites responsible for glucose production, glucose clearance, and pancreatic β -cells. A Gly $\rightarrow$ Arg substitution at codon 972 of *IRS*-1 has been described as associated with obesity, particularly visceral obesity, with which insulin resistance is predominantly associated. The purpose of this study was to evaluate the presence of *IRS*-1 G972R and *PPAR* γ 2 Pro115Gln mutations in the Brazilian population.

Sixty-seven lean and 64 obese/severely obese subjects (91 women (32.9 ± 1.2 y) and 40 men (29.2 ± 1.7 y) between 18 and 67 years of age) participated in the study.

BMI, waist circumference, fat mass (electrical bioimpedance), indirect calorimetry, blood pressure, fasting plasma glucose and insulin, serum uric acid, plasma lipids and HOMA-IR were evaluated. Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes and amplified by polymerase chain reaction (PCR) and restriction enzyme digestion.

Men presented larger waist circumference and larger waist-hip ratio than women ($p=0.04$ and $p= 0.0001$, respectively). Women presented larger fat percentage and lesser

lean mass percentage in comparison with men ($p < 0.0001$). In relation to biochemical parameters, the female sex presented larger HDL-cholesterol values ($p = 0.03$) and the male sex, a larger value for uric acid ($p < 0.0001$).

Obese subjects had larger levels of diastolic and systolic arterial pressure ($p < 0.001$), in addition to more elevated cardiac frequency than lean subjects ($p = 0.003$). They also presented more elevated levels of total cholesterol and triglyceride ($p = 0.01$, $p < 0.03$, respectively), as well as uric acid, than thin subjects ($p < 0.0001$).

Genetic analysis showed that only 5 (3.8 %) individuals presented mutation in the *PPAR γ 2* gene, all of them homozygote, whereas polymorphism of the *IRS-1* gene was found in 12 (9.1 %) cases of heterozygosis.

There was no correlation between the genetic profile and any of the anthropometric, hemodynamic and biochemical parameters or measured indicators of insulin resistance.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE,H.;YAMADA,N. et al Hypertension, Hypertriglyceridemia, and Impaired Endothelium-dependent Vascular Relaxation in Mice Lacking Insulin Receptor Substrate-1. **J Clin Invest**; 101(8): 1784-1788,1998.
- ALBAREDA M, RODRIGUEZ-ESPINOZA J, MURUGO M, De LEIVA A, CORCOY R. Assessment of insulin sensitivity and beta-cell function from measurements in the fasting state and during an oral glucose tolerance test. **Diabetologia**; 43:1507-1511, 2000.
- ALMIND, K. et al Aminoacid polymorphisms of insulin receptor substrate-1 in non-insulin-dependent Diabetes Mellitus. **Lancet**; 342(2): 828-832,1993.
- ANDERSON, D.; KOCH, C.A.; GREY, L.; ELLIS, C.; MORAN, M.; PAWSON, T. Binding of the SH₂ domains of phospholipase C α 1, GAP and Src to activated growth factor receptors. **Science**; 250 : 979 – 82, 1990.
- ARAKI, E. et al Impact of Natural IRS-1 Mutations on Insulin Signals – Mutations of IRS-1 in the PTB Domain and Near SH2 Protein Binding Sites Result in Impaired Function at Different Steps of IRS-1 Signaling. **Diabetes**; 46: 929-936, 1997.
- ARNER, P. Obesity: a genetic disease of adipose tissue? **Br J Nutr**; 83 Suppl 1:S9-16, 2000.
- ASHWELL, M.; McCALL, S.A.; COLE, T.J.; & DIXON, A.K. Fat distribution and its metabolic complications : Intertations. In: N.G. Norgan (Ed), Human body composition and fat distribution (pp. 227 – 242) – Wageningen, Netherlands : Euronut., 1985.
- AVIGNON A, BOEGNER C, MARIANO-GOULART D, COLETTE C, MONNIER L. Assessment of insulin sensitivity from plasma insulin and glucose in the fasting or post oral glucose-load state. **International Journal of Obesity**; 23: 512-517, 1999.

BARONI, M.G.; ARCA, M.; SENTINELLI, F.; BUZZETTI, R.; CAPICI, F. LOVARI, S.; VITALE, M.; ROMEO, S.; DI MARIO, U. The G972R variant of the Insulin Receptor Substrate – 1(IRS-1) gene, body fat distribution and insulin – resistance. **Diabetologia**; 44 : 367 – 372, 2001.

BARONI, M.G.; D'ANDREA, M.P.; MONTALLI, A et al A common mutation in the insulin receptor substrate – 1 gene is a genetic marker for the insulin resistance syndrome in patients with coronary artery disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**; 19: 2975- 2980 , 1999.

BARR, D.P.; RUSS, E.M.; EDER, H.A. Protein – lipid relationships in human plasma. **Am J Med**; 11: 480, 1951.

BEAMER, B. A. et al Chromosomal Localization and Partial Genomic Structure of the Human Peroxisome Proliferator Activated Receptor-gamma (hPPAR γ) Gene. **Biochem Biophys Res Commun**; 233(3): 756-59, 1997.

BEAMER, B.A. et al Association of the Pro12Ala Variant in the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor - γ 2 Gene with Obesity in two Caucasian Populations. **Diabetes**; 47(11): 1806-8,1998.

BENGTTSSON, C.; LAPRDUS, L.; STHENDAHL, C. et al Hyperuricemia and risk of cardiovascular disease and overall death: a 12 year follow-up of participants in the population study of women in Gothenbourg, Sweden. **Acta Med Scand**; 224: 549 – 55, 1988.

BLAIR, D.; HABRICHT, J.P.; SIMS, E.A.; SYLWESTER, D. & ABRAHAM S. Evidence for an increased risk for hypertension with centrally located body fat, and the effect of race and sex on this risk. **Am J of Epidemiology**; 119 : 526 – 540, 1984.

BONADONNA, B.C. et al Obesity and insulin resistance in humans: a dose-response study. **Metabolism**; 39(5): 452-59,1990.

BRAY G. A. A new approach to the classification and evaluation of obesity. In: Bjorntorp & Brodoff B. N. Lippincott, Philadelphia, 294 – 308, 1992.

BRAY, G.A. Overweight is risking fate: Definition, classification, prevalence, and risks. **Ann N Y Acad Sci**; 499:14-28, 1987.

CALLE, E.E.; THUN, M.J.; PETRELLI, J.M. et al Body mass index and mortality in a prospective cohort of US adults. **N Engl J Med**; 341: 1097 – 105, 1999.

CHAN, J. M.; RIMM, E.B.; COLDITZ, G. A. et al Obesity, fat distribution and weight gain as risk factors for clinical diabetes in men. **Diabetes Care**; 17:961 – 9, 1994.

CHEATHAM.B. & KAHN, C.R. Insulin action and the insulin signaling network. **Endocrine Reviews**; 16(2) : 117 – 142, 1995.

CLAUSEN, J.O. et al Insulin resistance: interactions between obesity and a common variant of insulin receptor substrate-1. **Lancet**; 346: 397-402,1995.

CLEMENT, K. et al The Pro115Gln and Pro12Ala PPAR γ gene mutations in type 2 diabetes. **Int J Obes Relat Metab Disord**; 24(3): 391-3,2000.

COLBERG, S.R. et al Skeletal Muscle Utilization of Free Fatty Acids in women with Visceral Obesity. **The Journal of Clinical Investigation**; 95(4): 1846-1853,1995.

Consenso Latino-Americano em Obesidade – Brasil – 1998 – outubro.

- COUTINHO, D. C.; LEO, M. M.; RECINE, E.; SICHIERI, R. Condições Nutricionais da população brasileira: adultos e idosos. Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição, Brasília, 1991.
- CUATRECASAS, P. Affinity chromatography and purification of the insulin receptor of liver cell membrane. **Proc Natl Acad Sci USA**; 69 : 1277 – 1281, 1972.
- CULLEN P. Evidence that triglycerides are an independent coronary heart disease risk factor. **The American Journal Cardiology**; 86(1):943-949, 2000.
- CZECH, M.P. The nature and regulation of the insulin receptor: Structure and function. **Annu. Rev. Physiol.**; 47:357 – 381, 1985.
- DE FRONZO R.A.; TOBIN, J. D.; ANDRES, R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. **Am J Physiol**; 237:E214-E233, 1979.
- DEPRES, J.P. Lipoprotein metabolism in visceral obesity. **Intern J of Obesity**; 15 : 45 – 52, 1991.
- EBINA, Y. et al Replacement of lysine residue 1030 in the putative ATP-binding region of the insulin receptor abolishes insulin- and antibody-stimulated glucose uptake and receptor kinase activity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**; 84: 794-808, 1987.
- EK, J.; URHAMMER, S.A.; SORENSEN, T.I.A.; ANDERSEN, T.; AUWERX, J.; PEDERSEN, O. Homozygosity of Pro12Ala variant of the peroxisome proliferation-activated receptor- γ 2 (PPAR γ 2): divergent modulating effects on body mass index in obese and lean Caucasian men. **Diabetologia**; 42: 892 – 895, 1999.
- FERRANNINI E. Insulin resistance and hyperinsulinemia: why are they important? **Current Opinion in Endocrinology and Diabetes**; 6(suppl1): S13-S16, 1999.

- FERRANNINI E. The theoretical bases of indirect calorimetry: a review. **Metabolism**; 37(3): 287-301,1988.
- FERRANNINI, E. et al Effect of free fatty acids on glucose production and utilization in man. **J Clin Invest**; 72:1737-1745,1983.
- FERRANNINI,E. et al (EGIR). Insulin resistance and hipersecretion in obesity. **J Clin Invest**; 100:1166-73,1997.
- FÈVE, B et al La différenciation adipocytaire: tout un programme. Médecine - **Sciences**; 14: 848 - 57, 1998.
- FLEGAL, K.M.; CARROLL, M.D.; KUCZMARSKI, R.J. et al Overweight and obesity in the United States: prevalence and trends, 1960 – 1994. **Int J Obes**; 22: 39 – 47, 1998.
- FREYCHET, P. et al Insulin receptor in the liver: Specific binding of [¹²⁵ I] insulin to the plasma membrane and its relation to insulin bioactivity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**; 68:1833-1837,1971.
- FRITTITA, L. et al A Soluble PC-1 Circulates in Human Plasma: Relationship with Insulin Resistance and Associated Abnormalities. **J Clin Endocrinol Metabolism**; 84(10): 3620-3625, 1999.
- FROGUEL, P. et al Genetics of obesity: towards the understanding of a complex. **Presse Med**; 29(10): 564-71,2000.
- FULCHER, G.R. et al A comparison of measurements of lean body mass derived by bioelectrical impedance, skinfold thickness and total body potassium. A study in obese and non-obese normal subjects. **Scand J Clin Lab Invest**; 51: 245-253, 1991.
- GARROW, J.S.; WEBSTER, J.D. Quetelet's index (W/H^2) as measure of fatness. **Int J Obes Relat Metab Disord**; 9:147-53, 1985.

GIANNINI, S.D. Importância das lipoproteínas de alta densidade (HDL) na aterosclerose. In: Aterosclerose – Dislipidemias – Clínica e Terapêutica: Fundamentos Práticos. São Paulo, BG Cultural, 1998.

GIROLAMI, D; - Definición y medios diagnósticos – **Obesidad** – BRAGUINSKY, J. Buenos Aires, 2ª ed. P. 15-38,1996.

GRANT,P.J.et al Insulin Receptor Substrate-1 Gene and Cardiovascular Risk Factors in NIDDM. **Lancet**; 346(23): 841-842,1995.

HAFFNER SM, GONZALEZ C, MIETTINEN H, KENNEDY E, STERN MP. A prospective analysis of the HOMA model. **Diabetes Care**; 19(10): 1138-1141,1996.

HAGER, J.; ZOUALI, H.; VELHO, G.; FROGUEL P. Insulin receptor substrate (IRS 1) gene polymorphisms in French NIDDM families. **Lancet**; 342: 1430, 1993.

HALPERN, A.; MATOS, A. F. de G.; SUPLICY, H. C. ; MANCINI, M. C.; ZANELLA, M. T. Obesidade. São Paulo: Lemos Editorial, 1998.

HANSON RL, PRATLEY RE, BORGARDUS C et al. Evaluation of simple indices of insulin sensitivity and insulin secretion for use in epidemiologic studies. **American Journal of Epidemiology**; 151(2): 190-198,2000.

HÄRING, H. & STUMVOLL, M. The peroxisome proliferator - activated receptor2 Pro12Ala polymorphism. **Diabetes**; 51 : 2341 – 2347, 2002.

HITMAN, G.; HAWRAMI, K.; MCCARTHY, M. et al Insulin receptor substrate – 1 gene mutations in NIDDM; implications for the study of polygenic disease. **Diabetologia**; 38: 481 – 486,1995.

HOTTA, K. et al Relationships of PPAR γ 2 mRNA levels of obesity, diabetes and hyperinsulinemia in rhesus monkeys. **Int J Obes Relat Metab Disord**; 22(10): 1000-10,1998.

HOUTKOOPER LB, LOHMAN TG, GOING SB, HOWELL WH. Why bioelectrical impedance analysis should be used for estimating adiposity. **Am J Clin Nutr**; 64(3 Suppl):436S-448S, 1996.

HU, E. et al Inhibition of adipogenesis through MAP Kinase – mediated phosphorylation of PPAR γ . **Science**; 274 : 2100 - 2103, 1996.

IMAI,Y.; FUSCO, A .; SUZUKI, Y. et al Variant sequences of insulin receptor substrate 1 in patients with noninsulin dependent Diabetes Mellitus. **J Clin Endocrinol Metab**; 79: 1655 – 1658,1994.

JOSSA, F.; FARINARO, E.; PANICO, S et al Serum uric acid and hypertension: The Olivetti Heart Study. **J Human Hypertension**; 8:677 – 81, 1994.

KAHN, C.R. Current concepts of the molecular mechanism of insulin action. **Annu Ver Med**; 36 : 429 – 451, 1985.

KAHN, H.S.; WILLIANSO, D.F.; Abdominal obesity and mortality risk among men in ninetenth – century North America. **Int J Obesity**; 18: 686 – 91, 1994.

KAPLAN, N. M. The deadly quartet. Upper body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. **Arch Intern Med**; 149: 1514, 1989.

KASUGA, M. et al Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor. **Science**; 215:185:187,1982.

- KATZ A, NAMBI SS, MATHER K, BARON AD, FOLLMANN DA, SULLIVAN G, QUON MJ. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**; 85(7):2402-2410, 2000.
- KISSEBACH, A. H.; FREEDMAN, D. S.; PEIRIS, A. N. Health risks of obesity. **Med Clin North Am**; 73: 111, 1989.
- KISSEBACH, A. H.; KRABOWER, G. Regional adiposity and morbidity. **Phys Reviews**; 74(4): 761-811, 1994.
- KISSEBACH, A. H.; VYDELINGUM, N.; MURRAY, R.; EVANS, D. J.; HARTZ, A. J.; KALKHOFF, R. K. et al Relation of body fat distribution to metabolic complications of obesity. **J Clin Endocrinol Metab**; 54:254 – 60, 1982.
- KOCH, C.A.; ANDERSON, D.; MORAN, M.F.; ELLIS, C.; PAWSON, T. SH₂ and SH₃ domains: elements that control interactions of cytoplasmic signalling proteins. **Science**; 252 : 668 – 74, 1991.
- KREMPLER, F. et al Plasma Leptin Levels Interaction of Obesity with a Common Variant of Insulin Receptor Substrate-1. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**; 18:1686-1690, 1998.
- LAAKSO, M.; MALKKI, M. KEKÄLÄINEN, P.; KUUSISTO, J.; DEEB, S. Insulin receptor substrate-1 variants non insulin dependent diabetes. **J Clin Invest**; 94: 1141 – 1146, 1994.
- LANCHA JÚNIOR, A.H. et al Obesidade: Atualização sobre sua etiologia, morbidade e tratamento. **Rev. Nutr. Campinas**; 13 (1): 17-28, 2000.
- LANDIN, K. et al Importance of obesity for the metabolic abnormalities associated with na abdominal fat distribution. **Metab Clin Exper**; 38: 572, 1989.

LAPIDUS, L., BENGSTSSON, C., LARSSON, B., PENNERT, K., RYBO, E., SJOSTROM, L. A 12 year follow up of participants in the population study of women in Gottenburg, Sweden. **British. Medical Journal**, **289**: 1257-61, 1984.

LARSSON, B.; SVARDSUDD, K.; WELLIN, L. et al Abdominal adipose tissue distribution, obesity and risk of cardiovascular disease and death: 13 year follow up of participants in the study of men born in 1913. **B M J**; **288**:1401 – 7, 1984.

LAUER, M. S.; ANDERSON, K. M.; KANNEL, W. B.; LEVY, D. The impact of obesity on left ventricular mass and geometry: The Framingham Heart Study. **JAMA**; **2(6)**; 231-236,1991.

LEAR, S.A.; CHEN, M.M.; FROHLICH, J.J.; BIRMINGHAM, C.L. The relationship between waist circumference and metabolic risk factors: cohorts of European and Chinese Descent. **Metabolism**; **51 (11)**, 1427 – 1432, 2002.

LEE,I.M. MANSON, J. E.; HENNEKENS, C. H. ; PAFFENBARGER, Jr R. S. Body weight and mortality. **JAMA**; **270 (23)**: 2823-28,1993.

LISSNER, L.; ODELL, P. M.; D'AGOSTINO, R. B.; STOKES, J.; KREGER, B. E.; BELANGER, A .J. et al Variability of body weight and health outcomes in the Framingham population. **New Engl J Med**; **315**:1839-44,1991.

MANSON, J.E.; WILLET, W.C.; STAMPFER, M.J. et al Bodyweight and mortality among women. **N Engl J Med**; **333**: 677 – 85, 1995.

MATHEUS, D. R. et al – HOMA- Insulin Resistance and beta cell function from plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**; **28**:412-19,1985.

McGLADE, J.A.; CHENG, G.; PELICCI, P.; PELICCI, G.; PAWSON, T. Shc proteins are phosphorylated and regulated by the v-Src and v-Fps protein-tyrosine Kinases. **Proc Natl Acad Sci USA**; 89 : 8869 – 73, 1992.

MEIRHAEGHE, A. et al A genetic polymorphism of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ gene influences plasma leptin levels in obese humans. **Human Molecular Genetics**; 7(3): 435-40,1998.

MESSERLI, F.H. VENTURA, H. O.; REISIN, E.; DRESLINSKI, G. R.; DUNN, F. G.; PACPHEE, A. et al Boderline hypertension and obesity: Two prehypertensive states with elevated cardiac output. **Circulation**; 66:55-60,1982.

MILLER, G.K.; MILLER, N. E. Plasma high density lipoprotein concentration and development of ischaemic heart disease. **Lancet**; 1: 16, 1975.

MODAN, M.; HALKIN, H.; ALMONG, S.; LUSKY, A.; ESHOLKOL, A.; SHEFI, M. et al Hyperinsulinemia. A link between hypertension obesity and glucose intolerance. **J Clin Invest**; 75:809-17,1985.

MONTEIRO, C.A. Velhos e novos males da saúde no Brasil - A evolução do país e suas doenças. 1ª ed. HUCITEC - NUPENS/USP, São Paulo, 1995.

MÜNZBERG, H. TAFEL, J.; BÜSING, B. Screening for variability in the ciliary neurotrophic factor (CNTF) gene: No evidence for association with human obesity. **Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes**; 106(2): 108-112,1998.

MUSCELLI, E. et al Metabolic and cardiovascular assesment in moderate obesity: Effect of weight loss. **J Clin Endocrinol Metab**; 82 (9): 2937-2943,1997.

- MUSCELLI, E.; PRATALI, L.; CATALANO, C.; QUINONES, G. A.; CAMASTRA, S.; FERRANNINI, E. Hipertrofia cardíaca em pacientes obesos normotensos resistentes a insulina. **Rev. Soc. Card. Estado de S. Paulo**; 6(3): 39,1996.
- OKADA, T. et al Essential role of phosphatidylinositol 3'-Kinase in insulin-induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes. **J. Biol. Chem.**, 5: 3568-73, 1994.
- PEDERSEN, O. Genetics of insulin resistance. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**; 107(2): 113-8, 1999.
- PEIRES, A. N. et al Glucose metabolism in obesity: influence of body fat distribution. **J Clin Endocr Metabol**; 67: 760, 1988.
- PEREIRA, L.O.; FRANCISCHI, R.P.; KLOPPER, M.; SAWADA, L.A.; SANTOS, R.; VIEIRA, P.; CAMPOS, P.L.; LANCHI, A. H. Obesidade e suas implicações – ação da atividade física e controle nutricional. **Rer Bras Nutr Clin**, 14:9 – 17, 1999.
- PI-SUNYER, X.F. (ed) Clinical guidelines on the identification, evaluation and treatment of overweight and obesity in adults – the evidence report. **Obes Res**, 6:51S-210S, 1998.
- POLONSKY, K.S. et al Twenty-four-hour profiles and pulsatile pattern of insulin secretion in normal and obese subjects. **J Clin Invest**; 81: 442-48, 1998.
- POPKIN, B. M. & DOAK, C. M. The obesity epidemic is a worldwide phenomenon. **Nutrition Reviews**, Washington DC, v 56, n 4 (Pt 1), p 106-114, 1998.
- POUNDER, D.; CARSON, D.; DAVISON, M.; ORIHARA, Y. Evaluation of obesity indices in men descriptive study. **Br Med J**; 316: 1428-1429, 1998.
- REAVEN, G. M. Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes**; 37: 1595, 1988.

REXRODE, K.M.; CAREY, V.J.; HENNEKENS, C.H.; WALTERS, E.E.; COLDITZ, G.A.; STAMPFER, M.J.; WILLETT, W.C.; MANSON, J.E. . Abdominal adiposity and coronary heart disease in women. **JAMA**, **280**(21): 1843-1848, 1998.

RIEUSSET, J. et al Insulin Acutely Regulates the Expression of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ in Human Adipocytes. **Diabetes**; 48(4): 699-705, 1999.

RISTOW, M.; MÜLLER-WIELAND, D.; PFEIFFER, A.; KRONE, W.; KAHN, R. Obesity associated with a mutation in a genetic regulator of adipocyte differentiation. **New Engl Med**; 339(14): 953-959, 1998.

SCHMIDT, M. I.; WATSON, R. L.; DUNCAN, B.B.; METCALF, P.; BRANCATI, F. L.; SHARRET, A. R. et al. Clustering of dyslipidemia, hyperuricemia, diabetes, and hypertension and it's association with fasting insulin and central and overall obesity in general population. Atherosclerosis Risk in Communities. Study Investigators. **Metabolism**; 45 (6): 699 —706, 1996.

SENTI, M.; BOSCH, M.; AUBÓ, C.; ELOUSA, R.; MAISÁ, R.; MARRUGAT, J. Relationship of abdominal adiposity and dyslipidemic status in women with a common mutation in the lipoprotein lipase gene. **Atherosclerosis**; 150 (1): 135-41, 2000.

SHEPS, S.G.; DART, R.A.; New guidelines for prevention, detection, evaluation, and treatment of hypertension: Joint National Committee VI. **Chest**; 113 : 263 – 265, 1998.

SIGAL, R.J. et al Codon 972 Polymorphism in the Insulin Receptor Substrate-1 Gene, Obesity, and Risk of Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**; 81(4): 1657-1659, 1996.

STAMLER, R.; STAMLER, J.; REIDLINGER, W. F.; ALGERA, G.; ROBERT, R. H. Weight and blood pressure: Findings in hypertension screening of 1 million americans. **JAMA**; 240:1607-1610,1978.

TERRET, J.; CHAMBERLAIN, J.; RASTAN, S.; MARSHALL, R.; MCGINNIS, R.; SPURR, N. et al The Pro115Gln in peroxisome – proliferator – activated receptor (PPAR) γ 2 is extremely rare in a large cohort of U.S. Caucasians. **Clinical Science**; 99: 89-90, 2000.

VAGUE, J. La differenciation sexuelle facteur determinant des formes de l'obesite. **La Presse Medicale**; 30 : 339 – 340, 1947.

VAGUE, J. The degree of masculine differentiation of obesities: a factor for determining predisposition to diabetes, atheroscleroses, gout and uric calculous. **Am J Clin Nutr**; 4:20, 1956.

VALVE, R. et al Two Polymorphisms in the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Gene are associated with severe overweight among obese women. **J Clin Endocrinol Metabolism**; 84(10): 3708-12,1999.

VIDAL-PUIG, A. et al Regulation of PPAR γ Gene Expression by Nutrition and Obesity in Rodents. **J Clin Invest**; 97(11): 2553-2561,1997.

VIRKAMÄKI, A.; UEKI, K.; KAHN, C.R. Protein – protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. **J Clin Invest**; 103 : 931 – 43, 1999.

WAHLI, W. et al Superfamily of steroid nuclear receptors: positive and negative regulators of gene expression. **FASEB J** : 5: 2243 - 49, 1991.

- WHITE, F.; PERIERA, L. & GARNER, J.B. Associations of body mass index and waist – hip – ratio with hypertension. **Canadian Medical Association Journal**; 135 : 313 : 320, 1986.
- WHITE, M.F. & KHAN, C.R.- The insulin signaling system. **J Biol. Chem.**; 269(1): 1-4,1994.
- WHO Diet, nutrition and the prevention of chronic disease. (WHO Technical Report, Series, 797) Geneva, 1990.
- WHO *Measuring obesity: classification and distribution of anthropometric data*. Copenhagen: WHO, 1989. (Nutr UD, EUR/ICP/NUT 125)
- WHO *Obesity - Preventing and managing the global epidemic Report of a WHO Consultation on Obesity*. Geneva, 3-5 June 1997. Geneva: WHO, 1998.
- WITCHEL, S.F.; WHITE, C.; SIEGEL, M.E.; ASTON, C.E. Inconsistent effects of the proline12alanine variant of the peroxisome proliferator-activated receptor γ 2 gene on body mass index in children and adolescents girls. **Fertility and Sterility**; 76 (4): 741 – 747, 2001.
- WOLF, A .M.; COLDITZ, G. A. Current estimates of the economic cost of obesity in the United States. **Obes Res**; 6: 97 – 106, 1998.
- YANASHITA, S.; NAKAMURA, T.; SHIMOMURA, I.; NISHIDA, M.; UOSHIDA, S.; KOTANI, K.; KAMEDA, K.; TOKUNAGA, K.; MATSUZAWA, Y. Contribution of visceral fat accumulation to the development of insulin resistance and atherosclerosis. **Diabetes Care**; 19: 287-291, 1996.

YEN, C-J.;BEAMER,B.A.;NEGRI,C.;SILVER,K. Molecular Scanning of the Human Peroxisome Proliferator Activated Receptor- γ (hPPAR γ) Gene in Diabetic Caucasians: Identification of a Pro12Ala PPAR γ 2 Missense Mutation. **Biochem Biophys Res Commun**; 241(2): 270-4,1997.

ZHANG, B. et al Negative regulation of peroxisome proliferator – activated receptor - γ gene expression contributes to the antiadipogenic effects of tumor necrosis factor – alfa. **Molecular Endocrinology**; 10 : 1457 – 66, 1996.