

MARIANE MADALAZZO

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE VARIANTES DO GENE  
*GHRL* (GRELINA) COM OBESIDADE NA ADOLESCÊNCIA**

CURITIBA

2010

MARIANE MADALOZZO

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE VARIANTES DO GENE  
*GHRL* (GRELINA) COM OBESIDADE NA ADOLESCÊNCIA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Genética.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lupe Furtado Alle

**Co- orientador:** Prof<sup>o</sup>. Dr. Ricardo L. R. de Souza

CURITIBA

2010

## AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente à minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Lupe Furtado Alle, pelo carinho, pela paciência e apoio, sempre com uma palavra de incentivo, nos deixando mais calmas e confiantes.

Ao Prof. Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza, meu co-orientador, pelas dicas técnicas e de informática e por se mostrar sempre disposto a ajudar.

À minha família, minha mãe, meu pai, meus irmãos. Vocês me motivam a sempre continuar, e são a razão de tudo que faço na minha vida. Sem o apoio e carinho de vocês nada disso estaria acontecendo. Agradeço por tornarem mais esse sonho possível. Meu amor por vocês é o maior do mundo.

Ao meu amor, Thiago, meu maior incentivador, pelo amor, amizade, companheirismo, pelas palavras de apoio quando mais precisei, pela paciência quando essa me faltou e acima de tudo por ser parte da minha vida, agora e mais do que nunca, para sempre. Amo tu.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

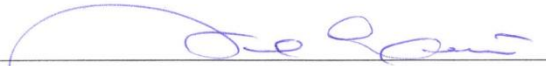



## PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **MARIANE MADALOZZO** para fins de obter o título de Mestre em Ciências Biológicas na Área de Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira à candidata o conceito "B".


Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 22 de março de 2011

  
**Professora Doutora Neiva Leite**  
Depto. de Educação Física/UFPR – Membro Titular


  
**Professora Doutora Maria da Graça Bicalho**  
Depto. de Genética/UFPR – Membro Titular

  
**Professora Doutora Valéria Maria Munhos Sperandio Roxo**  
Depto. de Genética/UFPR – Membro Titular

  
**Professora Doutora Lupe Furtado Alle**  
Orientadora e Presidente da Banca Examinadora



Visto

  
**Professora Doutora Maria Luiza Petzl-Erler**  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Genética

## RESUMO

A obesidade é uma doença complexa, suas formas comuns são poligênicas e multifatoriais, sendo fator de risco para várias doenças graves, como cardiovasculares, diabetes. A grelina é um peptídeo estimulador de apetite e que atua na liberação do GH. Estudos em modelos animais indicam que a grelina desempenha importante papel na sinalização dos centros hipotalâmicos que regulam a ingestão alimentar e o balanço energético. O gene da grelina humana (*GHRL*) está localizado no cromossomo 3 (3p25-p26) e contém cinco exons. Nesse estudo foram analisadas duas variantes do gene da grelina localizadas no exon 2 (R51Q - *rs34911341* e L72M - *rs696217*). Com o objetivo de verificar a associação entre os polimorfismos L72M e R51Q do gene *GHRL* e a obesidade em adolescentes, o presente estudo analisou as variantes L72M e R51Q do gene *GHRL* em adolescentes obesos submetidos a programa de 12 semanas de exercícios físicos e em adolescentes controles não obesos. Os adolescentes obesos foram submetidos a programa multidisciplinar de atividade física e orientação nutricional. Variáveis antropométricas e bioquímicas também foram avaliadas. Os dois *SNPs* estudados estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (*SNP* L72M/controles:  $\chi^2 = 1,52$ ;  $p = 0,45$ . Obesos:  $\chi^2 = 0,09$ ;  $p = 0,95$ . *SNP* R51Q/controles:  $\chi^2 = 0,97$ ;  $p = 0,04$ . Obesos:  $\chi^2 = 0,99$ ;  $p = 0,07$ ). Nos 178 indivíduos estudados no presente estudo para o *SNP* L72M foram encontradas diferenças significativas entre as frequências genotípicas, quando se compararam obesos e controles utilizando o (Teste Exato de Fisher,  $p = 0,0127$ ). Nos 132 doadores de sangue analisados no presente estudo para o *SNP* R51Q não houve diferenças significativas entre as frequências genotípicas e alélicas, quando se compararam obesos e controles (Teste Exato de Fisher,  $p = 1,0$ ). Conclui-se que pode existir uma relação entre o *SNP* L72M e a obesidade em adolescentes, além de efeito protetor do alelo 72M contra a obesidade.

**Palavras - Chave:** Obesidade, Grelina, Adolescentes

## ABSTRACT

Obesity is a complex disease, its forms are common polygenic and multifactorial, with a risk factor for several serious diseases such as cardiovascular, diabetes. Ghrelin is an appetite-stimulating peptide, with acts on GH release. Studies in animal models suggest that ghrelin plays an important role in the signaling of the hypothalamic centers that regulate food intake and energy balance. The human ghrelin gene (GHRL) is located on chromosome 3 (3p25-p26) and contains five exons. In this study we analyzed two variants of the ghrelin gene located in exon 2 (R51Q - *rs34911341* and L72M - *rs696217*). In order to verify the association between R51Q and L72M polymorphisms of the gene and obesity in adolescents GHRL, this study analyzed the variants R51Q and L72M GHRL gene in obese adolescents undergoing 12 weeks program of physical exercise and non-obese controls. The obese adolescents underwent a multidisciplinary program of physical activity and nutritional counseling. Anthropometric and biochemical variables were also evaluated. The SNPs studied were in Hardy-Weinberg (SNP L72M/controls:  $\chi^2 = 1,52$  ;  $p=0,45$ . Obese:  $\chi^2 = 0,09$  ;  $p= 0,95$ . SNP R51Q/controls:  $\chi^2 = 0,97$  ;  $p= 0,04$ . Obese:  $\chi^2 = 0,99$  ;  $p= 0,07$ ). At the 178 individuals analyzed in this study for the Leu72Met ghrelin variant were found significant differences between obese and controls (Fisher Test,  $p= 0,0127$ ). In 132 individuals analyzed in this study for the Arg51Gln ghrelin gene variant no significant differences were found (Fisher Test,  $p=1,0$ ). These results suggest that only the Leu72Met polymorphisms of the human ghrelin gene contribute to the genetic susceptibility to obesity, and may suggest a protective effect of 72M allele against obesity.

**Key-words:** Obesity, Ghrelin, Adolescents

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>2</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>4</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>5</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	5
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	5
<b>4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>6</b>
4.1 OBESIDADE .....	6
4.1.1 OBESIDADE E IMC.....	10
4.2 HORMÔNIO DO CRESCIMENTO .....	13
4.2.1 ATIVIDADE DE LIBERAÇÃO DO GH.....	14
4.3 GRELINA .....	14
4.3.1 GENE DA GRELINA .....	15
4.3.2 DERIVADOS DA GRELINA .....	17
4.3.3 REGULAÇÃO DA SECREÇÃO E CONCENTRAÇÃO DA GRELINA .....	18
4.3.4 DESACILAÇÃO DA GRELINA PELA BUTIRILCOLINESTERASE.....	20
4.3.5 DISTRIBUIÇÃO DA GRELINA NO ORGANISMO .....	21
4.4 GRELINA E OBESIDADE .....	22
4.4.1 REGULAÇÃO DO APETITE.....	23
<b>5 RESULTADOS - ARTIGO .....</b>	<b>25</b>
5.1 RESUMO .....	25
5.2 ABSTRACT .....	26
5.3 INTRODUÇÃO .....	27
5.4 OBJETIVOS .....	29
5.5 MATERIAL E MÉTODOS .....	29
5.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	31
5.7 CONCLUSÕES.....	44
5.8 REFERÊNCIAS .....	45
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>48</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>49</b>
<b>8 APÊNDICE .....</b>	<b>58</b>
<b>9 ANEXOS.....</b>	<b>70</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença complexa, suas formas comuns são poligênicas e multifatoriais. Os genes de predisposição a esta doença interagem entre si e com o ambiente de diferentes formas, com isso, a pressão ambiental pode exceder a capacidade de adaptação homeostática em pessoas geneticamente predispostas, levando a desequilíbrio energético e favorecendo a estocagem de gordura (FROGUEL *et al.*, 2000).

A grelina é um peptídeo estimulador de apetite e que atua na liberação do GH (KORBONITS *et al.*, 2004).

A grelina foi identificada em 1999 (KOJIMA *et al.*, 1999) e foi o primeiro exemplo de peptídeo modificado por ácido graxo, modificação essencial para sua atividade. O gene da grelina humana (*GHRL*) está localizado no cromossomo 3 (3p25-p26).

Foram relatadas evidências de que o controle para a liberação do GH não é só exercido pelo GHRH (*Growth Hormone Release Hormone*; hormônio de liberação do hormônio do crescimento), mas também pela grelina, e, além disso, a grelina também funciona como sinal para a necessidade da ingestão, agindo de forma antagonista à leptina, peptídeo com funções determinantes de saciedade.

Estudos em modelos animais indicam que a grelina desempenha importante papel na sinalização dos centros hipotalâmicos que regulam a ingestão alimentar e o balanço energético. Recentes estudos com roedores sugerem que a grelina, administrada periféricamente ou centralmente, independentemente do GH, diminui a oxidação das gorduras e aumenta a ingestão alimentar e a adiposidade.

Assim, esse hormônio parece estar envolvido no estímulo para iniciar refeição. Sabe-se ainda que os níveis de grelina são influenciados por mudanças agudas e crônicas no estado nutricional, encontrando-se elevados em estado de anorexia nervosa e reduzidos na obesidade (ROMERO e ZANESCO, 2006). A grelina provavelmente é hormônio essencial para a manutenção do GH e para a homeostase energética.



UKKOLA *et al.* (2001) encontraram associação entre o alelo 72M do gene da grelina e obesidade precoce. HINNEY *et al.* (2002) analisaram a região codificadora do gene da grelina em crianças e adolescentes e encontraram os alelos R51Q e L72M, anteriormente analisados por UKKOLA *et al.* (2001) e KORBONITS *et al.* (2002), com frequências semelhantes em obesos e controles de peso normal. Identificaram ainda outras duas variantes do gene da grelina que também não apresentaram associação com a obesidade. O estudo de DANTAS (2008) não corroborou a hipótese inicial de que as variações R51Q e L72M pudessem estar associadas com o IMC, entretanto encontrou associação positiva entre o alelo 72M e atividade da BChE.

Como os resultados anteriores são inconclusivos, o presente estudo buscou investigar a associação entre as variantes L72M e R51Q do gene *GHRL* e obesidade precoce, além de comparar grupos com diferentes respostas ao programa de exercícios, especialmente a taxa metabólica basal.

## 2 JUSTIFICATIVA

A etiologia da obesidade não é de fácil identificação, uma vez que ela é caracterizada como doença multifatorial, incluindo fatores genéticos, psicológicos, metabólicos e ambientais. Um novo hormônio, a grelina, relacionado ao metabolismo foi descoberto recentemente. A grelina, peptídeo produzido nas células do estômago, está diretamente envolvida na regulação do balanço energético a curto prazo.

O projeto ocorre em conjunto com o Programa de Pós-Graduação em Educação Física, no Núcleo de Pesquisa em Qualidade de Vida da Universidade Federal do Paraná em parceria com a professora Neiva Leite. Esta relação permite troca eficaz de informações e acompanhamento direto das coletas, análises e avaliações físicas multidisciplinares dos indivíduos.

O grupo amostral do presente estudo permitiu verificar associação entre as variantes genéticas analisadas e obesidade precoce, além de comparar grupos com diferentes respostas ao programa de exercícios, especialmente a taxa metabólica basal.

Os recentes achados, envolvendo a descoberta da grelina abrem novos campos de estudo para o controle da obesidade, principalmente nas áreas de nutrição e metabolismo.

Portanto, o aprofundamento dos conhecimentos sobre esse peptídeo torna-se de grande relevância na manutenção e preservação da qualidade de vida da população, e poderá proporcionar novas abordagens terapêuticas no tratamento da obesidade.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente trabalho foi verificar a associação entre os polimorfismos L72M e R51Q do gene *GHRL* e a obesidade em adolescentes.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analisar as variantes L72M e R51Q do gene *GHRL* em adolescentes obesos submetidos a programa de 12 semanas de exercícios físicos e em adolescentes não obesos controle.
2. Comparar os dados obtidos com dados de adultos obesos e da população em geral.
3. Verificar associação genética com a perda de peso e a taxa metabólica basal nos adolescentes submetidos a programa de 12 semanas de exercícios físicos.

## 4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1 OBESIDADE

A obesidade é caracterizada por um depósito excessivo de gordura no organismo. Esse depósito funciona como um estoque para o organismo, de modo que, os nutrientes não utilizados para produção imediata de energia passam a ser armazenados em forma de gordura para disponibilização posterior. Como o comprometimento ao nível metabólico é bastante abrangente, obesidade e sobrepeso representam uma fonte crônica e debilitante de doença, com graves dimensões sociais e psicológicas, podendo afetar qualquer faixa etária e classe social.

A obesidade leva à predisposição e à exacerbação de doenças como câncer de mama, de cólon, de rim e de vesícula, hipertensão, doença arterial coronariana e diabetes mellitus do tipo II. É uma doença que atinge proporções globais, com mais de um bilhão de adultos com sobrepeso, sendo pelo menos 300 milhões clinicamente obesos. As proporções de obesos variam de abaixo de 5% na China, Japão e algumas nações Africanas, até acima de 75% em Samoa. Até mesmo em países de baixa prevalência como a China, em algumas cidades a proporção de obesos é quase 20% (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

A epidemiologia genética da obesidade avalia a contribuição relativa dos fatores genéticos e ambientais e suas interações, na variabilidade interindividual do peso corporal. Avalia também a influência da variação dos fatores genéticos e ambientais com a idade, gênero e outros fatores. Até hoje não existe consenso a respeito do grau de herdabilidade da obesidade, provavelmente em decorrência da natureza complexa dessa doença.

A estimativa do seu componente genético só pode ser realizada dentro de cada população em um ambiente específico, pois os genes de predisposição para obesidade e os alelos de cada indivíduo interagem de vários modos e com diferentes ambientes, de modo que o fenótipo final pode surgir a partir de diferentes componentes. A maioria dos estudos, entretanto, concorda que os fatores genéticos

desempenham um papel significativo nas diferenças individuais no peso corporal e na adiposidade (MAES *et al.*, 1997; WADE *et al.*, 2001).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) projetou que em 2005 o mundo teria 1,6 bilhões de pessoas acima de 15 anos de idade com excesso de peso (IMCI  $\geq$  25 kg/m<sup>2</sup>) e 400 milhões de obesos (IMC  $\geq$  30 kg/m<sup>2</sup>).

A projeção para 2015 é ainda mais pessimista: 2,3 bilhões de pessoas com excesso de peso e 700 milhões de obesos, o que indica um aumento de 75% nos casos de obesidade em 10 anos (disponível em <https://apps.who.int/infobase/>). No ranking da OMS a Argentina é o país mais obeso na América do Sul, ficando em oitavo lugar (disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>). Os Estados Unidos ocupam a quinta posição e o Brasil a 77ª posição.

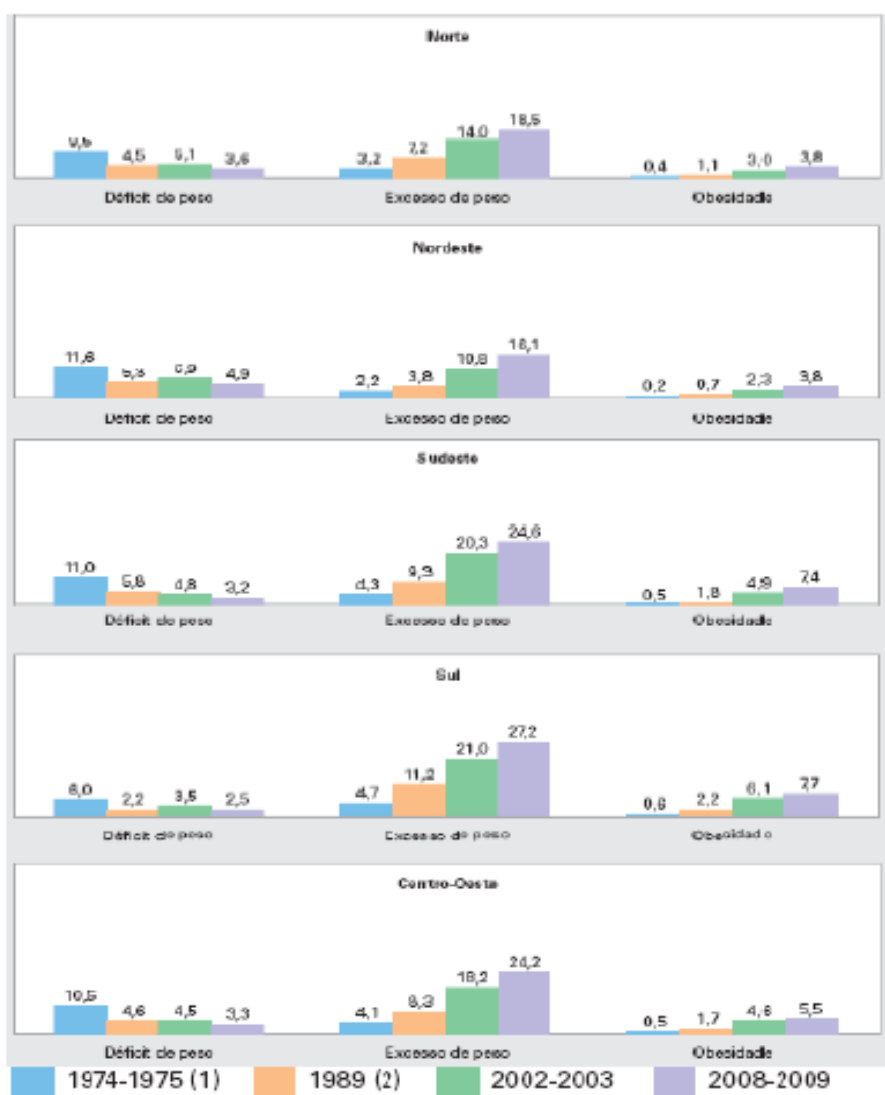
Em 2010 o Ministério da Saúde e o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) divulgaram dois grandes levantamentos dos números do excesso de peso e obesidade no Brasil: o VIGITEL Brasil 2009: Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (disponível em [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/vigitel\\_2009\\_preliminar\\_web\\_20\\_8\\_10.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/vigitel_2009_preliminar_web_20_8_10.pdf)) e a Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009 (POF) (disponível em [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008\\_2009\\_encaa/pof\\_20082009\\_encaa.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_encaa/pof_20082009_encaa.pdf))

Uma pesquisa realizada pelo Ministério da Saúde (VIGITEL, 2008) a respeito da Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas, revela um aumento da obesidade no Brasil nos últimos anos.

Na primeira versão da pesquisa (VITIGEL, 2006), 11,4% dos brasileiros adultos eram obesos, aumentando para 12,9% em 2007 e para 13% em 2009. Curitiba (PR) está no 6º lugar da prevalência da obesidade em adultos no ranking das 27 capitais brasileiras.

Segundo dados da última Pesquisa do POF, realizada em 2008/09 pelo Ministério da Saúde, o excesso de peso atinge 21,5% dos adolescentes, oscilando entre 16% e 18% no Norte e no Nordeste e entre 20% e 27% no Sudeste, Sul e Centro-Oeste.

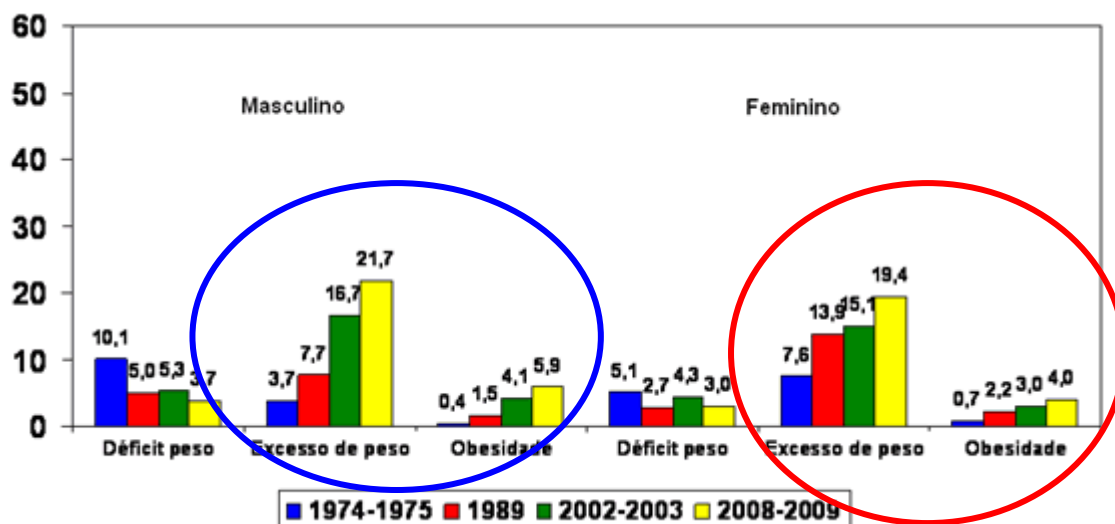
Em ambos os sexos, o excesso de peso se mostrou mais freqüente em áreas urbanas, em particular no Norte e Nordeste (Gráfico 1).



**Gráfico 1** - Evolução Temporal para adolescentes de 10 a 19 anos de idade Sexo Masculino por Grandes Regiões

O aumento de peso em adolescentes de 10 a 19 anos foi contínuo nos últimos 34 anos. No sexo masculino, o índice passou de 3,7% para 21,7%. No sexo feminino, o índice triplicou de 7,6% para 19,% entre 1974-75 e 2008-09.

A obesidade mostra-se menos intensa, mas ascendente, indo de 0,4% para 5,9% no sexo masculino e de 0,7% para 4,0% no sexo feminino (Gráfico 2).



**Gráfico 2** – Evolução de indicadores antropométricos na população de 10 a 19 anos de idade, por sexo – Brasil – períodos 1974-75, 1989 e 2008-2009

Apesar de ocorrer em todas as regiões brasileiras, a Região Sul tem o maior crescimento na freqüência de excesso de peso, tendo sido encontradas variações de 4,7% para 27,2% nos adolescentes e 9,7% para 22,0% nas adolescentes. O maior rendimento familiar foi diretamente relacionado ao excesso de peso: ocorrendo três vezes mais entre os rapazes de maior renda do que nos de menor renda (34,5% contra 11,5%); no sexo feminino, a diferença foi de 24% para 14,2%.

Uma avaliação antropométrica e do estado nutricional da população brasileira é realizada como um dos itens das POFs que são realizadas pelo IBGE em parceria com o Ministério da Saúde. A obtenção dos dados é feita por amostragem a partir de visitas domiciliares e são incluídos indivíduos de todas as idades em todos os estados brasileiros, moradores das zonas rural e urbana.

Na POF 2008-2009 foram analisados os dados de mais de 188 mil pessoas em 55.970 domicílios. As medidas antropométricas foram tomadas de cada um dos moradores encontrados durante o período da entrevista, perfazendo cerca de 337.000 medições em 188.461 pessoas.

Os resultados obtidos na POF 2008-2009 foram comparados com as pesquisas de 1974-75 (Estudo Nacional da Despesa Familiar – ENDEF), 1989 (Pesquisa Nacional sobre Saúde e Nutrição – PNSN) e a POF 2002-2003.

O excesso de peso foi maior na área urbana do que na rural: 37,5% e 23,9% para meninos e 33,9% e 24,6% para meninas, respectivamente. A região brasileira com maior frequência de excesso de peso foi a Sudeste, com 40,3% dos meninos e 38% das meninas com peso acima do normal.

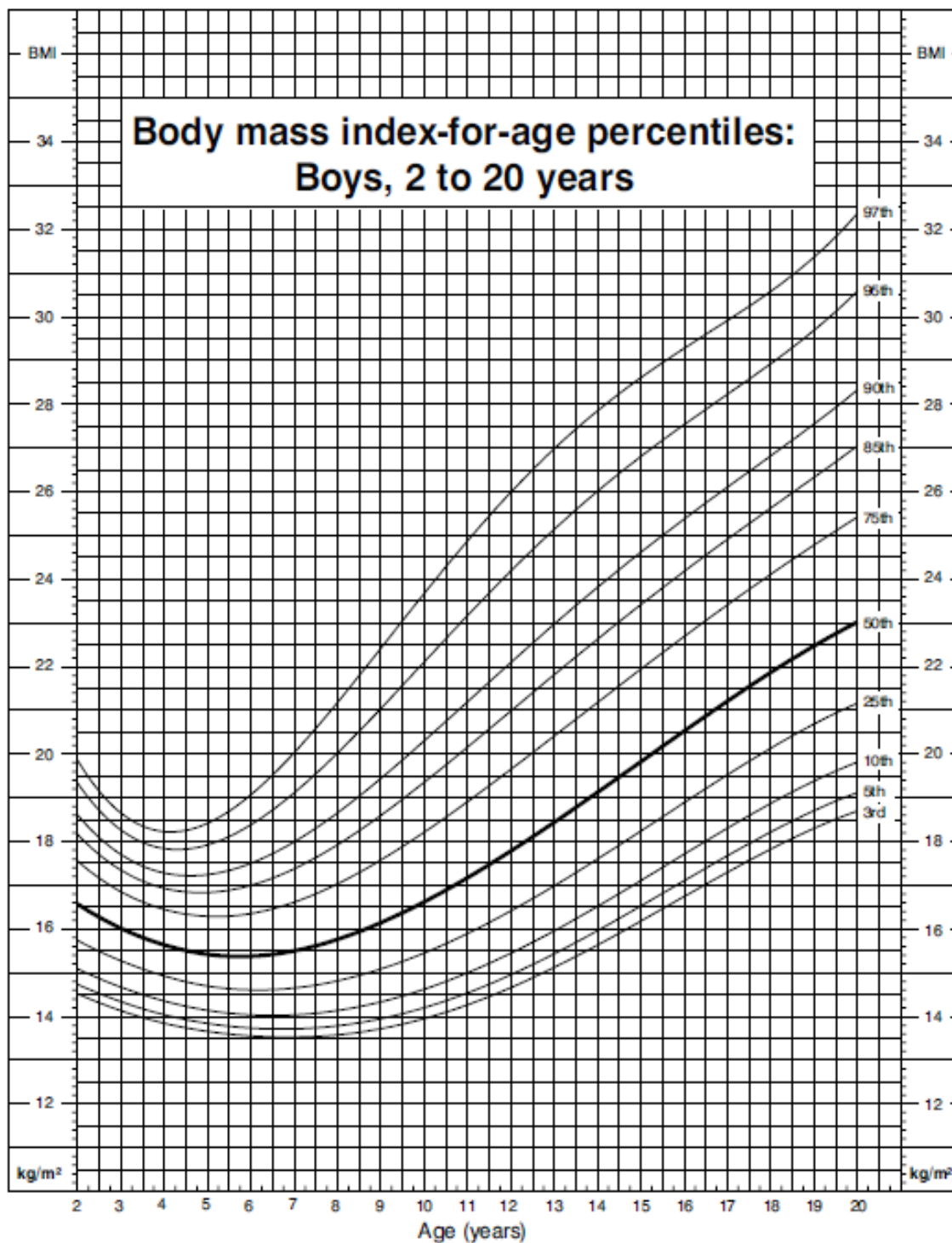
#### 4.1.1 OBESIDADE E IMC

A análise de sobrepeso e obesidade pode ser definida a partir do índice de massa corporal (IMC), que é calculado a partir do peso (Kg) e altura (m) do indivíduo ( $IMC = \text{peso} / (\text{altura})^2$ ) sendo um indicador confiável de gordura corporal.

O IMC é um método fácil e de baixo custo que permite o enquadramento nas categorias de peso, sendo que nas crianças e adolescentes este valor sofre ajustes relativos à idade e sexo. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO - WORD HEALTH ORGANIZATION), a partir do valor de IMC encontrado, haverá uma classificação percentil, indicando a posição relativa da classificação da criança ou adolescente em relação a outras crianças e adolescentes de mesmo sexo e idade.

O Centro de Controle de Doenças e Prevenção (CDC, CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION) propõe gráficos atualizados de crescimento para crianças e adolescentes em duas faixas etárias: do nascimento aos 36 meses e dos 2 anos aos 20 anos. Estes gráficos indicam o percentil do índice de massa corporal de meninos e meninas nestas faixas etárias (KUCZMARSKI *et al.*, 2000). Os gráficos 3 e 4 apresentam respectivamente os percentis de IMC para meninos e meninas de 2 a 20 anos de idade.

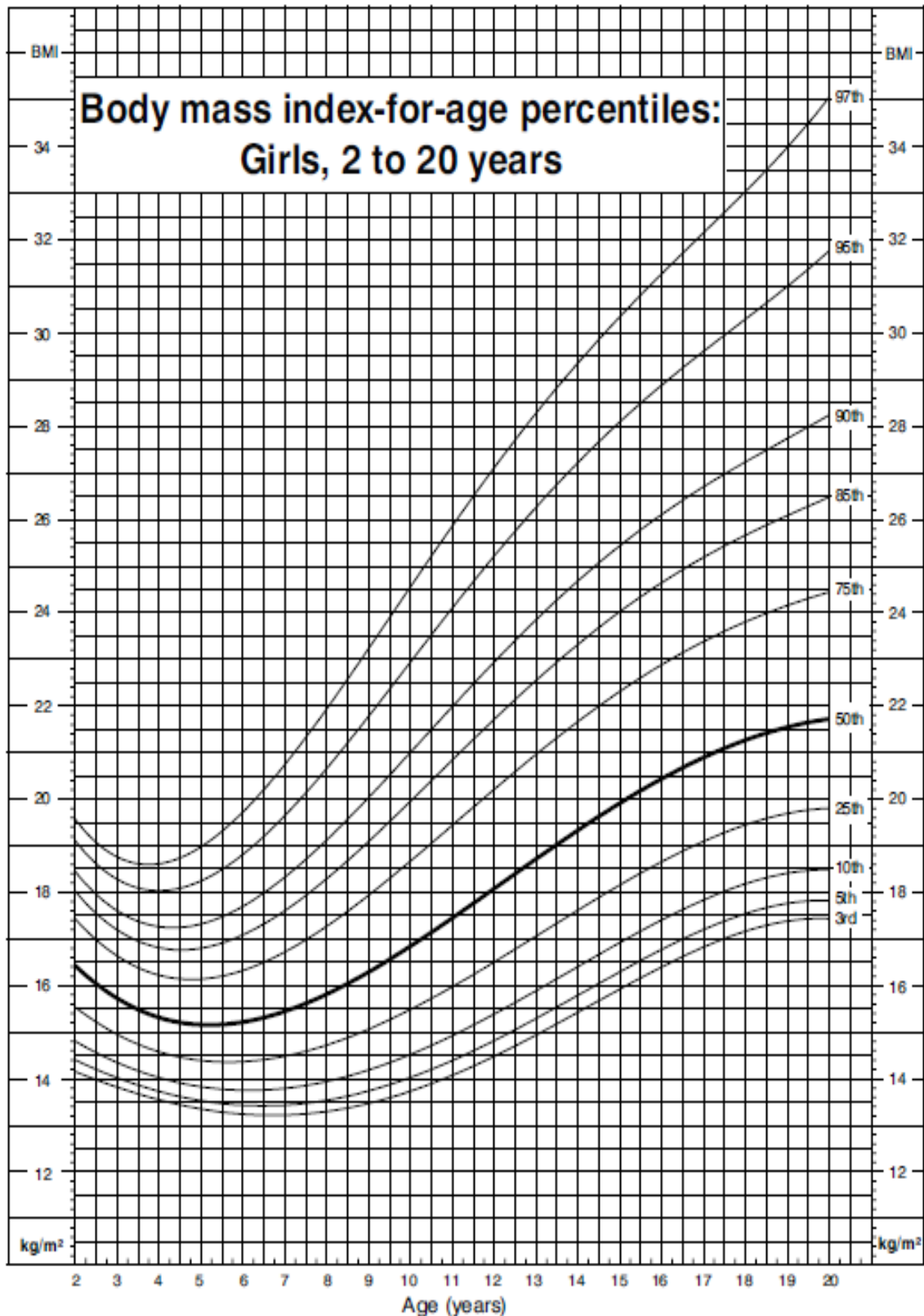




**Gráfico 3** - Percentil de Massa Corporal para meninos de 2 a 20 anos de idade

**FONTE:** (KUCZMARSKI *et al.*, 2000)

**NOTA:** As curvas do gráfico mostram os percentis de IMC ( $\text{Kg/m}^2$ ) por idade em meninos de 2 a 20 anos de idade.



**Gráfico 4** - Percentil de Massa Corporal para meninas de 2 a 20 anos de idade

**FONTE:** (KUCZMARSKI *et al.*, 2000).

**NOTA:** As curvas do gráfico mostram os percentis de IMC (Kg/m<sup>2</sup>) por idade em meninas de 2 a 20 anos de idade. Detecta-se uma diferença das curvas do gráfico anterior, dos meninos.

## 4.2 HORMÔNIO DO CRESCIMENTO

O hormônio do crescimento (GH) é hormônio multifuncional, secretado pelo órgão somatotrófico da região anterior da pituitária. Regula todo o crescimento celular e corporal, metabolismo de carboidratos, proteínas e lípidos, bem como mantém o balanço eletrolítico (AETSINGER *et al.*, 1996).

Vários grupos tentaram, sem sucesso, isolar o ligante endógeno para o GHS-R, usando extratos do cérebro, pituitária e hipotálamo, regiões nas quais há expressão do GHS-R (BENNET *et al.*, 1997 e GUAN *et al.*, 1997). Inesperadamente conseguiu-se, em 1999, isolar e identificar o ligante natural do GHS-R em tecidos de estômago e nomearam-no de grelina (GHRL) (KOJIMA *et al.*, 1999 e 2001).

BOWERS *et al.* (1980) mostraram que um tipo de GHS (*Growth Hormone Secretagogue*; secretagogo do hormônio do crescimento) participava da via reguladora da liberação do GH (*Growth Hormone*; hormônio do crescimento) juntamente com o já conhecido GHRH (*Growth Hormone Release Hormone*; hormônio de liberação do hormônio do crescimento). Desde então, vários GHSs sintéticos foram desenvolvidos e a estrutura do GHS-R (*Growth Hormone Secretagogue Receptor*; receptor do secretagogo do hormônio do crescimento) foi desvendada (SMITH *et al.*, 1996). O ligante endógeno do GHS-R era desconhecido até a descoberta da grelina. Este achado possibilitou novo campo de estudo relacionado ao GH e à regulação do apetite.

O GH é controlado por muitos fatores, em particular por dois neuropeptídeos hipotalâmicos (GHRH e somatostatina, esse último agindo na inibição do GH). Recentemente, uma terceira via de controle do GH foi descoberta em estudos com secretagogos do GH (GHSs) (DICKSON *et al.*, 1999). GHSs são componentes sintéticos, que são potentes estimuladores para a liberação do GH, atuando mediante receptor protéico específico (GHS-R) (KORBONITS *et al.*, 1999). Por serem componentes sintéticos, foi postulado que deveria existir ligante natural para o receptor do secretagogo do GH, que tivesse estrutura similar aos GHSs no sítio de ligação ao receptor (SMITH *et al.*, 1996).

#### 4.2.1 ATIVIDADE DE LIBERAÇÃO DO GH

A grelina é um hormônio com várias propriedades. Age no GHS-R aumentando a concentração interna de  $\text{Ca}^{2+}$  para estimular a liberação de GH. Comparado ao efeito estimulador do GHRH (outro hormônio relacionado à liberação do GH), que age no seu próprio receptor, o efeito causado pela grelina na liberação de GH é duas a três vezes maior (ARVAT *et al.*, 2000).

A grelina estimula a liberação de GH tanto *in vivo*, quanto *in vitro*, diretamente proporcional à dose aplicada (ARVAT *et al.*, 2000). A liberação de GH atinge o seu pico em aproximadamente 5 a 15 minutos após a injeção intravenosa de grelina e cai ao nível basal, uma hora após a injeção. Administração de grelina intracerebroventricularmente também aumenta a concentração de GH no plasma de ratos de maneira diretamente proporcional, com dose mínima de 10 pmol (DATE *et al.*, 2000b).

A grelina estimula a liberação de GH a partir da pituitária primária (KOJIMA *et al.*, 1999). Entretanto, o próprio hipotálamo parece estar envolvido na estimulação da liberação do GH mediada pela grelina. Pacientes com lesões no hipotálamo mostraram uma liberação insuficiente do GH mesmo quando estimulados pela grelina (POPOVIC *et al.*, 2003). Altas doses de grelina em humanos aumentam os níveis de ACTH, prolactina e cortisol (ARVAT *et al.*, 2001).

#### 4.3 GRELINA

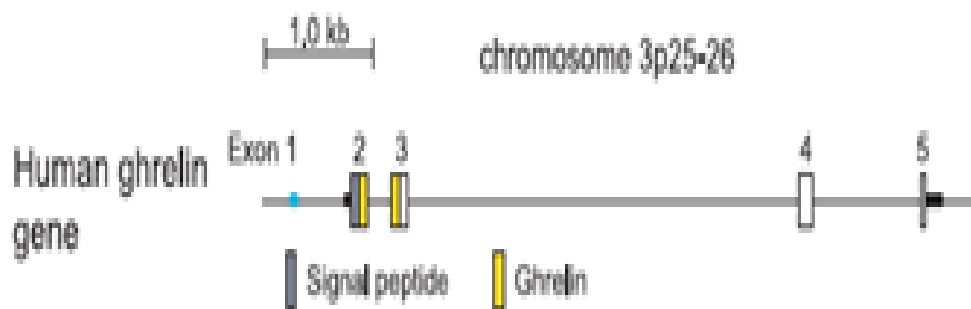
O nome grelina é baseado em “*ghre*”, do grego e “*grow*”, em inglês, que significa crescimento, em alusão ao fato de atuar na liberação do hormônio do crescimento (GH). Os níveis mais elevados de grelina são encontrados quando o GH começa a exercer seus efeitos no crescimento e mudanças importantes na ingestão de alimentos ocorrem, sugerindo que este hormônio possa participar nestes processos (STYLIANOU *et al.*, 2007).

#### 4.3.1 GENE DA GRELINA

O gene da grelina humana (*GHRL*) está localizado no cromossomo 3 (3p25-p26) e o gene do receptor para a grelina (*GHS-R*) também foi localizado nesse cromossomo (3q26-q27) (SMITH *et al.*, 1997).

O gene da grelina humana, assim como o do camundongo, contém cinco exons (**Figura1**) (TANAKA *et al.*, 2001; KOJIMA e KANGAWA 2005).

O primeiro e mais curto contém apenas 20 pb, e engloba parte da região 5' não traduzida (5' UTR), não sendo considerado por outros autores que consideram o gene da grelina como tendo 4 exons (UKKOLA *et al.*, 2001).

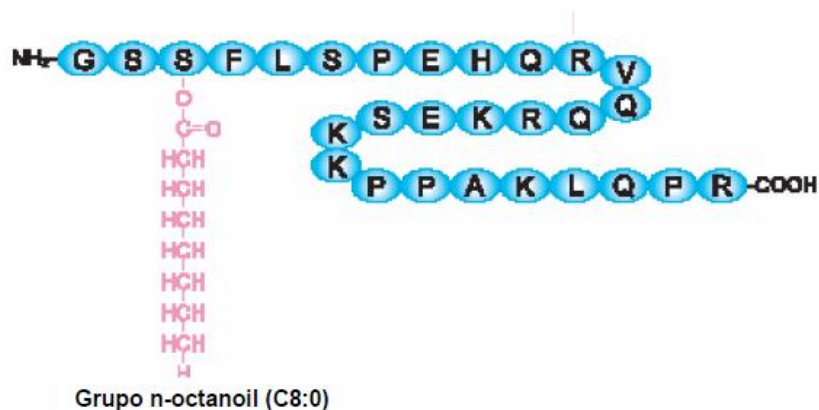


**Figura 1:** Desenho esquemático do gene *GHRL*, mostrando os cinco exons (retângulos) e os introns (linhas) que o compõem.

FONTE: Adaptado de Kojima e Kangawa, 2005

A grelina é um peptídeo de 28 aminoácidos (**Figura 2**), codificado pelos exons 2 e 3 (KOJIMA e KANGAWA, 2005).

A terceira serina (ser3) está *n-octanoilada*, o que é condição essencial para a atividade da grelina. A grelina é o primeiro caso conhecido de um peptídeo modificado por ácido graxo (KOJIMA *et al.*, 1999).



**Figura 2** - Peptídeo da grelina humana madura com 28 aminoácidos, mostrando a serina 3 noctanoilada

FONTES: KOJIMA, M.; KANGAWA, K. Ghrelin: structure and function. **Phisio. Rev.**, v. 85, p. 495-522, 2005.

A seqüência de aminoácidos em mamíferos para o precursor da grelina é bastante conservada. Nesses precursores a seqüência ativa da grelina com 28 aminoácidos vem logo após o peptídeo sinal. O sítio de clivagem para o peptídeo sinal é o mesmo em todas as grelinas de mamíferos (KOJIMA e KANGAWA, 2005).

O precursor da grelina humana, codificado pelos 5 exons do gene *GHRL* (sendo o exon 1 codificador da região 5' UTR), é constituído por 518 pb codificados em seqüência de 117 aminoácidos, distribuídos em 23 aminoácidos do peptídeo sinal e 94 aminoácidos da pró-grelina, os quais compreendem os 28 aminoácidos da grelina madura e mais 66 aminoácidos, que incluem os 23 da obestatina, hormônio com características antagônicas à grelina, que suprime o apetite e a atividade estomacal. (KOJIMA *et al.*, 1999; ZHANG *et al.*, 2005)

Em humanos, vários polimorfismos foram identificados no gene *GHRL*: várias mutações intrônicas foram encontradas (*rs35683*, *rs35682*, *rs2075356*, *rs 35681*, *rs11923313*, *rs697228*, *rs11923293*, *rs9866514*, *rs42451*, *rs35680*, *rs35679*, *rs26802*) e três variações localizadas nos exons 2 (R51Q - *rs34911341* e L72M – *rs 696217*) e 4 (Q90L - *rs4684677*). O SNP (*Single- Nucleotide Polymorphism*) L72M refere-se a troca na posição 72, do aminoácido Leucina por Metionina (Leu72Met) e o *SNP* R51Q, refere-se a troca na posição 51, do aminoácido Arginina por Glutamina (Arg51Gln).

#### 4.3.2 DERIVADOS DA GRELINA

O gene da grelina pode gerar várias moléculas bioativas: a grelina acilada, a desacilada e a obestatina (SOARES & MOREIRA, 2008).

As duas principais formas da grelina encontradas no estômago e no plasma são a grelina desacilada, que é a forma na qual é secretada, e a grelina acilada (HOSODA *et al.*, 2000). A obestatina, hormônio também isolado do estômago do rato, também é codificado pelo gene da grelina, e opõe-se aos efeitos da grelina no que diz respeito à ingestão alimentar. O tratamento de ratos com obestatina suprime a ingestão de alimentos, e diminui o ganho de peso (ZHANG *et al.*, 2005). A obestatina é hormônio com características antagônicas à grelina, que suprime o apetite e a atividade estomacal (KOJIMA *et al.*, 1999; ZHANG *et al.*, 2005).

No plasma, a forma desacilada da grelina é encontrada predominantemente (80% a 90%) e se liga às lipoproteínas de alta densidade (HDLs), que contêm algumas esterases (BEAUMONT *et al.*, 2003). Portanto, a forma desacilada da grelina seria produto de modificação da forma acilada. A forma desacilada da grelina não substitui a grelina acilada nas regiões de ligação no hipotálamo e pituitária e também não mostra atividade endócrina nem em ratos nem em humanos (KOJIMA e KANGAWA, 2005). A questão que surge então é em que região atuaria essa forma desacilada da grelina. BALDANZI *et al.* (2002) sugeriram a existência de outro receptor para a grelina no sistema cardiovascular, pois mostraram que tanto a grelina acilada quanto a des-acilada reconhecem região de ligação em cardiomiócitos que não possui o receptor para a grelina (GHS-R).

Além disso, foi destacado que a forma desacilada compartilha, com a forma acilada, algumas ações não endócrinas como o controle de proliferação celular e adipogênese (CASSONI *et al.*, 2004). CAMILLERI *et al.* (2009) sugerem que a grelina desacilada apresenta ações biológicas sutis e às vezes contraditórias no controle da homeostase energética, e motilidade gastrointestinal. Esses efeitos normalmente se opõem ou modificam a ação da grelina.

A grelina acilada age no GHS-R1a para estimular a liberação de GH. Possui uma modificação *n-octanóica* na serina que está na posição três, caracterizando a

descoberta do primeiro caso conhecido de um hormônio peptídico modificado por um ácido graxo (KOJIMA *et al.*, 1999; KOJIMA *et al.*, 2001). O grupamento acil que se liga à grelina sintetizada corresponde aos ácidos graxos que foram ingeridos, indicando que os mesmos são usados diretamente para a acilação da grelina (KOJIMA & KANGAWA, 2005). Essa modificação é indispensável para aumentar a ingestão de alimentos e a adipogênese em humanos e em ratos (KOJIMA & KANGAWA, 2005; CHEN *et al.* 2009b). Há evidências de que a ingestão de triglicerídeos de cadeia média pode aumentar a produção da grelina acilada sem alterar o nível da grelina total (acilada e desacilada).

A produção de derivados da grelina por via sintética mostra que os grupos hidrofóbicos ligados ao terceiro aminoácido são essenciais para atividade máxima da grelina (BEDNAREK *et al.*, 2000; MATSUMOTO *et al.*, 2001). A atividade máxima da grelina foi observada quando a grelina estava n-octanoilada.

Um peptídeo pequeno, contendo apenas os primeiros quatro aminoácidos da grelina, ainda consegue ativar o GHS-R. Entretanto, apenas os três primeiros são incapazes de ativar o receptor, o que indica que os quatro primeiros peptídeos constituem o mínimo essencial para essa ação (BEDNAREK *et al.*, 2000; MATSUMOTO *et al.*, 2001).

#### 4.3.3 REGULAÇÃO DA SECREÇÃO E CONCENTRAÇÃO DA GRELINA

A grelina é produzida no estômago, principalmente nas células do fundo (corpo) (DATE *et al.*, 2000a), nas células X/A-like, um tipo de células endócrinas encontradas na mucosa do estômago (DATE *et al.*, 2000b), podendo também ser encontradas no duodeno, jejuno, íleo, pâncreas, cólon e em outros tecidos (DATE *et al.*, 2000a; GNANAPAVAN *et al.*, 2002; YOSHIMOTO *et al.*, 2002; KOJIMA & KANGAWA, 2008; KOJIMA & KANGAWA, 2010).

Age no núcleo arqueado do hipotálamo (ARC) (em inglês, *arcuate nucleus*), importante região no controle do apetite (HOWARD *et al.*, 1996; GUAN *et al.*, 1997; NAKAZATO *et al.*, 2001). Também foi encontrada na glândula hipófise, local que pode agir na liberação do GH por uma via autócrina ou parácrina. Esse padrão de localização



sugere desempenhar papel no controle da ingestão alimentar com ação independente de seu efeito na liberação de GH (KOJIMA & KANGAWA, 2005; CHEN *et al.*, 2009a).

No ARC, a grelina induz uma pré-sinapse nos neurônios que expressam o neuropeptídeo Y (NPY) para liberá-los, estimulando a ingestão alimentar (KOJIMA & KANGAWA, 2005).

O controle da secreção da grelina acilada pré prandial (período que antecede a alimentação) não está completamente esclarecido, mas a ação simpática pode estar envolvida (DE LA COUR *et al.*, 2007; KOJIMA & KANGAWA, 2010). Sua supressão pós-prandial não é mediada apenas por nutrientes no estômago ou duodeno, pois ocorre também quando os mesmos são administrados por infusão jejunal, gástrica ou duodenal (OVERDUIN *et al.*, 2005). O nível de glicose no sangue também pode ser fator crítico, pois quando a glicose é administrada oral ou intravenosamente, a concentração de grelina no plasma diminui (SHIYA *et al.*, 2002).

SÁNCHEZ *et al.* (2004) relatam que carboidratos apresentam maior efeito supressor em relação aos lipídeos. A glicose e os aminoácidos suprimem mais efetivamente do que lipídeos e frutose (TEFF *et al.*, 2004; OVERDUIN *et al.*, 2005). Além disso, a intensidade e a duração da supressão dos níveis de grelina pós-prandial estão relacionadas de forma dose-dependente com a quantidade de calorias das refeições (CALLAHAN *et al.*, 2004).

Outro estudo mostra supressão bifásica da grelina, caracterizada pela diminuição inicial de grelina total e acilada e um efeito rebote muito aumentado sobre os valores pré-prandiais iniciais, após a ingestão de carboidratos isolados, sugerindo que as dietas hiperprotéicas e pobres em carboidratos contribuem para a perda de peso, e as ricas em gordura, para aumentar o ganho de peso (FOSTER-SCHUBERT *et al.*, 2008). A supressão da grelina acilada pós-prandial está demonstrada em animais e humanos adultos, mas não em crianças (BELLONE *et al.*, 2004).

A grelina desacilada eleva-se pelo jejum induzido em ratos e humanos e é suprimida pela alimentação (SEOANE *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2008; MONDAL *et al.*, 2008; KIRCHNER *et al.*, 2009). Estudo recente mostrou que é regulada em resposta à privação de alimento em ratos, apoiando a idéia de que a grelina desacilada desempenha papel fisiológico ainda indefinido no comportamento alimentar (KIRCHNER *et al.*, 2009).

A concentração normal da grelina no plasma sanguíneo em humanos é de 34-69 pg/ml (10 – 20 fmol/ml) para a grelina n-octanoilada (acilada) e 340-519 pg/ml (100 – 150 fmol/ml) para a grelina total (acilada e des-acilada) (KOJIMA & KANGAWA, 2005). A concentração de grelina plasmática é sensível ao número e ao horário de refeições (ERDMANN *et al.*, 2003; GREENMAN *et al.*, 2004). A concentração da grelina no plasma aumenta em condições de jejum e reduz após alimentação, determinando o papel da grelina como gatilho para o início da refeição (CUMMINGS *et al.*, 2001). A distensão gástrica pela água não altera a concentração de grelina, e a distensão mecânica isolada não induz sua secreção (KOJIMA & KANGAWA, 2005). No entanto, a concentração de grelina é sensível ao tipo de refeição: diminui com refeição hiperlipídica e aumenta com hiperproteica (KOJIMA & KANGAWA, 2008).

A concentração de grelina no plasma é mais baixa em obesos do que em controles com IMC normal, pareados por idade, o que sugere processo de regulação (HANSEN *et al.*, 2002).

#### 4.3.4 DESACILAÇÃO DA GRELINA PELA BUTIRILCOLINESTERASE

No soro, a grelina está, em sua maioria, desoctanoilada. No soro humano, a desoctanoilização da grelina é parcialmente inibida por salicinato de eserina e por fluoreto de sódio, dois inibidores da butirilcolinesterase. A butirilcolinesterase purificada é capaz de degradar a grelina, e há relação positiva entre a butirilcolinesterase e a desoctanoilização da grelina no soro humano (DE VRIESE *et al.*, 2004).

Comparado com o soro humano, o soro de ratos tem bem menos butirilcolinesterase, mas maior atividade de hidrólise em relação à grelina, indicando que há outra esterase para essa reação no soro de ratos.

Pelo fato da butirilcolinesterase representar proporção significativa das atividades de esterases no soro humano, seu papel no processo de desoctanoilização da grelina é provável, mas ela não parece ser a única enzima que participa desse processo (DE VRIESE *et al.*, 2004).

A grelina acilada, a desacilada, a obestatina e o GHS-R1a podem ser parte de sistema com vários elementos efetores que constitui o centro do eixo integrado cérebro-intestino, modulando o apetite, a digestão, a motilidade, a adiposidade e a distribuição de nutrientes (CHEN *et al.*, 2009b)

#### 4.3.5 DISTRIBUIÇÃO DA GRELINA NO ORGANISMO

##### 4.3.5.1 ESTÔMAGO E ÓRGÃOS GASTROINTESTINAIS

Em vertebrados a grelina é produzida principalmente no estômago. As células produtoras de grelina do estômago são mais abundantes no fundus (corpo) do que no piloro. Estudos por hibridização *in situ* e por análises histoquímicas indicam que as células produtoras de grelina (X/A) são um tipo distinto de célula endócrina encontrada na mucosa do estômago (DATE *et al.*, 2000a).

Células imunorreativas para a grelina também são encontradas no duodeno, jejuno, íleo, e cólon (DATE *et al.*, 2000a). O pâncreas também é órgão produtor de grelina, porém há controvérsias quanto às células que a produzem nesse órgão (DATE *et al.*, 2002).

##### 4.3.5.2 CÉREBRO E PITUITÁRIA

A grelina já foi encontrada no núcleo arqueado do hipotálamo, importante região controladora do apetite (LU *et al.*, 2002) e estudos recentes também indicaram a presença da grelina em neurônios hipotalâmicos de tipo não caracterizado previamente (COWLEY *et al.*, 2003).

##### 4.3.5.3 OUTROS TECIDOS

O mRNA referente à grelina é expresso no rim, especialmente no glomérulo (GNANAPAVAN *et al.*, 2002), sendo que, estratos de peptídeos de rim de ratos contêm tanto as formas acilada quanto desacilada da grelina em quantidades significativas.

Células imunorreativas para a grelina foram encontradas em citotrofoblastos da placenta no primeiro trimestre da gravidez e não foram detectadas no segundo trimestre (GUALILLO *et al.*, 2001). A grelina foi encontrada em células do sinciotrofoblasto da placenta humana e em células trofoblásticas labirínticas da placenta do rato.

#### 4.3.5.4 FUNÇÕES FISIOLÓGICAS DA GRELINA

A grelina, que se liga ao GHS-R, causa aumento na ingestão alimentar e diminuição no gasto energético. A obestatina, que se liga ao receptor GPR39 faz o inverso, ela aumenta o gasto energético e diminui a ingestão alimentar. Esses dois hormônios trabalham no sentido de manter equilíbrio energético (NOGUEIRAS *et al.*, 2005).

Além de sua influência sobre o apetite, a grelina acilada interfere no peso corporal e na adiposidade (CHEN *et al.*, 2009b). Estudo recente revelou que a grelina acilada pode limitar a utilização de tecido adiposo branco durante a privação calórica (DAVIES *et al.*, 2009).

Dentre as ações periféricas da grelina, destacam-se a estimulação da secreção ácida, a motilidade gástrica e os distúrbios da motilidade gástrica (ASAKAWA *et al.*, 2001; BALDELLI *et al.*, 2001; ASAKAWA *et al.*, 2005; CAMILLERI *et al.*, 2009).

MIETLICKI *et al.* (2009), em experimentos com ratos, sugerem que as ações de grelina acilada não se limitam ao estímulo da ingestão alimentar, mas também podem incluir alterações que inibem o consumo de água, o que lhe confere papel preponderante no comportamento alimentar (CHEN *et al.*, 2009b).

#### 4.4 GRELINA E OBESIDADE

KORBONITS *et al.* (2002) analisaram o gene da grelina (*GHRL*; 3p26-p25) em crianças altas e obesas e identificaram dez *SNPs*, sendo que um deles (L72M) estava significativamente associado a um IMC maior.

TSCHÖP *et al.* (2000) analisaram o efeito da administração periférica diária de grelina em ratos e camundongos e constataram aumento significativo de peso pela redução da utilização de gorduras. No mesmo trabalho os autores verificaram que injeções intracerebroventriculares de grelina provocam hiperfagia e aumento de peso e que os níveis séricos de grelina aumentam durante o jejum, retornando aos níveis normais após a alimentação.

TSCHÖP *et al.* (2000) sugerem que a grelina, além da regulação da secreção de GH, sinaliza para o hipotálamo a necessidade de aumento na eficiência metabólica.

UKKOLA *et al.* (2001) encontraram associação entre o alelo R51Q do gene da grelina e obesidade em mulheres.

HINNEY *et al.* (2002) analisaram a região codificadora do gene da grelina em crianças e adolescentes e encontraram os alelos R51Q e L72M, anteriormente descritos por UKKOLA *et al.* (2001) e KORBONITS *et al.* (2002), com frequências semelhantes em obesos e controles de peso normal. Identificaram ainda outros dois variantes do gene da grelina que também não apresentaram associação com a obesidade.

#### 4.4.1 REGULAÇÃO DO APETITE

A grelina funciona de modo a transmitir sinais de fome para o cérebro.

Análises imunohistoquímicas indicaram que os neurônios que contêm grelina são encontrados no núcleo arqueado (ARC) do hipotálamo, uma região envolvida na regulação do apetite (LU *et al.*, 2002).

No ARC, estes neurônios que contêm grelina possuem fibras eferentes para neurônios que expressam os peptídeos NPY e AGRP, estimulando a liberação destes peptídeos orexigênicos, e neurônios produtores de proopiomelanocortin (polipeptídeo precursor do ACTH- Hormônio Adrenocorticotrófico) que suprimem a liberação de peptídeos anorexigênicos (COWLEY *et al.*, 2003) .

A grelina é produzida primariamente nos órgãos gastrointestinais em resposta a fome, e circula pelo sangue servindo como sinal periférico que avisa ao sistema nervoso central para estimular a ingestão alimentar. Os níveis de grelina no

plasma aumentam imediatamente antes de cada refeição e caem a níveis mínimos uma hora após a ingestão (CUMMINGS *et al.*, 2001).

O aumento inicial dos níveis de grelina foi observado em humanos que iniciaram as refeições em qualquer horário e sem disposição para comer (CUMMINGS *et al.*, 2004). De fato os níveis de grelina e de fome se mostraram positivamente relacionados. Além disso, a diminuição tardia do nível de grelina no plasma é proporcional à quantidade de calorias ingeridas (CALLAHAN *et al.*, 2004).

A expressão do gene da grelina no estômago aumenta com o jejum e diminui com a administração de leptina e interleucina (IL)-1 $\beta$  (KIM *et al.*, 2003).

A grelina produz balanço energético positivo devido a promoção da ingestão alimentar e à diminuição do gasto de energia, bem como pelo bloqueio da anorexia induzida pela IL-1 $\beta$ .

## 5 RESULTADOS - ARTIGO

### ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE VARIANTES DO GENE *GHRL* (GRELINA) COM OBESIDADE NA ADOLESCÊNCIA

#### 5.1 RESUMO

A obesidade é uma doença complexa, suas formas comuns são poligênicas e multifatoriais, sendo fator de risco para várias doenças graves, como cardiovasculares, diabetes. A grelina é um peptídeo estimulador de apetite e que atua na liberação do GH. Estudos em modelos animais indicam que a grelina desempenha importante papel na sinalização dos centros hipotalâmicos que regulam a ingestão alimentar e o balanço energético. O gene da grelina humana (*GHRL*) está localizado no cromossomo 3 (3p25-p26) e contém cinco exons. Nesse estudo foram analisadas duas variantes do gene da grelina localizadas no exon 2 (R51Q - *rs34911341* e L72M - *rs696217*). Com o objetivo de verificar a associação entre os polimorfismos L72M e R51Q do gene *GHRL* e a obesidade em adolescentes, o presente estudo analisou as variantes L72M e R51Q do gene *GHRL* em adolescentes obesos submetidos a programa de 12 semanas de exercícios físicos e em adolescentes controles não obesos. Os adolescentes obesos foram submetidos a programa multidisciplinar de atividade física e orientação nutricional. Variáveis antropométricas e bioquímicas também foram avaliadas. Os dois *SNPs* estudados estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (*SNP* L72M/controles:  $\chi^2 = 1,52$ ;  $p = 0,45$ . Obesos:  $\chi^2 = 0,09$ ;  $p = 0,95$ . *SNP* R51Q/controles:  $\chi^2 = 0,97$ ;  $p = 0,04$ . Obesos:  $\chi^2 = 0,99$ ;  $p = 0,07$ ). Nos 178 indivíduos estudados no presente estudo para o *SNP* L72M foram encontradas diferenças significativas entre as frequências genotípicas, quando se compararam obesos e controles utilizando o (Teste Exato de Fisher,  $p = 0,0127$ ). Nos 132 doadores de sangue analisados no presente estudo para o *SNP* R51Q não houve diferenças significativas entre as frequências genotípicas e alélicas, quando se compararam obesos e controles (Teste Exato de Fisher,  $p = 1,0$ ). Conclui-se que pode existir uma relação entre o *SNP* L72M e a obesidade em adolescentes, além de efeito protetor do alelo 72M contra a obesidade.

**Palavras - Chave:** Obesidade, Grelina, Adolescentes

## 5.2 ABSTRACT

Obesity is a complex disease, its forms are common polygenic and multifactorial, with a risk factor for several serious diseases such as cardiovascular, diabetes. Ghrelin is an appetite-stimulating peptide, with acts on GH release. Studies in animal models suggest that ghrelin plays an important role in the signaling of the hypothalamic centers that regulate food intake and energy balance. The human ghrelin gene (GHRL) is located on chromosome 3 (3p25-p26) and contains five exons. In this study we analyzed two variants of the ghrelin gene located in exon 2 (R51Q - *rs34911341* and L72M - *rs696217*). In order to verify the association between R51Q and L72M polymorphisms of the gene and obesity in adolescents GHRL, this study analyzed the variants R51Q and L72M GHRL gene in obese adolescents undergoing 12 weeks program of physical exercise and non-obese controls. The obese adolescents underwent a multidisciplinary program of physical activity and nutritional counseling. Anthropometric and biochemical variables were also evaluated. The SNPs studied were in Hardy-Weinberg (SNP L72M/controls:  $\chi^2 = 1,52$  ;  $p = 0,45$ . Obese:  $\chi^2 = 0,09$  ;  $p = 0,95$ . SNP R51Q/controls:  $\chi^2 = 0,97$  ;  $p = 0,04$ . Obese:  $\chi^2 = 0,99$  ;  $p = 0,07$ ). At the 178 individuals analyzed in this study for the Leu72Met ghrelin variant were found significant differences between obese and controls (Fisher Test,  $p = 0,0127$ ). In 132 individuals analyzed in this study for the Arg51Gln ghrelin gene variant no significant differences were found (Fisher Test,  $p = 1,0$ ). These results suggest that only the Leu72Met polymorphisms of the human ghrelin gene contribute to the genetic susceptibility to obesity, and may suggest a protective effect of 72M allele against obesity.

**Key-words:** Obesity, Ghrelin, Adolescents



### 5.3 INTRODUÇÃO

A obesidade é caracterizada por depósito excessivo de gordura no organismo. Esse depósito funciona como estoque para o organismo, de modo que, os nutrientes não utilizados para produção imediata de energia passam a ser armazenados em forma de gordura para disponibilização posterior. A obesidade leva à predisposição e à exacerbação de doenças como câncer de mama, de cólon, de rim e de vesícula, hipertensão, doença arterial coronariana e diabetes mellitus do tipo II. Atinge proporções globais, com mais de um bilhão de adultos com sobrepeso, sendo pelo menos 300 milhões clinicamente obesos. No Brasil a obesidade hoje atinge 38 milhões de adultos com mais de 20 anos e deste total 10 milhões são considerados obesos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

A estimativa do seu componente genético só pode ser realizada dentro de cada população em ambiente específico, pois os genes de predisposição para obesidade e os alelos de cada indivíduo interagem de vários modos e com diferentes ambientes, de modo que o fenótipo final pode surgir a partir de diferentes componentes. A maioria dos estudos, entretanto, concorda que os fatores genéticos desempenham papel significativo nas diferenças individuais no peso corporal e na adiposidade (MAES *et al.*, 1997; WADE *et al.*, 2001).

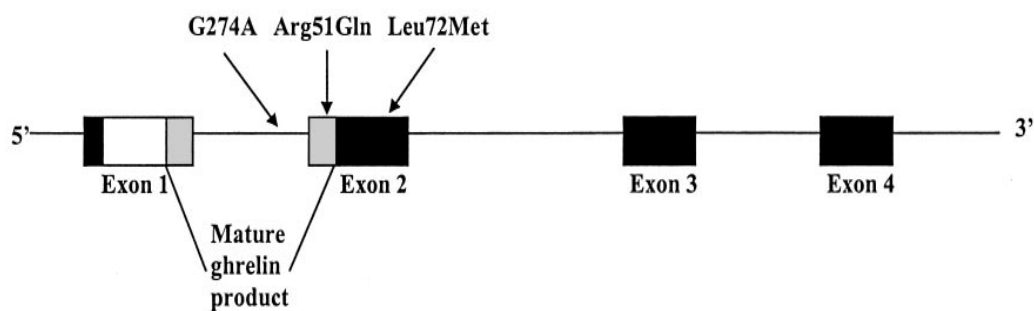
O nome grelina é baseado em “*ghre*” uma palavra de origem proto-indo europeia que significa crescimento, em alusão ao fato de estimular o GH. Os níveis mais elevados de grelina são encontrados quando a hormônio de crescimento começa a exercer seus efeitos no crescimento e mudanças importantes na ingestão de alimentos ocorrem, sugerindo que este hormônio possa participar nestes processos (STYLIANOU *et al.*, 2007).

A concentração normal da grelina no plasma sanguíneo em humanos é de 10 – 20 fmol/ml para a grelina n-octanoilada e 100 – 150 fmol/ml para a grelina total (acilada e des-acilada). A concentração da grelina no plasma aumenta em condições de jejum e reduz após alimentação, sugerindo assim que a grelina possa ser um sinal inicial para o aumento do apetite (CUMMINGS *et al.*, 2001).

A concentração de grelina no plasma é mais baixa em obesos do que em controles com IMC normal, pareados por idade, o que sugere um processo de regulação (HANSEN *et al.*, 2002).

O gene da grelina humana (*GHRL*) está localizado no cromossomo 3 (3p25-p26) (SMITH *et al.*, 1997) e contém cinco exons (TANAKA *et al.*, 2001; KOJIMA e KANGAWA, 2005). A grelina é um peptídeo de 28 aminoácidos codificado pelos exons 2 e 3 (KOJIMA e KANGAWA, 2005).

Em humanos, vários polimorfismos foram identificados no gene *GHRL*: várias mutações intrônicas foram encontradas (*rs35683*, *rs35682*, *rs2075356*, *rs 35681*, *rs11923313*, *rs697228*, *rs11923293*, *rs9866514*, *rs42451*, *rs35680*, *rs35679*, *rs26802*) e três variações localizadas nos exons 2 (R51Q - *rs34911341* e L72M – *rs 696217*) e 4 (Q90L - *rs4684677*) (Figura 1). As frequências alélicas para os polimorfismos R51Q e L72M são similares em obesos e controles. Entretanto, foi relatado que obesos com o alelo 72M adquirem a obesidade precoce quando comparado com obesos homocigotos para o tipo selvagem L72, sugerindo que L72M afete a atividade da grelina (KOJIMA e KANGAWA (2005) e UKKOLA *et al.* (2001).



**Figura 1** – Estrutura do gene da GHRL e locais de mutação. Adaptado de Ukkola *et al.*, 2001.

A mutação R51Q resulta em mudança do sítio COOH-terminal responsável pela recomposição do peptídeo da grelina, resultando em falha nessa recomposição que é necessária para produzir a grelina com 28 aminoácidos. Uma pro-grelina com 94 aminoácidos de comprimento é produzida no lugar da normal, cuja atividade biológica ainda não foi avaliada. UKKOLA *et al.* (2001) estudaram 96 mulheres obesas mórbidas (IMC =  $42,3 \pm 3,4$  kg/m<sup>2</sup>) e 93 não obesas (IMC =  $23 \pm 1,4$  kg/m<sup>2</sup>), sendo que a

mutação R51Q foi identificada em seis heterozigotas obesas (6,3%) mas não entre os controles ( $p < 0,05$ ).

Estudos de grupo de pesquisa (DANTAS, 2008), mostram correlação positiva entre a variante L72M e atividade da BChE em obesos. De acordo com KOJIMA e KANGAWA (2005) e UKKOLA *et. al.* (2001), apesar de a variação L72M não estar presente na região codificadora da proteína grelina, o alelo mutante 72M induz a uma obesidade mais precoce.

#### 5.4 OBJETIVOS

O objetivo geral do presente trabalho foi verificar a associação entre os polimorfismos L72M e R51Q do gene *GHRL* e a obesidade em adolescentes. Com esse propósito analisamos as variantes L72M e R51Q do gene *GHRL* em adolescentes obesos submetidos a programa de 12 semanas de exercícios físicos e em adolescentes não obesos controle; comparamos os dados obtidos com dados de adultos obesos e da população em geral e verificamos associação genética com a perda de peso e a taxa metabólica basal nos adolescentes submetidos a programa de 12 semanas de exercícios físicos.

#### 5.5 MATERIAL E MÉTODOS

**AMOSTRA** Foram selecionados 47 obesos voluntários residentes em Curitiba/Paraná, com idades entre 10 e 16 anos, que preencham os seguintes critérios: IMC acima do percentil 95; peso estável em um período maior ou igual há dois meses; não estar utilizando medicamentos anorexígenos ou outros que possam interferir no controle de peso e na hiperinsulinemia.

As amostras controle foram selecionadas do banco de dados do projeto ALPE do Laboratório de Polimorfismos e Ligação. No total foram utilizados 131 controles para a variante L72M e 94 controles para a variante R51Q, de indivíduos não obesos com  $18 \leq \text{idade} \leq 19$  e apresentando  $\text{IMC} < 25$ .

O recrutamento, as coletas e as avaliações multidisciplinares do grupo de obesos foram realizados em parceria com o Programa de Pós-Graduação em Educação Física, no Núcleo de Pesquisa em Qualidade de Vida da Universidade Federal do Paraná, sendo as análises genéticas realizadas no Laboratório de Polimorfismos do e Ligação do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná.

Após as avaliações iniciais os indivíduos selecionados receberam orientação para Estilo de Vida Saudável (EVS) que ocorreu em seis encontros em grupo conduzidos por equipe multidisciplinar composta por nutricionista, professor de educação física e psicólogo. Após esta etapa, foi iniciada a prática de exercícios físicos que incluíram 36 sessões de exercícios programados durante 12 semanas; atividades aeróbicas três vezes por semana no período da manhã ou tarde (50 minutos de caminhada, 50 minutos de ciclismo *indoor* e 20 minutos de alongamento).

A faixa de treinamento individualizada para a caminhada e ciclismo *indoor* foi calculada a partir da  $FC_{máx}$  e o  $VO_{2max}$  obtidos nos testes ergométricos.

O ciclismo *indoor* e a caminhada foram iniciados na intensidade entre 35 a 55% da frequência cardíaca de reserva da 1ª a 4ª semana, aumentando-se para 45 a 65%, na 5ª a 8ª semana, e atingindo-se entre 55 e 75% da FCR na 9ª a 12ª semana.

**EXTRAÇÃO DE DNA** Das amostras de não obesos utilizadas, 60 só possuíam plasma disponível e para estas amostras foi utilizado um Kit de extração *QIAamp DNA MiniKit* da Qiagen. O protocolo para extração de DNA a partir de material parafinado com o sistema comercial QIAamp DNA minikit® foi realizado de acordo com as normas do fabricante.

**PCR-SSCA** A técnica de PCR-SSCA (análise de conformação de fita simples) foi utilizada para o estudo das variantes L72M e R51Q do gene *GHRL*. Essa técnica consiste em amplificar fragmentos de 200 a 300 pb do gene, através de PCR, sendo que o produto da PCR é desnaturado por calor e submetido a eletroforese em fita simples em um gel de poliacrilamida.

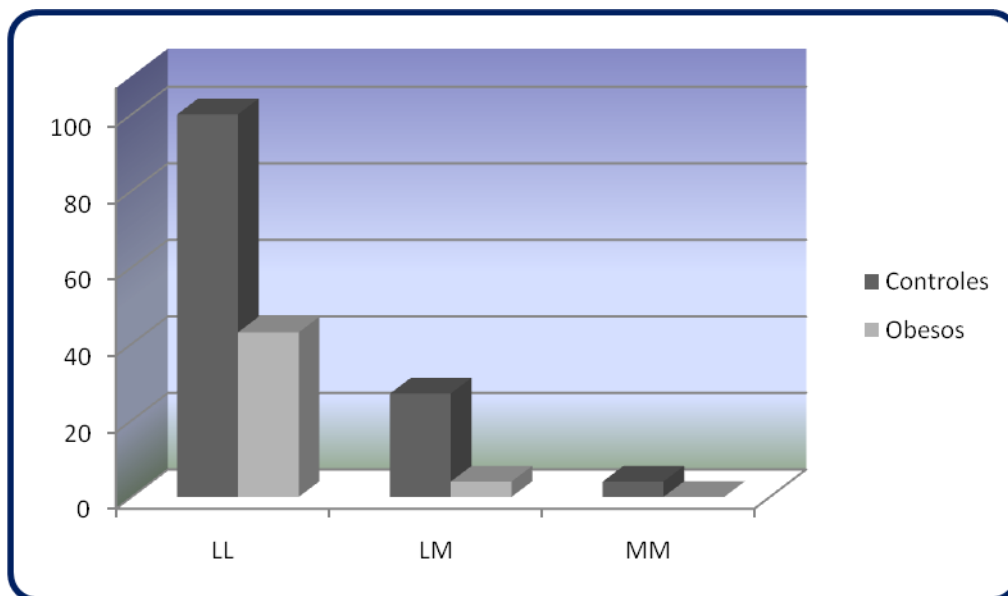
**PCR TEMPO REAL** Derivada da PCR convencional, a PCR em Tempo Real se mostra como uma inovação tecnológica e vem conquistando espaço nos diagnósticos clínicos e nos laboratórios de pesquisa por apresentar a capacidade de gerar, além de resultados qualitativos, resultados quantitativos, se mostrando de forma mais rápida e

precisa (VALONES, 2009). A técnica de PCR Tempo Real foi utilizada na confirmação dos resultados encontrados com o uso de PCR tradicional e eletroforese SSCA para a variante L72M, e para as amostras de obesos provenientes de plasma (n=09) também analisados em relação à mesma variante.

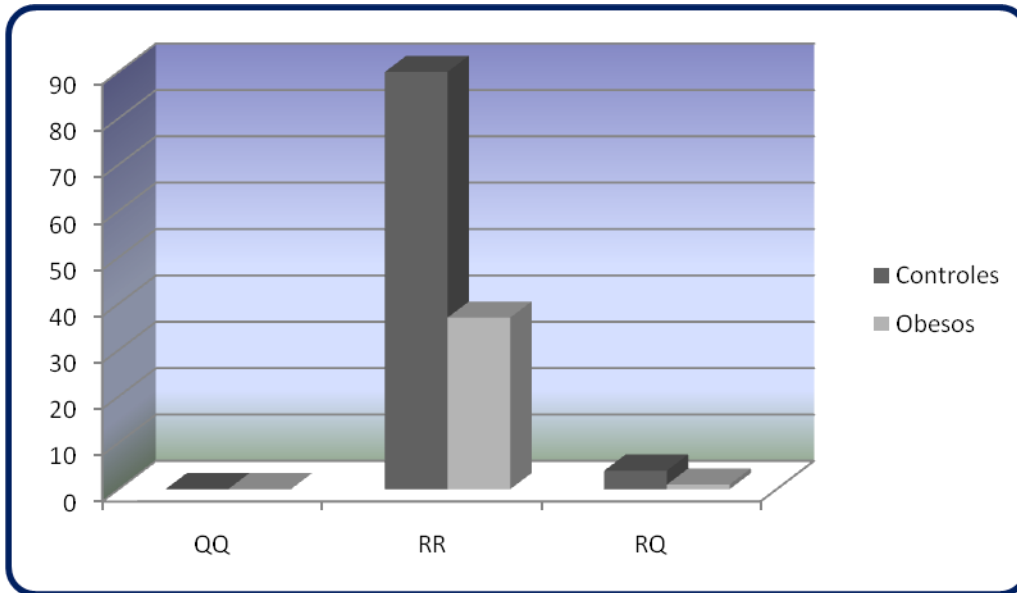
**ANÁLISE ESTATÍSTICA** As freqüências alélicas foram obtidas pelo método de contagem direta. As análises estatísticas (médias, freqüências, teste *t*, teste *F*, teste  $\chi^2$ , teste exato de Fisher, coeficiente de correlação etc.) foram realizadas com o uso do programa STATISTICA for Windows (STATSOFT, Inc. 1996).

## 5.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A distribuição dos genótipos em obesos e controles para as variantes L72M e R51Q do gene *GHRL* está representada nos **gráficos 1 e 2** a seguir.



**Gráfico 1** – Distribuição dos genótipos para a variante L72M do gene *GHRL* para obesos e controles



**Gráfico 2** – Distribuição dos genótipos para a variante R51Q do gene *GHRL* para obesos e controles

Os dois *SNPs* estudados estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg, conforme apresentado na **tabela 3**, logo abaixo.

**Tabela 3** - Valores de P para o teste do  $\chi^2$  para o equilíbrio de Hardy-Weinberg

SNPs	CONTROLES		OBESOS	
	$\chi^2$	P	$\chi^2$	p
L72M	1,57	0,45	0,09	0,95
R51Q	0,97	0,04	0,99	0,07

Os resultados obtidos referentes às frequências genotípicas e alélicas para a variante L72M do gene *GHRL* estão dispostos na **tabela 4**.

**Tabela 4** – Frequências Genotípicas e Alélicas para o *SNP* L72M obesos e controles

Genótipo	CONTROLES (n=131)		OBESOS (n=47)	
	N	% ± EP	N	% ± EP
LL	100	76,33 ± 3,71	43	91,49 ± 4,07
LM + MM	31	23,66 ± 3,71	4	8,51 ± 4,07
Alelos	N	% ± EP	N	% ± EP
L	227	86,64 ± 2,1	90	95,74 ± 2,1
M	35	13,36 ± 2,1	4	4,26 ± 2,1

\*Controles x Obesos: Fischer (p= 0,01)

Em relação à variante R51Q do gene *GHLR*, os valores das frequências genotípicas e alélicas estão dispostos na **tabela 5**.

**Tabela 5** – Frequências Genotípicas e Alélicas para o *SNP* R51Q para obesos e controles

Genótipo	CONTROLES (n=94)		OBESOS (n= 38)	
	N	% ± EP	N	% ± EP
QQ	0	0	0	0
RR + RQ	94	100,00 ± 0,00	38	100,00 ± 0,00
Alelo	N	% ± EP	N	% ± EP
R	184	97,87 ± 1,05	75	98,68 ± 1,3
Q	4	2,13 ± 1,05	1	1,32 ± 1,3

\* Controles x Obesos: Fischer (p=1,0)

Devido ao *n* amostral reduzido, os dados estavam sujeitos a desvios que poderiam não expressar os reais resultados. Sendo assim, qualquer erro de amostragem, genotipagem, e outros efeitos interferentes que pudessem fornecer resultados falso-positivos foram corrigidos através do uso de técnicas mais precisas como o PCR Tempo Real.

Nos 178 indivíduos estudados no presente estudo para o *SNP* L72M (131 controles e 47 obesos) houve diferenças significativas entre as frequências alélicas, quando se compararam obesos e controles (**tabela 4**) utilizando-se o Teste Exato de Fisher (P=0,0127).

Os resultados desse estudo contrariam os estudos de UKKOLA *et al.*(2001). No presente estudo as frequências genotípicas entre os controles são significativamente diferentes das frequências encontradas por UKKOLA *et al.* (2001), (Teste Exato de Fisher, p= 0,0242). Apesar de não ter sido encontrada diferença significativa nas frequências genotípicas entre os obesos do nosso estudo e o de UKKOLA *et al.* (2001), (Teste Exato de Fisher, p= 0,1813), encontramos uma maior frequência do alelo 72M nos controles e não nos obesos, demonstrando a importância do estudo de associação do *SNP* L72M com a obesidade em adolescentes (**Tabela 6**).

HINNEY *et al.* (2002) e DANTAS, (2008) não encontraram associação entre o *SNP* L72M e a obesidade, porém no estudo de DANTAS (2008) percebe-se uma

tendência para associação, semelhante ao trabalho de UKKOLA *et al.* (2001), no qual a associação seria em relação a maior frequência do alelo 72M em obesos e não em controles como o encontrado no nosso estudo.

**Tabela 6** – Dados de frequência genotípica de Ukkola *et al.* (2001)

	SNP R51Q		SNP L72M	
	51RR % ± EP	51RQ + 51QQ % ± EP	72LL % ± EP	72LM + 72MM % ± EP
<b>CONTROLES</b>				
Ukkola et al.(2001)	100,00 ± 0,00 (N=96)	0,00 ± 0,00 (N=0)	87,50 ± 3,38 (N=84)	12,50 ± 3,38 (N=12)
<b>OBESOS</b>				
Ukkola et al. (2001)	93,75 ± 2,47 (N=90)	6,25 ± 2,47 (N=6)	84,38 ± 3,71 (N=81)	15,63 ± 3,71 (N=15)

Nos 132 doadores de sangue analisados no presente estudo para o *SNP* R51Q (94 controles e 38 obesos), foram encontrados 5 (cinco) heterozigotos para o alelo 51Q (quatro controles e um obeso), não ocorrendo diferenças significativas entre as frequências alélicas, quando se compararam obesos e controles (tabela 5) (Teste exato de Fisher,  $p= 1,0$ ).

Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre o presente estudo e o de UKKOLA *et al.* (2001), quando se compararam as frequências genotípicas dos controles (Teste Exato de Fisher,  $p= 0,0580$ ) e obesos (Teste Exato de Fisher,  $p= 0,3592$ ).

O estudo de DANTAS (2008) não encontrou diferenças significativas entre as frequências genotípicas e alélicas, quando comparou obesos e controles para as variantes L72M e R51Q.

Em alguns estudos, a variante L72M não pareceu predispor à obesidade, mas foi associada com idade mais precoce para o início da obesidade (UKKOLA *et al.*, 2001;. KORBONITS *et al.*, 2002;. MIRAGLIA *et al.*, 2004.; VIVENZA *et al.*, 2004).



De acordo com KOJIMA e KANGAWA (2005) e UKKOLA *et. al.* (2001), apesar de a variação L72M não estar presente na região codificadora da proteína grelina, o alelo mutante 72M induz a obesidade mais precoce.

No presente estudo, apesar de não estar entre os objetivos do estudo, não foi encontrada associação entre a presença do alelo mutante 72M e a idade dos obesos. Contrariando este dado, no presente estudo o genótipo 72MM foi observado somente nos adolescentes não obesos utilizados como controles sendo levantada a hipótese de um efeito protetor do alelo 72M contra a obesidade.

É possível que, com um *n* amostral maior, pudesse ser obtida diferença entre as médias de idade dos grupos.

Uma limitação evidente deste estudo é o número de amostras relativamente baixo nos grupos estudados. Um dos motivos para o baixo *n* amostral no grupo de obesos foi a evasão dos alunos durante o programa além dos problemas enfrentados no ano de 2009 com a Gripe Influenza A H1N1, que provocou o atraso no início das aulas e conseqüentemente na coleta de material.

No entanto, embora o *n* amostral seja relativamente pequeno para um estudo de associação genética, os resultados são reforçados por pelo menos dois fatores. Em primeiro lugar, todos os indivíduos foram da mesma localidade, em segundo lugar, os controles foram selecionados para excluir quaisquer fatores que pudessem causar alteração nos resultados.

Estudos anteriores explorando a freqüência dos polimorfismos do gene da grelina em populações de obesos apresentaram resultados conflitantes onde não foram encontradas associações significativas de ambas as variantes do gene da grelina (Arg51Gln e Leu72Met) com obesidade ou uma associação sugestiva do genótipo Leu72Met com uma idade mais precoce para início da mesma (HINNEY *et al.*, 2002; UKKOLA *et al.*, 2001; VIVENZA *et al.*, 2004; KORBONITS *et al.*, 2002; MIRAGLIA *et al.*, 2004).

No trabalho de UKKOLA *et al.* (2001), a variante L72M do gene da grelina foi detectada em 15.6% dos obesos (heterozigoto 12,5% e 3,1% homozigotos) e 12,5% (todos os heterozigotos) no grupo controle não-obesos. Este polimorfismo tem sido associado com um início mais precoce da obesidade.

A variante R51Q do gene da grelina foi encontrada em seis obesos (todos os heterozigotos), mas não foi encontrado nos controles não-obesos (UKKOLA *et al.*, 2001).

Estudos com o gene da grelina em obesos e crianças francesas encontraram uma correlação positiva entre a variante heterozigota L72M e um maior Índice de Massa Corporal (IMC) e início da obesidade (KORBONITS *et al.*, 2002).

No estudo de MIRAGLIA *et al.* (2004), foi observada uma associação similar significativa entre o polimorfismo L72M e obesidade precoce em crianças italianas. Nesse estudo foram analisados os polimorfismos do gene da grelina em 300 crianças e adolescentes italianos obesos e 200 controles. Para ambas as variantes (Arg51Gln e Leu72Met), as freqüências alélicas foram semelhantes entre pacientes e controles. Demonstraram que o polimorfismo L72M estava associado com diferenças na idade de início da obesidade.

LESKELA *et al.* (2009), sugere que portadores do alelo L72 são mais propensos à variabilidade de peso em resposta a fatores ambientais, dada a reduzida freqüência de polimorfismo L72M em gêmeos monozigóticos discordantes para a obesidade. No estudo, o alelo L72 foi particularmente comum entre gêmeos monozigóticos discordantes para a obesidade, sugerindo que este alelo do gene da grelina é mais permissivo na regulação do balanço energético.

O gene da grelina poderia, portanto, desempenhar um papel importante na variabilidade do peso corporal, de tal forma que os portadores do alelo L72 seriam mais propensos à variação de peso corporal em resposta a fatores ambientais.

As variáveis antropométricas e clínicas dos adolescentes submetidos ao programa de exercícios do Núcleo de Pesquisa em Qualidade de Vida do departamento de Educação Física da Universidade Federal do Paraná estão divididas em pré e pós e programa de exercícios (**tabelas 7 e 8**).

Abaixo está representado um quadro com os valores de referência para os parâmetros analisados.

Valores de Referência	
<b>Colesterol total (mg/dL)</b>	Menor que 170 mg/dL
<b>Colesterol LDL (mg/dL)*</b>	Menor que 130 mg/dL
<b>Colesterol HDL (mg/dL)*</b>	Maior ou igual a 45 mg/dL
<b>Triglicérides (mg/dL)*</b>	Menor ou igual a 130 mg/dL
<b>Glicemia em jejum (mg/dL)*</b>	Menor que 100 mg/dL
<b>RCE (Razão Cintura Estatura)</b>	Menor que 0,50
Fonte: Sociedade Brasileira de Cardiologia.	

**Tabela 7** - Variáveis antropométricas e clínicas em adolescentes obesos /pré programa de exercícios

	<b>Genótipo LL</b>	<b>Genótipo LM</b>
<b>Colesterol Total</b>	166,11 ± 5,91	154,00 ± 9,61
<b>LDL</b>	88,92 ± 4,73	85,60 ± 8,20
<b>HDL</b>	44,63 ± 1,26	42,00 ± 2,65
<b>Triglicérides</b>	132,0 ± 12,63	132,00 ± 29,14
<b>Glicemia</b>	85,27 ± 1,16	79,67 ± 2,61
<b>RCE</b>	0,626 ± 0,010	0,623 ± 0,023
<b>TMR</b>	1663,41 ± 34,21	1567,5 ± 198,01

N: TMR LL=41 e LM=4; RCE, Glicemia, Triglicérides, HDL, LDL e Colesterol Total LL=35 e LM=4

**Tabela 8** - Variáveis antropométricas e clínicas em adolescentes obesos /pós programa de exercícios

	<b>Genótipo LL</b>	<b>Genótipo LM</b>
<b>Colesterol Total</b>	158,50 ± 7,61	135
<b>LDL</b>	93,23 ± 6,20	77
<b>HDL</b>	47,43 ± 2,78	41
<b>Triglicérides</b>	86,86 ± 9,01	85
<b>Glicemia</b>	88,14 ± 1,58	80
<b>RCE</b>	0,610 ± 0,014	0,584
<b>TMR</b>	1616,34 ± 29,99	1625,00 ± 170,37

N: TMR LL=41 e LM=4; RCE LL=13 e LM=01; Glicemia, Triglicérides, HDL, LDL e Colesterol Total LL=14 e LM=01

Os valores de triglicérides referentes aos obesos em pré programa de exercícios estão aumentados e os valores de colesterol total, embora não estejam aumentados, encontram-se na faixa limítrofe. Para os obesos pós programa de exercícios, esses dados diferem razoavelmente, com os valores de triglicérides e colesterol total apresentando-se mais baixos.

Os valores médios de colesterol HDL estão abaixo dos valores recomendados e a razão cintura/estatura foi obtida pelo quociente do perímetro da cintura pela estatura em centímetros (HO *et al.*, 2003).

Todos os adolescentes obesos estão incluídos no percentil 95 de IMC e a média da razão cintura estatura é superior a 0,50. De acordo com o estudo de ASHWELL e GIBSON (2009) indivíduos apresentando RCE acima de 0,50 cm são classificados como risco à saúde.

O gasto energético diário pode ser dividido em três componentes: TMR (taxa metabólica de repouso), efeito térmico do alimento e gasto energético associado com a atividade física (HILL *et al.*, 1995).

Não há evidências de que os indivíduos obesos apresentem taxa metabólica basal de repouso diminuída. Além disso, alguns estudos mostraram que o aumento da massa corporal total até eleva a taxa do metabolismo basal para retardar ganho de peso excessivo. Logo, um indivíduo obeso possui TMB mais elevada do que indivíduo magro da mesma altura. Essa observação sugere que existe mecanismo de manutenção do peso corporal e suporta a teoria de que o comportamento não é o único determinante da obesidade (ROMERO & ZANESCO, 2006).

No presente estudo foram avaliadas TMR de 45 indivíduos antes e após a realização do programa de exercícios. Os indivíduos com os dados de TMR completos (pré e pós) foram cruzados com os seus respectivos genótipos.

Na comparação dos valores de TMR antes para os genótipos 72LL X 72LM, utilizando-se o teste de Mann-Whitney, não há diferença na distribuição dos valores ( $p=0,795$ ). Isto quer dizer, que a distribuição de TMR entre os dois genótipos não difere estatisticamente, ou seja, um dos genótipos não apresenta maior frequência de indivíduos com maior ou menor TMR. A distribuição do TMR não difere entre os portadores dos dois genótipos. O mesmo acontece com TMR depois ( $p=0,826$ ).

Dos 45 indivíduos com os dados completos (TMR pré e pós e genotipagem para o *SNP* L72M), 41 apresentaram genótipo 72LL e apenas quatro 72LM. Apesar de haver um aumento na TMR para obesos 72LM, esse aumento não foi significativo ( $p=0,79$ ), principalmente devido ao baixo  $n$  de indivíduos obesos com o genótipo 72LM ( $n=4$ ) (Tabelas 9 e 10).

Pode-se sugerir um efeito protetor do alelo 72M contra a obesidade, o que justificaria o aumento na taxa metabólica de repouso. O fato desse aumento não ter sido significativo deve-se ao  $n$  amostral reduzido.

**Tabela 9** - Comparação entre TMR pré programa de exercícios - genótipos LL e LM em obesos

Mann-Whitney U Test							
	Z	p-level	n LL	n LM	LL	LM	U
TMR pré	0,2594	0,7995	41	4	1663,415	1567,5	75,5

**Tabela 10** - Comparação entre TMR pós programa de exercícios- genótipos LL e LM em obesos

Mann-Whitney U Test							
	Z	p-level	n LL	n LM	LL	LM	U
TMR pós	0,2195	0,826	41	4	1616,341	1625	76,5

O teste T para amostras dependentes foi usado por avaliar a mesma amostra, antes e depois. Há diferença significativa em indivíduos com o genótipo 72LL em relação à TMR antes e depois ( $p=0,01$ ).

Nos indivíduos com genótipo 72LM isso não ocorre ( $p=0,16$ ), uma das hipóteses seria novamente o efeito protetor do alelo 72M contra a obesidade, sendo

que os portadores do genótipo 72LL apresentariam maior resistência para a perda de peso. Um estudo com um *n* amostral maior poderia corroborar com essa hipótese.

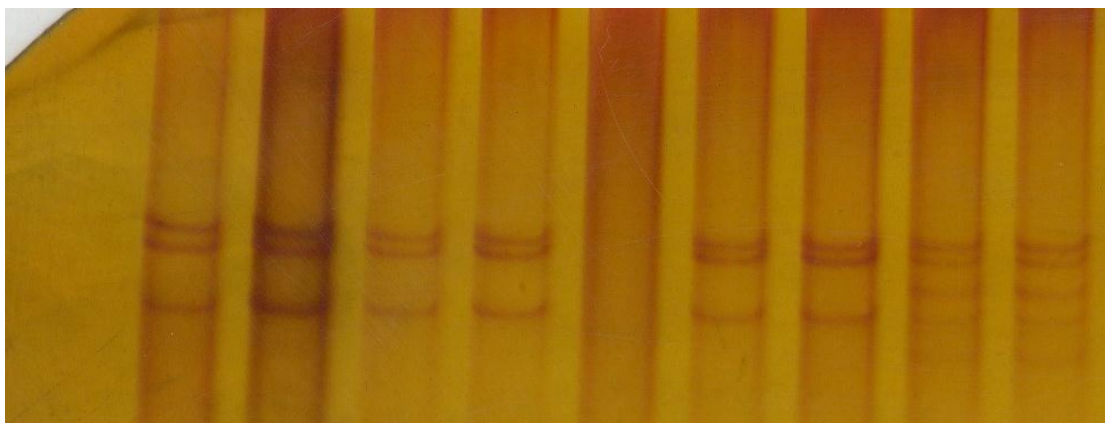
Segundo Paulo Gentil, presidente do Gease (Grupo de Estudos Avançados em Saúde e Exercícios), muitas pesquisas associam o treinamento aeróbio a uma diminuição do metabolismo basal (quantidade de calorias que seu corpo consome em repouso), mesmo sem perda na massa muscular. O emagrecimento brusco também poderia gerar queda no metabolismo, pois o corpo se adaptaria para tentar retornar ao peso anterior.

A conclusão ainda é controversa, mas há grande número de evidências que indicam que o exercício mais intenso é o que possua maior efeito na manutenção e até no aumento da taxa metabólica de repouso quando acompanhado de perda de peso (disponível em <http://www.gease.pro.br/>).

DAMASO *et al.* (2006), demonstraram que a maioria das adolescentes obesas, ingressantes no programa multidisciplinar para o tratamento da obesidade, apresentou hiperleptinemia exacerbada. Isso poderia sugerir o papel relevante do hormônio leptina na menor termogênese e redução da TMR desses pacientes.

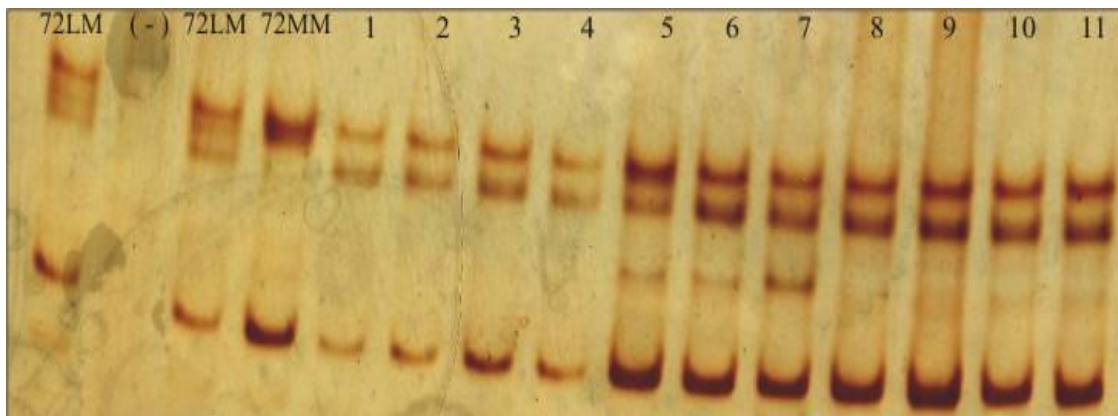
Essas alterações sugerem a necessidade de estratégias em longo prazo para o estabelecimento da ação da leptina, podendo este ser um fator contribuinte para os resultados discrepantes relativos à TMR de obesos e não obesos.

Durante a realização da pesquisa, inicialmente foi utilizada a técnica de PCR SSCA. A técnica mostrou-se eficaz na genotipagem dos indivíduos em relação ao *SNP* R51Q (**Figura 1**).



**Figura 1** - Gel de poliacrilamida 29:1, 10% descontínuo. Genótipos quanto ao *SNP* R51Q do gene *GHRL*: 1 – 4: 51AA; 5(-); 6 e 7: 51AA; 8 e 9: 51AQ.

Porém, para o *SNP* L72M, a técnica PCR SSCA permitiu resultados dúbios principalmente em relação à mutação 72MM (Figura 2).

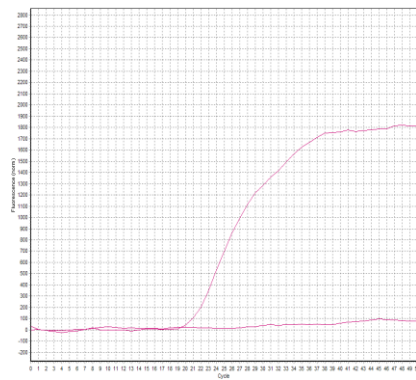
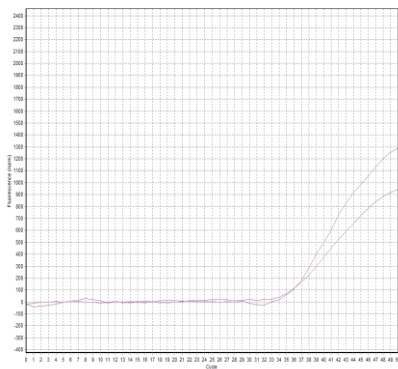
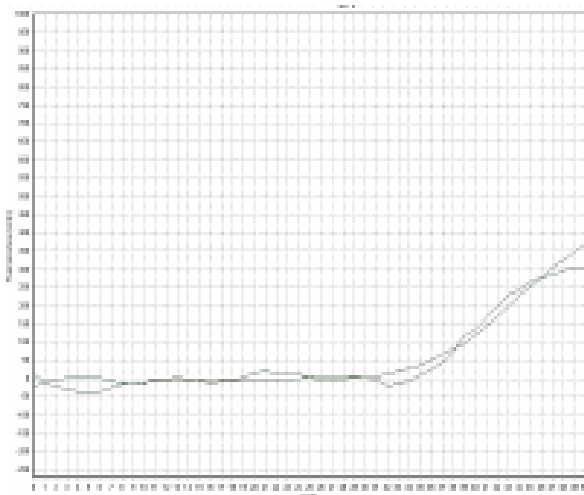
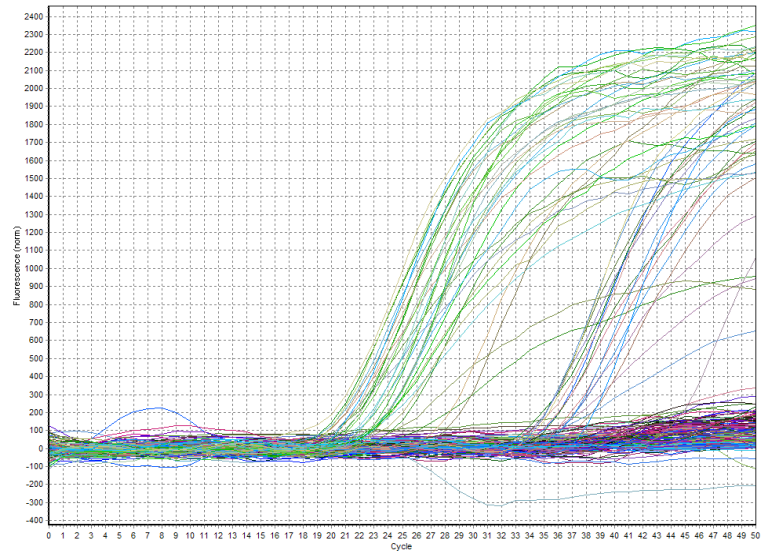


**Figura 2** - Gel de poliacrilamida 29:1, 8% contínuo. Genótipos quanto ao gene *SNP* L72M do gene *GHRL*. 72LL: 1 – 11.

Para confirmação dos resultados, foram comprados os *primers* para PCR Tempo Real com TaqMan e realizado a genotipagem de todas as 131 amostras de controles e de 38 obesos.

Além disso, com a maior sensibilidade e precisão da técnica de PCR Tempo Real, foi possível analisarmos além das 38 amostras de obesos, provenientes de sangue total, outras 09 (nove) amostras de obesos provenientes de plasma, cuja concentração de DNA se encontrava reduzida não sendo útil, portanto, a utilização da técnica de PCR SSCA para a genotipagem das mesmas.

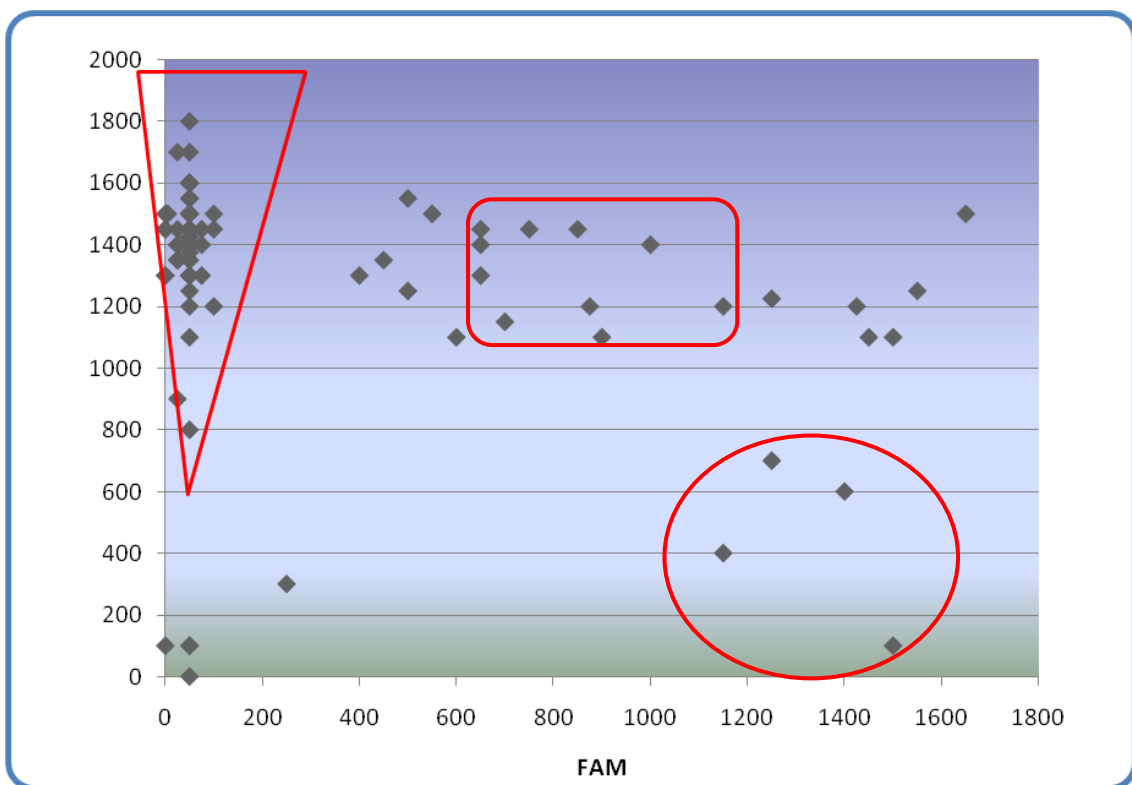
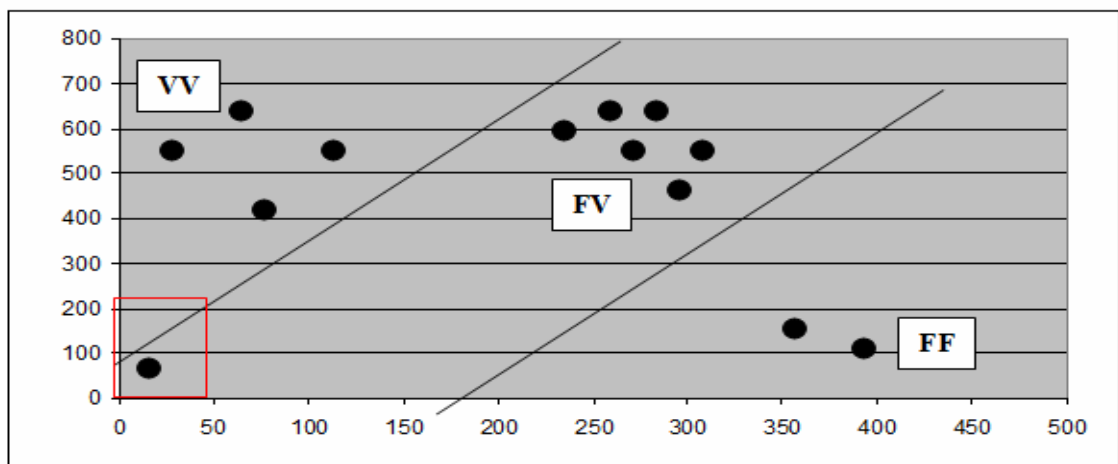
Na **figura 3** estão representados exemplos de picos das curvas geradas pela técnica de PCR Tempo Real e a plotagem dos gráficos apresenta-se na **figura 4**.



**Figura 3** - Padrão de curvas do programa Realplex para as duas sondas. O gráfico maior indica um exemplo de leitura padrão para SNPs em Tempo real. Os gráficos menores indicam respectivamente de cima para baixo um (FV) heterozigoto, um (FF) mutado e um (VV) homozigoto usual.



↑ FAM	FF	Homozigoto mutado
↑ VIC	VV	Homozigoto usual
↑ FAN ↑ VIC	FV	Heterozigoto



**Figura 4** - Exemplos de resultado gráfico da Genotipagem em Tempo Real. O gráfico superior demonstra o padrão ideal da distribuição das amostras com heterozigotas na região central, homozigoto usual no canto superior esquerdo e o homozigoto mutado no canto inferior direito. O gráfico inferior representa resultado obtido com a técnica para o *SNP* L72M: triângulo para VV (72LL); retângulo para FV (72LM) e circunferência para FF (72MM).

## 5.7 CONCLUSÕES

Nos 178 indivíduos estudados no presente estudo para o *SNP* L72M (131 controles e 47 obesos) houve diferenças significativas entre as frequências alélicas, quando se compararam obesos e controles utilizando-se o Teste Exato de Fisher ( $P=0,0127$ ), mostrando a relevância do *SNP* no estudo de associação com a obesidade em adolescentes.

Nos 132 doadores de sangue analisados no presente estudo para o *SNP* R51Q (94 controles e 38 obesos), foram encontrados 5 (cinco) heterozigotos para o alelo 51Q (quatro controles e um obeso), não ocorrendo diferenças significativas entre as frequências alélicas, quando se compararam obesos e controles (Teste exato de Fisher,  $p= 1,0$ ).

Apesar de haver aumento na TMR para obesos 72LM, esse aumento não foi significativo ( $p=0,16$ ) principalmente devido ao baixo  $n$  de indivíduos obesos com o genótipo 72LM sugerindo-se efeito protetor do alelo 72M contra a obesidade, o que justificaria o aumento na taxa metabólica de repouso. Os portadores do genótipo 72LL apresentaram maior resistência para a perda de peso. Um estudo com um  $n$  amostral maior poderia corroborar com essa hipótese.

Houve diferença significativa em indivíduos com o genótipo 72LL em relação à TMR antes e depois ( $p=0,01$ ), porém no sentido de diminuição da TMR pós exercícios, o que evidencia mais uma vez o provável efeito protetor do alelo 72M contra a obesidade.

Os dados do presente estudo reforçam as evidências de que os estudos de associação representam importante ferramenta na identificação de variantes genéticas que influenciam a susceptibilidade às doenças complexas.

## 5.8 REFERÊNCIAS

ASHWELL, M.; GIBSON, S. Waist to Height Ratio Is a Simple and Effective Obesity Screening Tool for Cardiovascular Risk Factors: Analysis of Data from the British National Diet and Nutrition Survey of Adults Aged 19-64 Years. v.2: p.97-103. **Obes Facts**, 2009.

CUMMINGS, D.E.; PURNELL, J.Q.; FRAYO, R.S.; SCHMIDOVA, K.; WISSE, B.E.; WEIGLE, D.S. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. **Diabetes (New York)**, v. 50: p. 1714–1719, 2001.

DAMASO A.R., TOCK L., TUFIK S., PRADO W.L., STELLA S.G., FISBERG M. Tratamento multidisciplinar reduz o tecido adiposo visceral, leptina, grelina e a prevalência de esteatose hepática não alcoólica (NAFLD) em adolescentes obesos. **Rev Bras Med Esporte**. 2006; 12(5):263-7.

DANTAS, V. G. L. Estudo de associação de variações dos genes *BCHE* (butirilcolinesterase) e *GHRL* (grelina) com obesidade. **Dissertação de mestrado**. Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2008.

Disponível em <<http://www.gease.pro.br/>> acessado em 08/02/2011.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. **I Diretriz de Prevenção da Aterosclerose na Infância e Adolescência**. Arquivos Brasileiros de Cardiologia. v. 85, p.1-36, 2005.

HANSEN, T.K.; DALL, R.; HOSODA, H.; KOJIMA, M.; KANGAWA, K.; CHRISTIANSEN, J.S.; JORGENSEN, J.O. Weight loss increases circulating levels of ghrelin in human obesity. **Clin. Endocrinol.**, Oxford, v. 56: p. 203–206, 2002.

HILL J.A., MELBY C., JOHNSON S.L., PETERS I.C. Physical activity and energy requirements. **Am J Clin Nutr**. 1995;62(s):1059-66.

HINNEY, A.; HOCH, A.; GELLER, F.; SCHÄFER, H.; SIEGFRIED, W.; GOLDSCHMIDT, H.; REMSCHMIDT, H.; HEBEBRAND, J. Ghrelin gene: identification of missense variants and a frameshift mutation in extremely obese children and adolescents and healthy normal weight students. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Baltimore, v. 87(6): p. 2716–2719, 2002.

HO SY, LAM TH, JANUS ED. Waist to stature ratio is more strongly associated with cardiovascular risk factors than other simple anthropometric indices. **Ann Epidemiol**. V.13(10): p.683-91, 2003.

KOJIMA, M.; KANGAWA, K. Ghrelin: structure and function. **Phisio. Rev.**, New York, v. 85, p. 495-522, 2005.

KORBONITS, M.; GUEORGUIEV, M.; O'GRADY, E.; LECOEUR, C.; SWAN, D.C.; MEIN, C.A.; WEILL, J.; GROSSMAN, A.B. e FROGUEL, P.A variation in the ghrelin gene increases

weight and decreases insulin secretion in tall, obese children. **J. Clin. Endocr. Metab.**, v. 87, p. 4005-4008, 2002.

LESKELÄ P.; UKKOLA O.; VARTIAINEN J.; RÖNNEMAA T.; KAPRIO J.; BOUCHARD C.; KESÄNIEMI Y.A. Fasting plasma total ghrelin concentrations in monozygotic twins discordant for obesity. **Metabolism**. Feb;58(2):174-9, 2009

MAES, H.H.; NEALE, M.C.; EAVES, L.J. Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity. **Behav. Genet.**, v. 27, p. 325-351, 1997.

MIRAGLIA DEL GIUDICE E, SANTORO N, CIRILLO G, RAIMONDO P, GRANDONE A, D'ANIELLO A. Molecular screening of the ghrelin gene in Italian obese children: the Leu72Met variant is associated with an earlier onset of obesity. **Int J Obes** 28:447-450, 2004.

ROMERO, C. E. M.; ZANESCO, A. O papel dos hormônios leptina e grelina na gênese da obesidade. **Rev. Nutr.** vol.19, n.1, pp. 85-91, 2006.

SMITH, R.G.; van der PLOEG, L.H.; HOWARD, A.D.; FEIGHNER, S.D.; CHENG, K.; HICKEY, G.J.; WYVRATT, M.J.Jr; FISHER, M.H.; NAUNS, R.P.; PATCHETT, A.A.; PeptidomiMic regulation of growth hormone secretion. **Endocr. Rev.**, Baltimore, v. 18, p. 621-645, 1997.

STATSOFT, Inc. **Statistica for Windows** (Computer program manual). Tulsa,1996. 1cd.

STYLIANOU C.; GALLI-TSINOPOULOU A.; FARMAKIOTIS D.; ROUSSO I.; KARAMOUZIS M.; KOLIAKOS G.; NOUSIA-ARVANITAKIS S. Ghrelin and leptin levels in obese adolescents. Relationship with body fat and insulin resistance. **Hormones (Athens)**. Oct-Dec;6(4):295-303, 2007

TANAKA, M.; HAYASHIDA, Y.; IGUCHI, T.; AKAN, N.; NAKAI, N.; NAKASHIMA, K. Organization of the mouse ghrelin gene and promoter: occurrence of a short noncoding first exon. **Endocrinology**, Baltimore, v. 124, p. 3697-3700, 2001.

UKKOLA, O.; RAVUSSIN, E.; JACOBSON, P.; SNYDER, E.E.; CHAGNON, M.; SJÖSTRÖN, L.; BOUCHARD, C.; Mutations in the Preproghrelin / ghrelin gene associated with obesity in human. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Baltimore, v. 86, n.8, p. 3996-3999, 2001.

VALONES M. A. A. et al. Principles and Applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.40, p. 1-11, 2009

VIVENZA D.; RAPA A.; CASTELLINO N.; BELLONE S.; PETRI A.; VACCA G.; AIMARETTI G.; BROGLIO F.; BONA G. Ghrelin gene polymorphisms and ghrelin, insulin, IGF-I, leptin and anthropometric data in children and adolescents. **Eur J Endocrinol**. 151:127-133, 2004

WADE, T.D.; BULIK, C.M.; HEATH, A.C.; MARTIN, N.G.; e EAVES, L.J. The Influence of Genetic and Environmental Factors in Estimations of Current Body Size, Desired Body Size, and Body Dissatisfaction. **Twin Res.**, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Diet, Nutrition And The Prevention Of Chronic Diseases. WHO.** Technical Reports Series n. 916. World Health Organization Expert Committee, Geneva, 2003.

## 5.9 CONCLUSÃO

Nos 178 indivíduos estudados no presente estudo para o *SNP* L72M (131 controles e 47 obesos) houve diferenças significativas entre as freqüências alélicas, quando se compararam obesos e controles utilizando-se o Teste Exato de Fisher ( $P=0,0127$ ), mostrando a relevância do *SNP* no estudo de associação com a obesidade em adolescentes.

Nos 132 doadores de sangue analisados no presente estudo para o *SNP* R51Q (94 controles e 38 obesos), foram encontrados 5 (cinco) heterozigotos para o alelo 51Q (quatro controles e um obeso), não ocorrendo diferenças significativas entre as freqüências alélicas, quando se compararam obesos e controles (Teste exato de Fisher,  $p= 1,0$ ).

Apesar de haver aumento na TMR para obesos 72LM, esse aumento não foi significativo ( $p=0,16$ ) principalmente devido ao baixo  $n$  de indivíduos obesos com o genótipo 72LM sugerindo-se efeito protetor do alelo 72M contra a obesidade, o que justificaria o aumento na taxa metabólica de repouso. Os portadores do genótipo 72LL apresentaram maior resistência para a perda de peso. Um estudo com um  $n$  amostral maior poderia corroborar com essa hipótese.

Houve diferença significativa em indivíduos com o genótipo 72LL em relação à TMR antes e depois ( $p=0,01$ ), porém no sentido de diminuição da TMR pós exercícios, o que evidencia mais uma vez o provável efeito protetor do alelo 72M contra a obesidade.

Os dados do presente estudo reforçam as evidências de que os estudos de associação representam importante ferramenta na identificação de variantes genéticas que influenciam a susceptibilidade às doenças complexas.

## 6 REFERÊNCIAS

AETSINGER, L.S.; CARTER-SU, C.; Mechanism of signaling by growth hormone receptor. **Physio. Rev.**, Baltimore, v. 76, p. 1089-1107, 1996.

ARPAGAU, M.; KOTT, M.; VATSIS, K.P.; BARTELS, C.F.; LA DU, B.N.; LOCKRIDGE, O. Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy. **Biochemistry (Washington)**, v. 29, p. 124-131, 1990.

ARVAT, E.; DI VITO, L.; BROGLIO, F.; PAPOTTI, M.; MUCCIOLI, G.; DIEGUEZ, C.; CASANUEVA, F.F.; DEGHENGI, R.; CAMANNI, F.; GHIGO, E. Preliminary evidence that Ghrelin, the natural GH secretagogue (GHS)-receptor ligand, strongly stimulates GH secretion in humans. **J. Endocrinol. Invest.**, Milano, v. 23: p. 493– 495, 2000.

ARVAT, E.; MACCARIO, M.; DI VITO, L.; BROGLIO, F.; BENSO, A.; GOTTERO, C.; PAPOTTI, M.; MUCCIOLI, G.; DIEGUEZ, C.; CASANUEVA, F.F.; DEGHENGI, R.; CAMANNI, F.; GHIGO, E. Endocrine activities of ghrelin, a natural growth hormone secretagogue (GHS), in humans: comparison and interactions with hexarelin, a nonnatural peptidyl GHS, and GH-releasing hormone. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Baltimore, v. 86: p. 1169–1174, 2001.

ASAKAWA A., INUI A.; KAGA T.; YUZURIHA H.; NAGATA T.; UENO N. Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. **Gastroenterology**. 120:337-345, 2001

ASAKAWA A., INUI A.; FUJIMIYA M.; SAKAMAKI R.; SHINFUKU N.; UETA Y. Stomach regulates energy balance via acylated ghrelin and desacyl ghrelin. **Gut**. 54:18-24, 2005.

ASHWELL, M.; GIBSON, S. Waist to Height Ratio Is a Simple and Effective Obesity Screening Tool for Cardiovascular Risk Factors: Analysis of Data from the British National Diet and Nutrition Survey of Adults Aged 19-64 Years. v.2: p.97-103. **Obes Facts**, 2009.

BALDANZI, G.; FILIGHEDDU, N.; CUTRUPI, S.; CATAPANO, F.; BONISSONI, S.; FUBINI, A.; MALAN, D.; BAJ, G.; GRANATA, R.; BROGLIO, F.; PAPOTTI, M.; SURICO, N.; BUSSOLINO, F.; ISGAARD, J.; DEGHENGI, R.; SINIGAGLIA, F.; PRAT, M.; MUCCIOLI, G.; GHIGO, E.; GRAZIANI, A.; Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT. **J. Cell. Biol.**, New York, v. 159: p. 1029–1037, 2002.

BEAUMONT, N.J.; SKINNER, V.O.; TAN, T.M.; RAMESH, B.S.; BYRNE, D.J.; MACCOLL, G.S.; KEEN, J.N.; BOULOUX, P.M.; MIKHAILIDIS, D.P.; BRUCKDORFER, K.R.; VANDERPUMP, M.P.; SRAI, K.S. Ghrelin can bind to a species of high density lipoprotein associated with paraoxonase. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 278: p. 8877–8880, 2003.

BEDNAREK, M.A.; FEIGHNER, S.D.; PONG, S.S.; MCKEE, K.K.; HRENIUK, D.L.; SILVA, M.V.; WARREN, V.A.; HOWARD, A.D.; VAN DER PLOEG, L.H.; HECK, J.V. Structure-function studies on the new growth hormone releasing peptide, ghrelin: minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a. **J. Med. Chem.**, Washington, v. 43: p. 4370–4376, 2000.

BELLONE S.; CASTELLINO N.; BROGLIO F.; RAPA A.; VIVENZA D.; RADETTI G.; BELLONE J.; GOTTERO C.; GHIGO E.; BONA G. Ghrelin secretion in childhood is refractory to the inhibitory effect of feeding. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 89(4):1662-1665, 2004.

BENNETT, P.A.; THOMAS, G.B.; HOWARD, A.D.; FEIGHNER, S.D.; van der PLOEG, L.H.; SMITH, R.G.; ROBINSON, I.C. Hypothalamic growth-hormone secretagogue-receptor (GHS-R) expression is regulated by growth hormone in therat. **Endocrinology**, Baltimore, v. 138, p. 4552-4557, 1997.

BOWERS, C.Y.; MOMANY, F.; REYNOLDS, G.A.; CHANG, D.; HONG, A.; CHANG, K. Structure-activity relationships of a synthetic pentapeptide that specifically releases growth hormone in vitro. **Endocrinology**, Baltimore, v. 106, p. 663–667, 1980.

BUDOWLE, B.; CHKRABORTY. R.; GIUSTI, A. M. EISENBERG, A. J.; ALLEN, R. C. Analysis of the VNTR locus DIS80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. **Am. J. Hum. Genet.**, Chicago, v. 48, p. 137-144, 1991.

CALLAHAN, H.S.; CUMMINGS, D.E.; PEPE, M.S.; BREEN, P.A.; MATTHYS, C.C.; WEIGLE, D.S. Postprandial suppression of plasma ghrelin level is proportional to ingested caloric load but does not predict intermeal interval in humans. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Baltimore, v. 89: p. 1319–1324, 2004.

CAMILLERI M.; PAPATHANASOPOULOS A.; ODUNSI S.T. Actions and therapeutic pathways of ghrelin for gastrointestinal disorders. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 6(6):343-352, 2009.

CASSONI, P.; GHE, C.; MARROCCO, T.; TARABRA, E.; ALLIA, E.; CATAPANO, F.; DEGHENGI, R.; GHIGO, E.; PAPOTTI, M.; MUCCIOLI, G. Expression of ghrelin and biological activity of specific receptors for ghrelin and des-acyl ghrelin in human prostate neoplasms and related cell lines. **Eur. J. Endocrinol.** Oslo, v. 150: p. 173–184, 2004.

CDC, CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION). **CDC Growth Charts: United States**: n.314, 2000.

CHEN C.Y.; FUJIMIYA M.; LEE S.D.; INUI A. Ghrelin gene products in food intake and gut motility. **Pharmacol. Rev.** 61:430-481, 2009a.

CHEN C.Y.; FUJIMIYA M.; ASAKAWA A.; CHANG F.Y., CHENG J.T.; LEE S.D. At the cutting edge: ghrelin gene products in food intake and gut motility. **Neuroendocrinology.** 89(1):9-17, 2009b.



COWLEY, M.A.; SMITH, R.G.; DIANO, S.; TSCHOP, M.; PRONCHUK, N.; GROVE, K.L.; STRASBURGER, C.J.; BIDLINGMAIER, M.; ESTERMAN, M.; HEIMAN, M.L.; GARCIA-SEGURA, L.M.; NILLNI, E.A.; MENDEZ, P.; LOW, M.J.; SOTONYI, P.; FRIEDMAN, J.M.; LIU, H.; PINTO, S.; COLMERS, W.F.; CONE, R.D.; HORVATH, T.L. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. **Neuron.**, Cambridge, v.37: p. 649–661, 2003.

CUMMINGS, D.E.; PURNELL, J.Q.; FRAYO, R.S.; SCHMIDOVA, K.; WISSE, B.E.; WEIGLE, D.S. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. **Diabetes (New York)**, v. 50: p. 1714–1719, 2001.

CUMMINGS, D.E.; FRAYO, R.S.; MARMONIER, C.; AUBERT, R.; CHAPELOT, D. Plasma ghrelin levels and hunger scores in humans initiating meals voluntarily without time- and food-related cues. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, Bethesda, v. 287: p. E297–E304, 2004.

DANTAS, V. G. L. Estudo de associação de variações dos genes *BCHE* (butirilcolinesterase) e *GHRL* (grelina) com obesidade. **Dissertação de mestrado**. Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2008.

DATE, Y.; KOJIMA, M.; HOSODA, H.; SAWAGUCHI, A.; MONDAL, M.S.; SUGANUMA, T.; MATSUKURA, S.; KANGAWA, K.; NAKAZATO, M. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. **Endocrinology**, Baltimore, v. 141: p. 4255–4261, 2000a.

DATE, Y.; MURAKAMI, N.; KOJIMA, M.; KUROIWA, T.; MATSUKURA, S.; KANGAWA, K.; NAKAZATO, M. Central effects of a novel acylated peptide, ghrelin, on growth hormone release in rats. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v. 275: p. 477–480, 2000b.

DATE, Y.; MURAKAMI, N.; TOSHINAI, K.; MATSUKURA, S.; NIIJIMA, A.; MATSUO, H.; KANGAWA, K.; NAKAZATO, M. The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 123: p. 1120–1128, 2002.

DAVIES J.S.; KKOTOKORPI P.; ECCLES S.R.; BARNES S.K.; TOKARCZUK P.F.; ALLEN S.K. Ghrelin induces abdominal obesity via GHS-R-dependent lipid retention. **Mol. Endocrinol.** 23(6):914-924, 2009.

DE LA COUR C.D.; NORLÉN P.; HAKANSON R. Secretion of ghrelin from rat stomach ghrelin cells in response to local microinfusion of candidate messenger compounds: a microdialysis study. **Regul. Pept.** 143(1-3):118-126, 2007.

DE VRIESE, C.; GREGOIRE, F.; LEMA-KISOKA, R.; WAELBROECK, M.; ROBBERECHT, P.; DELPORTE, C. Ghrelin degradation by serum and tissue homogenates: identification of the cleavage sites. **Endocrinology**, Baltimore, v. 145, p. 4997-5005, 2004.

DICKSON, S.L.; BAILEY, A.R.; LENG, G.; Growth hormone (GH) secretagogues and neuroendocrine regulation of GH secretion. **Growth Horm. IGF**, v. 9, suppl. A, p. 89-91, 1999.

DIETZ WH. Periods of risk in childhood for development of adult obesity - What do we need to learn? **J Nutr**, v. 127, 1997, pp. 1884-6.

Disponível em <<http://www.gease.pro.br/>> acessado em 08/02/2011.

ERDMANN, J.; LIPP, L.F.; SCHUSDZIARRA, V. Differential effect of protein and fat on plasma ghrelin levels in man. **Regul. Pept.**, Amsterdam, v. 116: p. 101–107, 2003.

FERREIRA, Shirley; TINOCO, Adelson L A; AGUIAR, Juliana M de; LIMA, Marina G. CUSTODIO, Isis Danyelle D. Obesidade infantil: etiologia e conseqüências para a saúde. **Revista Digital - Buenos Aires** - Ano 11 - N° 106 - Março de 2007. Disponível em [www.efdeportes.com](http://www.efdeportes.com)

FOSTER-SCHUBERT K.E.; OVERDUIN J.; PRUDOM C.E.; LIU J.; CALLAHAN H.S.; GAYLINN B.D. Acyl and total ghrelin are suppressed strongly by ingest proteins, weakly by, lipids, and biphasically by carbohydrates. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 93:1971-1979, 2008.

FROGUEL, P.; GUY-GRAND, B. e CLEMENT, K. Genetics of obesity: towards the understanding of a complex syndrome. **Presse Med.**, v. 29, p. 564-571, 2000.

FUJISAWA, T; IKEGAMI, H.; KAWAGUCHI, Y.; OGIHARA, T. Meta-Analysis of the Association of Trp64Arg Polymorphism of b3-Adrenergic Receptor Gene with Body Mass Index. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** v. 83, n. 7, p. 2441-2444, 1998.

GNANAPAVAN, S.; KOLA, B.; BUSTIN, S.A.; MORRIS, D.G.; MCGEE, P.; FAIRCLOUGH, P.; BHATTACHARYA, S.; CARPENTER, R.; GROSSMAN, A.B.; KORBONITS, M. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Baltimore, v. 87: p. 2988, 2002.

GREENMAN Y.; GOLANI N.; GILAD S.; YARON M.; LIMOR R.; STERN N. Ghrelin secretion is modulated in a nutrient- and gender – specific manner. **Clin. Endocrinol.** 60:382-388, 2004.

GUALILLO, O.; CAMINOS, J.; BLANCO, M.; GARCIA-CABALLERO, T.; KOJIMA, M.; KANGAWA, K.; DIEGUEZ, C.; CASANUEVA, F. Ghrelin, a novel placental-derived hormone. **Endocrinology**, Baltimore, v. 142: p. 788–794, 2001.

GUAN, X.M.; YU, H.; PALYHA, O.C.; MCKEE, K.K.; FEIGNER, S.D.; SIRINATHSINGHI, D.J.; SMITH, R.G.; van der PLOEG, L.H.; HOWARD, A.D. Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. **Brain**, Oxford, v. 48, p. 23-29, 1997.

HANSEN, T.K.; DALL, R.; HOSODA, H.; KOJIMA, M.; KANGAWA, K.; CHRISTIANSEN, J.S.; JORGENSEN, J.O. Weight loss increases circulating levels of ghrelin in human obesity. **Clin. Endocrinol.**, Oxford, v. 56: p. 203–206, 2002.

HILL J.A., MELBY C., JOHNSON S.L., PETERS I.C. Physical activity and energy requirements. **Am J Clin Nutr.** 1995;62(s):1059-66.

HINNEY, A.; HOCH, A.; GELLER, F.; SCHÄFER, H.; SIEGFRIED, W.; GOLDSCHMIDT, H.; REMSCHMIDT, H.; HEBEBRAND, J. Ghrelin gene: identification of missense variants and a frameshift mutation in extremely obese children and adolescents and healthy normal weight students. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Baltimore, v. 87(6): p. 2716–2719, 2002.

HO SY, LAM TH, JANUS ED. Waist to stature ratio is more strongly associated with cardiovascular risk factors than other simple anthropometric indices. **Ann Epidemiol.** V.13(10): p.683-91, 2003.

HOSODA H.; KOJIMA M.; MATSUO H.; KANGAWA K. Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 279:909-913, 2000.

HOWARD A.D.; FEIGNER S.D.; CULLY D.F.; ARENA J.P. LIBERATOR P.A.; ROSENBLUM C.I. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. **Science.** 273:974-977. 1996.

IBGE. Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) – **Antropometria e Análise do Estado Nutricional de Crianças e Adolescentes no Brasil**, Ministério da Saúde: 2002-2003.

KIM, M.S.; YOON, C.Y.; PARK, K.H.; SHIN, C.S.; PARK, K.S.; KIM, S.Y.; CHO, B.Y.; LEE, H.K. Changes in ghrelin and ghrelin receptor expression according to feeding status. **Neuroreport.**, Oxford, v. 14: p. 1317–1320, 2003.

KIRCHNER H.; GUTIERREZ J.A.; SOLEBERG P.J.; PFLUGER P.T.; CZYZYK T.A.; WILLENCY J.A. GOAT links dietary lipids with the endocrine control of energy balance. **Nat. Med.** 15(7):741-745, 2009.

KOJIMA, M.; HOSODA, H.; DATE, Y.; NAKAZATO M.; MATSUO, H.; KANGAWA, K.; Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. **Nature**, London, v. 402, p. 656-660, 1999.

KOJIMA, M.; HOSODA, H.; MATSUO, H.; KANGAWA, K. Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. **Trends Endocrinol. Metab.**, New York, v.12, p. 118-122, 2001.

KOJIMA, M.; KANGAWA, K. Ghrelin: structure and function. **Physio. Rev.**, New York, v. 85, p. 495-522, 2005.

KOJIMA M.; KANGAWA K. Structure and function of ghrelin. **Results Probl. Cell Difer.** 46:89-115, 2008.

KOJIMA M.; KANGAWA K. Ghrelin: from gene to physiological function. **Results Probl. Cell Difer.** 50:185-205, 2010.

KORBONITS, M.; CICCARELLI, E.; GHIGO, E.; GROSSMAN, A.B. The growth hormone secretagogue receptor. **Growth Horm. IGF**, v. 9, suppl. A, p. 93-99, 1999.

KORBONITS, M.; GUEORGUIEV, M.; O'GRADY, E.; LECOEUR, C.; SWAN, D.C.; MEIN, C.A.; WEILL, J.; GROSSMAN, A.B. e FROGUEL, P.A. variation in the ghrelin gene increases weight and decreases insulin secretion in tall, obese children. **J. Clin. Endocr. Metab.**, v. 87, p. 4005-4008, 2002.

KORBONITS, M.; GROSSMAN, A.B.; Ghrelin: update on a novel hormone system. **Eur. J. Endocrinol.**, Oslo, v. 151, suppl. 2, p. S67-S70, 2004.

KUCZMARSKI, R.J.; OGDEN, C.L.; GUO, S.S.; GRUMMER-STRAWN, L.M., et al. **CDC growth charts**: United States. Advance data from vital and health statistics; n. 314. Hyattsville, Maryland: National Center for Health Statistics, 2000.

LEITE, N. Obesidade Infanto-juvenil: efeito da atividade física e da orientação nutricional sobre a resistência a insulina. **Tese de doutorado Universidade Federal do Paraná.** 2005.

LESKELÄ P.; UKKOLA O.; VARTIAINEN J.; RÖNNEMAA T.; KAPRIO J.; BOUCHARD C.; KESÄNIEMI Y.A. Fasting plasma total ghrelin concentrations in monozygotic twins discordant for obesity. **Metabolism.** Feb;58(2):174-9, 2009.

LIU J.; PRUDOM C.E.; NASS R.; PEZZOLI S.S.; OLIVEI M.C.; JOHNSON M.L. Novel ghrelin assays provide evidence for independent regulation of ghrelin acylation and secretion in healthy young men. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 93:1980-1987, 2008.

LU, S.; GUAN, J.L.; WANG, Q.P.; UEHARA, K.; YAMADA, S.; GOTO, N.; DATE, Y.; NAKAZATO, M.; KOJIMA, M.; KANGAWA, K.; SHIODA, S. Immunocytochemical observation of ghrelin-containing neurons in the rat arcuate nuclei. **Neurosci. Lett.**, v. 321: p. 157–160, 2002.

MAES, H.H.; NEALE, M.C.; EAVES, L.J. Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity. **Behav. Genet.**, v. 27, p. 325-351, 1997.

MATSUMOTO, M.; HOSODA, H.; KITAJIMA, Y.; MOROZUMI, N.; MINAMITAKE, Y.; TANAKA, S.; MATSUO, H.; KOJIMA, M.; HAYASHI, Y.; KANGAWA, K. Structure-activity relationship of ghrelin: pharmacological study of ghrelin peptides. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** , Orlando, v. 287: p. 142–146, 2001.

MCARDLE WD, KATCH FI, KATCH VL. **Fisiologia do exercício, energia, nutrição e desempenho humano**. 3 ed. Trad. de G Taranto. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 1992.

MIETLICKI E.G.; NOWAK E.L.; DANIELS D. The effect of ghrelin on water intake during dipsogenic conditions. **Physiol. Behav.** 96:37-43, 2009.

MIRAGLIA DEL GIUDICE E, SANTORO N, CIRILLO G, RAIMONDO P, GRANDONE A, D'ANIELLO A. Molecular screening of the ghrelin gene in Italian obese children: the Leu72Met variant is associated with an earlier onset of obesity. **Int J Obes** 28:447–450, 2004.

MONDAL M.S.; TOSHINAI K.; UENO H.; KOSHINAKA K.; NAKAZATO M. Characterization of obestatin in rat and human stomach and plasma, and its lack of acute effect on feeding behavior in rodents. **J. Endocrinol.** 198:339-346, 2008.

MORENO-ALIGA, J.; SANTOS, J.L.; MARTÍNEZ, J.A. Does weight loss prognosis depend on genetic make-up? **Obesity Reviews**, v. 6, p. 155-168, 2005.

NAKAZATO M.; MURAKAMI N.; DATE Y.; KOJIMA M.; MATSUO H; KANGAWA K. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. **Nature.** 409:194-198, 2001.

NOGUEIRAS, R., TSCHOP, M. Biomedicine. Separation of conjoined hormones yields appetite rivals. **Science (Washington)**, v. 310: p. 985–986, 2005.

OVERDUIN J.; FRAYO R.S.; GRILL H.J.; KAPLAN J.M.; CUMMINGS D.E. Role of the duodenum and macronutrient type in ghrelin regulation. **Endocrinology.** 146:845-850, 2005.

POPOVIC, V.; MILJIC, D.; MICIC, D.; DAMJANOVIC, S.; ARVAT, E.; GHIGO, E.; DIEGUEZ, C.; CASANUEVA, F.F. Ghrelin main action on the regulation of growth hormone release is exerted at hypothalamic level. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Baltimore, v. 88: p. 3450–3453, 2003.

ROMERO, C. E. M.; ZANESCO, A. O papel dos hormônios leptina e grelina na gênese da obesidade. **Rev. Nutr.** [online].vol.19, n.1, pp. 85-91, 2006.

SÁNCHEZ J.; OLIVER P.; PALOU A.; PICÓ C. The inhibition of gastric ghrelin production by food intake on rats is dependent on the type of macronutrient. **Endocrinology.** 145(11):5049-5055, 2004.

SEOANE L.M.; AL-MASSADI O.; BARREIRO F.; DIEGUEZ C.; CASANUEVA F.F. Growth hormone and somatostatin directly inhibit gastric ghrelin secretion. An in vitro organ culture system. **J. Endocrinol. Invest.** 30:22-25, 2007.

SHIYA, T.; NAKAZATO, M.; MIZUTA, M.; DATE, Y.; MONDAL, M.S.; TANAKA, M.; NOZOE, S.; HOSODA, H.; KANGAWA, K.; MATSUKURA, S. Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Baltimore, v. 87: p. 240–244, 2002.

SOARES J.B.; MOREIRA A.F.L. Ghrelin, des-acyl-ghrelin and obestatin: Three pieces of the same puzzle. **Peptides**. 29:1255-1270, 2008.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. **I Diretriz de Prevenção da Aterosclerose na Infância e Adolescência**. Arquivos Brasileiros de Cardiologia. v. 85, p.1-36, 2005.

SOUZA, R. L. R; FADEL-PICHETH, C.; ALLEBRANDT, K.V.; FURTADO, L.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.. Possible influence of BCHE locus of butyrylcholinesterase on stature and body mass index. **Am. J. Phys. Antropol.**, Washington, v. 326, p. 329-334, 2005a.

SMITH, R.G.; PONG, S.S.; HICKEY, G.; JACKS, T.; CHENG, K.; LEONARD, R.; COHEN, C.J.; ARENA, J.P.; CHANG, C.H.; DRISKO, J.; WYVRATT, M.; FISHER, M.; NAUND, R.; PATCHETT, A. Modulation of pulsatile GH release through a novel receptor in hypothalamus and pituitary gland. **Recent. Prog. Horm. Res.**, San Diego, v. 51, p. 261-285, 1996.

SMITH, R.G.; van der PLOEG, L.H.; HOWARD, A.D.; FEIGHNER, S.D.; CHENG, K.; HICKEY, G.J.; WYVRATT, M.J.Jr; FISHER, M.H.; NAUNS, R.P.; PATCHETT, A.A.; PeptidomiMic regulation of growth hormone secretion. **Endocr. Rev.**, Baltimore, v. 18, p. 621-645, 1997.

STATSOFT, Inc. **Statistica for Windows** (Computer program manual). Tulsa, 1996. 1cd.

STYLIANOU C.; GALLI-TSINOPOULOU A.; FARMAKIOTIS D.; ROUSSO I.; KARAMOUZIS M.; KOLIAKOS G.; NOUSIA-ARVANITAKIS S. Ghrelin and leptin levels in obese adolescents. Relationship with body fat and insulin resistance. **Hormones (Athens)**. Oct-Dec;6(4):295-303, 2007.

TANAKA, M.; HAYASHIDA, Y.; IGUCHI, T.; AKAN, N.; NAKAI, N.; NAKASHIMA, K. Organization of the mouse ghrelin gene and promoter: occurrence of a short noncoding first exon. **Endocrinology**, Baltimore, v. 124, p. 3697-3700, 2001.

TANNER, J. M. Normal growth and techniques of growth assessment. **Clinics in Endocrinology and Metabolism**, v. 15, n. 3, p. 411-451, 1986.

TEFF K.L.; ELLIOT S.S.; TSCHÖP M.; KIEFFER T.J.; RADER D.; HEIMAN M. Dietary fructose reduces circulating insulin and leptin, attenuates postprandial suppression of ghrelin, and increases triglycerides in women. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 89:2963-2972, 2004.

TINKER, L. F.; PATTERSON, R. E.; KRISTAL, A. R.; BOWEN, D. J.; KUNIYUKI, A.; HENRY, H.; SHATTUCK, A. Measurement Characteristics of 2 Different Self-Monitoring Tools Used

in a Dietary Intervention Study. **Journal of American Dietetic Association**, v. 101, n. 9, 2001.

TSCHÖP, M.; WEYER, C.; TATARANNI, A.P.; DEVANARAYAN, V.; RAVUSSIN, E. E HEIMAN, M.L. Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. **Diabetes**, v. 50, p. 707-709, 2000.

UKKOLA, O.; RAVUSSIN, E.; JACOBSON, P.; SNYDER, E.E.; CHAGNON, M.; SJOSTROM, L. e BOUCHARD, C. Mutations in the preproghrelin/ghrelin gene associated with obesity in humans. **J. Clin. Endocr. Metab.**, v. 86, p. 3996-3999, 2001.

VALONES, Marcela Agne Alves et al. Princípios e aplicações da reação em cadeia de Polimerase em áreas médicas diagnósticas: uma revisão. **Braz. J. Microbiol.** [online]. vol.40, n.1, pp. 1-11, 2009.

VIGITEL – Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. **Estimativas sobre frequência e distribuição sócio-demográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2008**. Ministério da Saúde: Brasília, 2008

VIVENZA D.; RAPA A.; CASTELLINO N.; BELLONE S.; PETRI A.; VACCA G.; AIMARETTI G.; BROGLIO F.; BONA G. Ghrelin gene polymorphisms and ghrelin, insulin, IGF-I, leptin and anthropometric data in children and adolescents. **Eur J Endocrinol.** 151:127-133, 2004.

WADE, T.D.; BULIK, C.M.; HEATH, A.C.; MARTIN, N.G.; e EAVES, L.J. The Influence of Genetic and Environmental Factors in Estimations of Current Body Size, Desired Body Size, and Body Dissatisfaction. **Twin Res.**, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Diet, Nutrition And The Prevention Of Chronic Diseases. WHO. **Technical Reports Series** n. 916. World Health Organization Expert Committee, Geneva, 2003.

YOSHIMOTO A.; MORI K.; SUGAWARA A.; MUKOYAMA M.; YAHATA K.; SUGANAMI T. Plasma ghrelin and desacyl ghrelin concentrations in renal failure. **J. Am. Soc. Nephrol.** 13:1748-1752, 2002.

ZHANG, J.V., REN, P.G., AVSIAN-KRETCHMER, O., LUO, C.W., RAUCH, R., KLEIN, C., HSUEH, A.J. Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. **Science (Washington)**, v. 310: p. 996–999, 2005.

## 7 APENDICE

### A) CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Foram selecionados obesos voluntários residentes em Curitiba/Paraná, com idades entre 10 e 16 anos, que preencham os seguintes critérios: IMC acima do percentil 95; peso estável em um período maior ou igual há dois meses; não estar utilizando medicamentos anorexígenos ou outros que possam interferir no controle de peso e na hiperinsulinemia.

As amostras controle foram selecionadas do banco de dados do projeto ALPE do Laboratório de Polimorfismos e Ligação. No total foram utilizadas 131 controles para a variante L72M e 94 controles para a variante R51Q, de indivíduos não obesos com  $18 \leq \text{idade} \leq 19$  e apresentando  $\text{IMC} < 25$ .

Para a coleta de amostras primeiramente fez-se uma seleção no setor de educação física de material de plasma pré-existente de adolescentes obesos e encaminhamento do mesmo para o Laboratório de Polimorfismos e Ligação. Foi então realizado divulgação para recrutamento de adolescentes obesos interessados no programa. Houve uma diminuição do tamanho da amostra em decorrência das desistências no ano de 2009 devido aos atrasos dos períodos escolares em consequência da Gripe Influenza A H1N1.

A previsão inicial do número de amostras do projeto era de 184 adolescentes obesos. Dessas, foram obtidas 47 amostras, nove das quais provenientes de plasma coletados anteriores a esse ano e 38 de sangue total coletados em 2010.

A previsão inicial para o número de controles não obesos também era de 184 amostras e dessas, 131 foram levantadas e são provenientes do banco de amostras ALPE (projeto Altura e Peso), estocados no Laboratório de Polimorfismos e Ligação.

Após aprovação pelo Comitê de Ética - Universidade Federal do Paraná (UFPR, atendendo a resolução 196/96), os participantes assinaram o Termo de Consentimento dos pais ou responsáveis e assentimento das crianças e adolescentes. Os participantes foram, então, avaliados por equipe multidisciplinar em dois momentos: na fase inicial e após 12 semanas do programa de exercícios.



## B) DESENHO DO ESTUDO

O projeto passará pelas etapas de avaliação inicial, tratamento e avaliação final, como descrito abaixo:

**Avaliação Inicial:** Clínica, Antropométrica, Cardiorrespiratória, Gasto Metabólico, Avaliação Nutricional, Exames Laboratoriais, Análise Genética.

**Tratamento (3 meses):** Exercício Físico, Orientação Nutricional, Orientação Psicológica.

**Avaliação Final:** Clínica, Antropométrica, Cardiorrespiratória, Gasto Metabólico, Exames de Sangue.

**Análise Genética:** será realizada pelo Laboratório de Polimorfismos e Ligação. As coletas e as avaliações serão realizadas pelo Núcleo de Pesquisa em Qualidade de Vida do departamento de Educação Física da Universidade Federal do Paraná.

## C) AVALIAÇÕES FÍSICAS MULTIDISCIPLINARES

As avaliações físicas multidisciplinares envolvem Aspectos Clínicos e Antropométricos, Aptidão Cardiorrespiratória, Determinação do Gasto Metabólico em Repouso (GMR), Exames Laboratoriais, Análise Genética e Avaliações Nutricionais:

**Avaliações Clínicas e Antropométricas:** As avaliações clínica e puberal (TANNER, 1986) serão realizadas por médicos. Serão avaliados o peso, estatura e circunferência abdominal (CA) e calculados o IMC-escore Z. A composição corporal será avaliada pelo método de bioimpedância elétrica (BIA), com o aparelho Biodynamics® tetrapolar.

**Avaliação da Aptidão Cardiorrespiratória:** O condicionamento cardiorrespiratório será avaliado em esteira (marca *Ecafif EG 700X*) utilizando o protocolo de Balke modificado (ROWLAND, VARZEUS, WALSH, 1991) e na bicicleta ergométrica com o protocolo de McMaster (BAR-OR, 1983). Mensurar-se-ão: frequência cardíaca (FC), consumo de oxigênio ( $VO_2$ ), volume de gás carbônico ( $VCO_2$ ) e ventilação (VE), utilizando ergoespirômetro (*Parvo Medics MMS2400, USA*).

**Determinação do Gasto Metabólico em Repouso (GMR):** As mensurações do GMR serão realizadas pela manhã, durante 35 minutos, com o aparelho Deltatrak II®, no modo canópia (respiração espontânea), no indivíduo acordado após jejum de 10 - 12 horas e repouso de 30 minutos, determinados o  $VO_2$  e o  $VCO_2$ .

**Exames Laboratoriais:** As amostras sanguíneas serão coletadas no período da manhã, após 12 horas de jejum, para realização de hemograma, dosagens de glicose (curva glicêmica de duas dosagens -1,75 g/kg e máx. de 75g), insulina, colesterol total (CT), lipoproteína de alta densidade (HDL-C), lipoproteína de baixa densidade (LDL-C), triglicérides (TG), adipocitocinas (IL-1, TNF- $\alpha$ , Leptina, Adiponectina), Ferritina Sérica, TSH e T4 livre. Caso não tenham sido pedidos anteriormente serão realizados também exame parcial de urina e parasitológico de fezes.

**Avaliações Genéticas:** será analisado o variante *L72M* do gene *GHRL* em adolescentes obesos submetidos a programa de 12 semanas de exercícios físicos e em adolescentes não obesos controle. Serão comparados os dados obtidos com dados de adultos obesos e da população em geral e verificado se existe associação genética com a perda de peso e a taxa metabólica basal nos adolescentes submetidos a programa de 12 semanas de exercícios físicos.

**Avaliação Nutricional:** A nutrição será avaliada por inquérito alimentar recordatório de 24 horas e o registro alimentar de três dias, validados pela *American Dietetic Association* (TINKER *et al.*, 2001).

**Taxa Metabólica Basal:** A taxa metabólica de repouso é influenciada pelo balanço energético diário e controlada pelo tecido adiposo (FUJISAWA *et al.*, 1998). Além disso, Leite (2005) encontrou respostas diferentes na taxa metabólica de repouso entre os gêneros, em que as meninas apresentaram redução significativa no metabolismo basal e menor perda de peso após um programa de 12 semanas de exercícios físicos e orientação nutricional. A redução do metabolismo basal também pode se relacionar à adaptação ao novo tamanho corporal (MORENO-ALIAGA *et al.*, 2005).

A Taxa de Metabolismo Basal (TMB) é a quantidade mínima de energia (calorias) necessária para manter as funções vitais do organismo em repouso (McARDLE e col., 1992). Essa taxa pode variar de acordo com o sexo, peso, altura, idade e nível de atividade física. Repare que quanto mais intensa a atividade, maior sua necessidade energética.

#### D) EXERCÍCIOS FÍSICOS

Após as avaliações iniciais os indivíduos selecionados receberão orientação para Estilo de Vida Saudável (EVS) que ocorrerá em seis encontros em grupo conduzidos por equipe multidisciplinar composta por nutricionista, professor de educação física e psicólogo. Após esta etapa, será iniciada a prática de exercícios físicos: 36 sessões de exercícios programados durante 12 semanas; atividades aeróbicas três vezes por semana no período da manhã ou tarde (50 minutos de caminhada, 50 minutos de ciclismo *indoor* e 20 minutos de alongamento).

A faixa de treinamento individualizada para a caminhada e ciclismo *indoor* será calculada a partir da  $FC_{máx}$  e o  $VO_{2max}$  obtidos nos testes ergométricos (Foto 1).

O ciclismo *indoor* e a caminhada serão iniciados na intensidade entre 35 a 55% da frequência cardíaca de reserva da 1ª a 4ª semana, aumentando-se para 45 a 65%, na 5ª a 8ª semana, e atingindo-se entre 55 e 75% da FCR na 9ª a 12ª semana (Foto 2 e 3).

#### E) EXTRAÇÃO DE DNA

Das amostras utilizadas no trabalho, 60 só possuem plasma disponível e para estas amostras será utilizado um Kit de extração *QIAamp DNA MiniKit* da Qiagen.

O protocolo para extração de DNA a partir de material parafinado com o sistema comercial *QIAamp DNA minikit*® foi realizado de acordo com as normas do fabricante.

Em cada tubo foram adicionados 180 µl de Buffer ATL (Tissue Lysis Buffer), além de 20 µl de proteinase K. Após homogeneização, as amostras foram incubadas em banho-maria a 55°C, durante três horas, e agitadas gentilmente a cada hora. Após esse período, adicionaram-se a cada tubo 200 µl de Buffer AL (fornecido pelo fabricante), sendo os mesmos aquecidos a 70°C durante 10 minutos para a inativação da proteinase residual. Em seguida, foram adicionados 200 µl de etanol, agitando-se durante 15 segundos e centrifugando brevemente.

A solução resultante foi transferida para o dispositivo da coluna *QIAamp DNA minikit*® e centrifugada a 8.000 rpm por um minuto. O dispositivo com a coluna foi removido do tubo e recolocado em um tubo limpo. Foram adicionados 500 µl de Buffer AW1 ao dispositivo com a coluna, que foram centrifugados a 8.000 rpm por um

minuto. O procedimento de lavagem foi repetido com 500 µl de Buffer AW2, seguido de centrifugação a 14.000 rpm durante três minutos.

O DNA extraído da coluna foi diluído pela adição de 100 µl de Buffer AE (fornecido pelo fabricante). Primeiramente foram adicionados 50 µl, aguardando-se um minuto e centrifugando-se a 8.000 rpm durante um minuto. Em seguida, 50 µl de Buffer AE foram adicionados, aguardando-se cinco minutos e centrifugando-se a 8.000 rpm por um minuto, após as amostras terem sido transferidas do dispositivo para tubo de recuperação. As mesmas foram armazenadas a -20°C.

Para as demais amostras foi extraído DNA leucocitário pelo método de Lahiri e Nurnberger. A técnica de extração de DNA pelo método de Lahiri e Nurnberger consiste na separação, a partir do sangue periférico, do creme de leucócitos de onde será extraído DNA. Serão coletados 10 mL de sangue em EDTA e o creme de leucócitos, acrescido de suspensão de hemácias, e estocado a -20°C.

Desse material descongelado será retirado o creme de leucócitos, ressuspenso em 10 mL de TKM1 (Tris-HCl 0,01 M pH 7,6; KCl 0,01 M; MgCl<sub>2</sub> 0,01 M; EDTA 0,002M) e 125 µL de IGEPAL CA-630.

Após centrifuga-se a 2500 rpm por 15-20 minutos, despreza-se o sobrenadante e completa-se novamente para 10 mL com TKM1. Repete-se a centrifugação e a ressusensão em TKM1 até que o precipitado fique bem claro.

Após ressusensão delicada do precipitado, foram adicionados 800 µL de TKM2 (Tris-HCl 0,01 M pH7,6; KCl 0,01 M; MgCl<sub>2</sub> 0,01 M; EDTA 0,002 M; NaCl 0,4 M) agitando-se bem. Adiciona-se 50 µL de SDS 10% e mistura. Incuba-se em banho-maria a 55°C durante a noite.

Retirar do banho-maria e adicionar 300 µL de NaCl saturado (6 M) e misturar bem. Centrifugar a 1200 rpm por 10-20 minutos, passar o sobrenadante para um tubo de ensaio e adicionar dois volumes de etanol 100%, gelado, tampar o tubo com parafilme e invertê-lo várias vezes (delicadamente) até precipitar o DNA. Pescar o DNA utilizando micropipeta com ponteira de ponta cortada e colocar em tubo de 1,5 mL.

Lavar o DNA obtido com etanol 70%, dispensando posteriormente o álcool. O tubo é mantido semi-aberto na estufa a 37°C, até evaporar todo o álcool. Ressuspender o DNA em 200 µL de tampão TE (Tris HCl pH8,0 0,01 M e EDTA pH 8,0 0,001 M) e deixar no banho-maria a 55°C por uma hora. Após três dias na geladeira, verificar a densidade ótica e congelar.

#### F) PCR-SSCA

A técnica de PCR-SSCA (análise de conformação de fita simples) foi utilizada para o estudo das variantes L72M e R51Q do gene *GHRL*. Essa técnica consiste em amplificar fragmentos de 200 a 300 pb do gene, através de PCR, sendo que o produto da PCR é desnaturado por calor e submetido a eletroforese em fita simples em um gel de poliacrilamida. A solução de PCR contém 4 µl de PCR SuperMix (Invitrogen), 1 µl de DNA (100ng), 10pmol de cada um dos iniciadores.

As condições da PCR foram as seguintes:

1. Desnaturação inicial: 94° C por 5 minutos
2. Desnaturação: 94 °C por 30 segundos;
3. Hibridização: 48 °C por 30 segundos;
4. Extensão: 72 °C por 30 segundos;
5. Ciclos: 35 (passos 2 a 4);
6. Extensão final: 72 °C por 10 minutos.

Os iniciadores utilizados estão mostrados na tabela 1.

**Tabela 1:** Seqüência dos iniciadores utilizados para amplificar os fragmentos de DNA na técnica de PCR-SSCA (Análise Conformacional de Fita Simples)

Iniciadores	Seqüência 5' – 3'	Tamanho do fragmento (pb)
GHRL 15	TCTCCAGAGCACAAAGGAC	184
GHRL 13	TTCTGCTTGACCTCCATCTTCC	
GHRL 25	GGAGTCGAAGAAGCCACCA	138
GHRL 23	CAGAAGCATAAACTGCAGAGG	

Após a PCR, foram misturados 5 µl de DNA, já amplificado, a 5 µl de solução de manutenção da fita simples (95% de formamida, 0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xileno cianol, 10mM de EDTA e 10mM de NaOH). Esta solução é foi submetida a 94°C por 5 minutos e imediatamente colocada no gelo, até sua aplicação no gel de poliacrilamida. As fitas simples adquirem conformação tridimensional e podem correr em posições diferentes no gel. Uma simples mutação de ponto pode alterar essa conformação e, conseqüentemente, o padrão de bandas do fragmento.

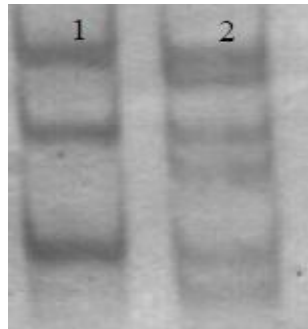
#### G) ELETROFORESE SSCA

As condições de eletroforese para os fragmentos analisados (tabela 2) foram estabelecidas experimentalmente.

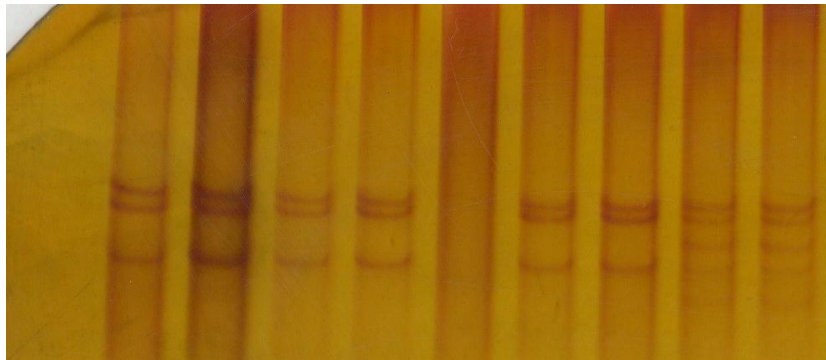
**Tabela 2:** Condições da eletroforese de SSCA para o fragmento do gene *GHRL*.

Fragmento	Concentração de acrilamida %	% de bisacrilamida em relação à acrilamida	pH do tampão de preparo do gel	Tempo de corrida (horas; volts)
<b>aa51</b>	10	3,4	4,7	4h; 200
<b>aa72</b>	8	3,4	8,2	5h; 180

Para o fragmento de *GHRL- aa 51*, (figura 1 e 2) foi utilizada uma solução estoque de acrilamida 29:1 (29g de acrilamida; 1g de bisacrilamida; 5ml de glicerol, completar para 100 ml com água bidestilada). A concentração final do gel foi de 10 %, e o tampão do gel foi o ácido (tampão Tris-HCl 33mM, pH 4,7). A corrida eletroforética foi realizada a 200 volts e 17mA, por um período de 4 horas.

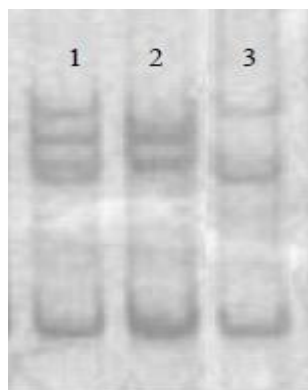


**Figura 1:** Gel de poliacrilamida 29:1, 10% descontínuo. Genótipos quanto ao gene *GHRL*: 1 – 51AA, 2 – 51AQ.

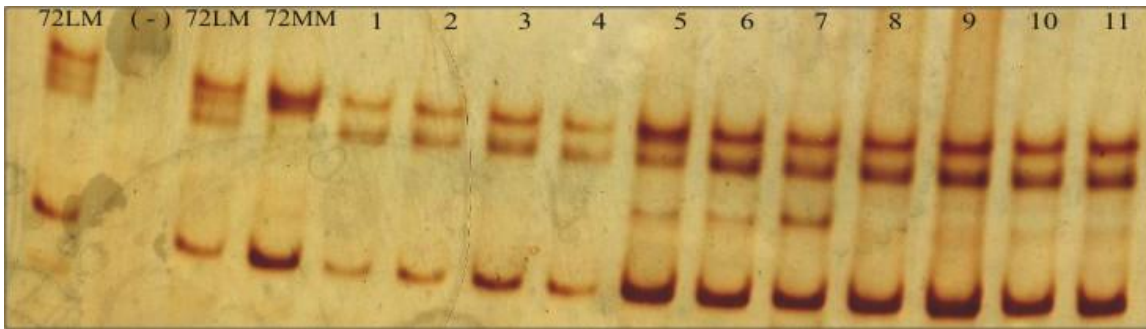


**Figura 2:** Gel de poliacrilamida 29:1, 10% descontínuo. Genótipos quanto ao gene *GHRL*: 1 ao 4 – 51AA; 5 (-); 6 e 7 – 51AA; 8 e 9 – 51AQ

Para o fragmento *GHRL- aa 72* (figura 3 e 4) foi utilizada uma solução estoque de acrilamida de 29:1 (29g de acrilamida; 1g de bisacrilamida; 5ml de glicerol, completar para 100 ml com água bidestilada). A corrida eletroforética foi realizada a 180 volts e 17mA, por um período de 5 horas.



**Figura 3:** Gel de poliacrilamida 29:1, 8% contínuo. Genótipos quanto ao gene *GHRL*: 1 – 72LM, 2 – 72MM, 3 – 72LL.



**Figura 4:** Gel de poliacrilamida 29:1, 8% contínuo. Genótipos quanto ao gene *GHRL*: 1 ao 11 – 72LL

A solução estoque de tampão TBE 5X foi preparada com 54g de Tris, 27,5 g de ácido bórico, 20 ml de EDTA 0,5M (pH 8,0) e completou-se o volume para 1000 ml de água destilada. Após a corrida, foi realizada a coloração do gel com nitrato de prata (BUDOWLE e cols., 1991).

O gel foi lavado em solução de HNO<sub>3</sub> a 1% por três minutos, e em seguida lavado três vezes com água destilada. O gel foi, então, coberto com solução de AgNO<sub>3</sub> (2,02 g de AgNO<sub>3</sub> em 1000 ml de água bidestilada) e colocado por 30 segundos no microondas. A solução de nitrato de prata foi retirada e o gel lavado três vezes com água destilada.

A revelação foi feita com solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (170 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e 92 µl de formaldeído), sendo preparada cinco minutos antes do uso. Um terço dessa solução foi despejada sobre o gel, que foi colocado no forno microondas por 30 segundos. O gel foi retirado do forno microondas e a solução enegrecida eliminada.

O restante da solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> foi despejada sobre o gel, que foi mantido em agitação até que aparecessem bandas. A solução foi, então, retirada e o gel foi lavado três vezes com água destilada.

Depois, o gel foi submetido a uma solução de ácido acético a 10% por dez minutos e após esse tempo a solução foi retirada e o gel lavado três vezes com água destilada. Por fim, o gel guardado no meio de duas lâminas e escaneado.

#### H) PCR EM TEMPO REAL

Derivada da PCR convencional, a PCR em Tempo Real se mostra como uma inovação tecnológica e vem conquistando espaço nos diagnósticos clínicos e nos laboratórios de pesquisa por apresentar a capacidade de gerar, além de resultados



qualitativos, resultados quantitativos, se mostrando de forma mais rápida e precisa (VALONES, 2009).

A técnica em Tempo Real é usada para a detecção e medida de produtos gerados durante cada ciclo da PCR. A emissão dos compostos fluorescentes gera um sinal que aumenta proporcionalmente conforme a quantidade de produto da PCR. Ao final da reação, de acordo com o genótipo, apresenta-se no caso dos homozigotos uma ou outra fluorescência, e no caso de heterozigotos apresentam-se ambas as fluorescências.

O método de PCR em tempo real foi padronizado para o gene *GHRL* e serão aplicadas as amostras de DNA extraídas de plasma de obesos e controles. Para a realização da PCR será utilizado o equipamento *7500 Real-Time PCR System* da Applied Biosystems. Para genotipagem do SNP será utilizado o kit *TaqMan SNP* da Applied Biosystems.

Este kit apresenta dois iniciadores específicos não marcados e duas sondas marcadas com diferentes fluorescências que emitem colorações diferentes para cada alelo marcado. Um terceiro fluoróforo, chamado de ROX será usado pelo equipamento como referência passiva de fluorescência.

Na amplificação do DNA, o uso do equipamento para este protocolo de genotipagem é realizado em 3 etapas: na primeira etapa ocorre a pré-leitura, na qual é lida a fluorescência basal da placa antes do processo de amplificação; seguida da amplificação, realizada para todos os segmentos dentro dos seguintes padrões de PCR: 1º passo de 2 minutos a 50°C; 2º passo de 10 minutos a 95°C; 3º passo repetido 45 vezes de 15 segundos a 95°C intercalados por 60 segundos a 60°C.

Por último, a pós-leitura, sendo a análise dos dados gerados anterior, durante e posteriormente à amplificação, resultando no genótipo de cada indivíduo analisado e seu registro em um gráfico representativo.

## I) ACOMPANHAMENTO DO PROJETO

Os grupos de adolescentes obesos foram orientados pela equipe do Núcleo da Qualidade de Vida no setor de Educação Física da UFPR.

As avaliações e os exercícios físicos foram feitos no mesmo departamento. Devido a grande demanda as novas turmas terão os treinos em uma academia.

Os adolescentes que entraram no projeto até final de agosto de 2010 foram incluídos neste projeto, pois tiveram mais 3 meses de exercícios até novembro de 2010. Após esse prazo não haveria tempo hábil para terminar as análises genéticas e o restante dos obesos será analisado por projetos do próprio grupo de trabalho.



Foto 1. Palestras e condicionamento cardiorrespiratório.



Foto 1. Alongamentos e ciclismo *indoor* realizado em academia pelo grupo de adolescentes.



Foto 2. Caminhada e exercícios em grupo realizados pelo grupo de adolescentes.

## 8 ANEXOS

Tabela das Análises Bioquímicas / Antropométricas, Atividade Enzimática e CHE2 no grupo de obesos

A	N	S	ID.	IMC 1	IMC 2	CA 1	CA 2	P 1	P 2	Colest 1	Colest 2	Trigl 1	Trigl 2	LDL 1	LDL 2	HDL 1	HDL 2	Glic 1	Gli 2	ATIV.	ATIV. POS	CHE2
O1	1	F	14,6	27,33	27,039	88,4	86,3	63,4	62,8	134	137	93	59	84	85	31	40	96	104	4,79	3,59	C5-
O2	2	F	11,18	23,55		76,4		52		192		267		95		44		99		10,11		C5-
O3	3	M	11,25	22,04		102,3		51,2		164		67		95		56		95		7,25		C5-
O4	4	M	13	26,65		90,8		67,2		187		97		125		43		89,0		2,34		C5-
O5	5	F	12,8	29,22		98,2		78,3												5,26		C5-
O6	6	F	15,25	36,77		115,3		105,4		134		34		110		46		101		7,38		C5-
O7	7	M	12,25	26,93		94,5		65,8		167		139		99		40		85,0		7,14		C5-
O8	8	F	15,75	29,77		96,8		76,7		160		79		104		40		86		9,69		C5-
O9	9	F	14,25	26,07		82,5		67,4		108		48		64		34		76,0		7,85		C5-
O10	10	F	14,7	27,47		90,6		73,0		168		166		140		50		82,0		3,61		C5-
O11	11	F	12,65	29,46		98,6		80,5		140		100		84		36		99,0		12,81		C5-
O12	12	F	11,15	28,88		95,5		54,2		180		280		87		37		101,0		5,52		C5+
O13	13	F	13	24,12		78		58,4		140		105		72		47		82,0		3,13		C5-
O14	14	F	15,75	34,51		108,3		87,9		99		60		50		37		86,0		4,54		C5-
O15	15	M	15	23,50		78,8		71,4		171		59		103		56		96,0		4,10		C5-
O16	16	M	15,83	25,28		90,3		80,0		126		53		51		64		93,0		3,29		C5-
O17	17	M	12,9	33,76		103,6		77,9		112		72		41		57		87		7,04		C5-
O18	18	M	12,8	29,27		94,8		71,7		212		102		144		48		95,0		7,34		C5-
O19	20	M	13,3	23,78		87,8		70,2		206		126		126		55		79,0		11,12		C5-
O20	21	F	12,05	24,63		82,8		58,8		151		124		101		25		77,0		9,16		C5-
O21	22	M	12	25,60		91		59,3		216		162		126		58		92		3,00		C5-
O22	23	M	12,15	35,99		113,4		95,5												6,62		C5-
O23	24	M	15	28,86		100,8		89												3,49		C5+
O24	25	M	10,21	38,00		109,3		74,7		158		49		75		73		85		4,86		C5-
O25	26	M	14,82	35,65		116,3		99,9		123		62		70		41				6,88		C5-
O26	27	F	14	33,10		103,6		90		158		202		81		37				5,94		C5-
O27	28	M	15,28	28,47		94,2		89,9		197		115		124		50		98		7,46		C5-
O28	49	F	12,45	26,45		91,9		67,7		149		85		86		46		93		9,28		C5+
O29	50	M	14,5	31,96		104,1		99,0		165		232		85		34		99,0		5,31		C5-
O30	51	M	11,9	26,02		83,9		61,3		171		108		107		42		102,0		6,25		C5-
O31	52	M	15,08	26,42		92,5		72,2		137		70		90		33		85,0		6,61		C5-
O32	53	M		29,00		91,7		63,7												8,05		C5-
O33	54	F	15,75	31,89		91,7		78,9		150		51		103		35		89,0		5,31		C5+
O34	55	F	14,4	29,09		100,1		82,3		125		76		73		37		82,0		12,30		C5-
O35	56	M	14,75	29,19		99,9		78,7		148		133		79		42		102		27,50		C5-
O36	57	M	13,5	27,81	25,646	95,7	88,5	84,6	78,9	157	135	85	86	90	70	50	48	85	94	8,34	6,89	C5-
O37	58	M	12	22,51		78		48,9		143		41		95		40		85,0		5,50		C5-
O38	60	M	11,9	29,17		94,1		70		197		269		103		40		102		8,73		C5-

O39	61	F	12	29,18		91,5		71,2		154		92		91		45		88,0		15,53		C5-
O40	62	F	15,4	25,67	25,709	78,7	78,8	74,0	74,3	136	115	56	63	86	64	39	38	109,0	102,0	5,67	4,99	C5-
O41	63	F	11,3	24,67		89,5		67,4		194		131		123		45		97,0		8,21		C5-
O42	64	M	14,08	30,85		107,9		99,3												6,56		C5-
O43	65	F	15,25	32,24		111,2		95,7		232		101		167		47		86		14,42		C5-
O44	66	M	11,5	26,42	25,081	94,2	90,1	64,3	61,9	130	146	68	44	64	82	52	55	96	98	18,08	6,74	C5-
O45	67	F	12,3	34,03		107,3		94,9		182		238		100		34		84,0		9,80		C5-
O46	69	M	14,8	27,68		95,2		88,0		198		112		133		43		93,0		10,70		C5-
O47	70	M	10,25	23,78		81,3		51,8		146		209		70		34		94,0		6,86		C5-
O48	71	F	15	38,61		121,3		103,2		162		275		64		43		76,0		3,88		C5-
O49	72	M	12,4	29,96		102,8		71,7		102		89		39		45		89,0		11,37		C5+
O50	73	F	13,75	30,41		95,9		76,1		104		69		49		41		92,0		3,28		C5-
O51	74	F	13	24,22		86,3		70,5		158		269		67		37		83		4,66		C5-
O52	75	F	12	26,70		85,4		64,8		146		70		92		40		88		10,50		C5+
O53	76	M	10,5	31,08	28,50	98,9	91,9	69	64,9	163	139	167	47	88	81	42	49	94	89	10,30	6,13	C5-
O54	77	F	12,3	23,66		76,3		53,6		171		75		101		55		82,0		11,10		C5-
O55	78	F	13,25	27,97		95,2		66,6		160		116		92		45		97,0		14,71		C5-
O56	80	F	12,05	24,63		82,8		58,8		151		124		101		25		89,0		13,62		C5+
O57	81	M	13,8	25,71		88,7		67,8		132		41		76		48		93,0		8,43		C5-
O58	82	F	15,08	29,61		99,2		74,1		124		69		70		40		92,0		7,63		C5-
O59	83	M	10,25	29,67		102,3		66,5		164		67		95		56		95		5,91		C5-
O60	84	M	15,5	31,24		108,6		99,3		175		145		102		44		86,0		7,72		C5-
O61	85	F	15	25,72		88,9		73,9		139		79		75		48		86,0		3,28		C5-
O62	86	F	14,25	25,87		80,6		66,8		148				96		44		84,0		6,51		C5-
O63	87	F	13,75	40,14		113		98,3		170		140		100		42		81,0		2,99		C5-
O64	88	F	10,75	34,16		119,2		91,2		144		106		75		48		89,0		7,49		C5-
O65	89	F	13,75	27,43		90,7		71,2		198		84		135		46		100,0		9,91		C5-
O66	90	F	12,6	32,67		100,8		79,8		134		76		85		34		97,0		5,95		C5-
O67	91	F	16	30,93		100		89,5		123		56		70		42		92,0		5,40		C5-
O68	92	M	14,6	32,75		109,8		92,2		138		124		67		46		89		6,98		C5-
O69	93	F	14,6	27,33	27,039	88,4	86,3	63,4	62,8	134	137	93	59	84	85	31	40	96	104	7,60	6,61	C5-
O70	94	F	13,5	31,04		94,7		84,3		102		104		47		34		98		7,40		C5-
O71	95	M	12	27,36		91		67,0		143		81		85		42		111,0		9,57		C5-
O72	96	F	13,3	37,18		114,7		86,7		147		99		77		50		90		2,20		C5-
O73	98	M	11,3	28,43		99		74,8		144		185		71		36		94		6,85		C5-
O74	99	F	12,85	27,04		89,5		73		178		47		126		43		90		6,49		C5-
O75	100	F	12	26,84		83,8		62,0		216		293		111		46		92,0		3,49		C5-
O76	101	M	11,05	25,31	23,262	92,6	84,2	66,1	63,1	135	130	53	31	68	68	56	56	96	103	4,21	4,13	C5-
O77	102	M	12,25	26,55				70,1		110		111		59		29		86,0		2,47		C5-
O78	103	F	14,5	35,77	35,116	107,6	107	94,1	92,5	202	225	227	93	124	165	33	41	91	95	2,79	3,76	C5-
O79	105	F	13,75	30,41				76,1		104		69		49		41		92,0		6,15		C5-
O80	108	F	15,3	40,03	37,644	127,4	116,5	112,3	107	167	178	182	140	87	97	44	53	106	102	6,85	6,76	C5-

O81	109	F	10,5	30,60	30,228	96,9	94,8	68,2	70,3	139	141	92	73	77	78	44	48	93	98	8,43	4,30	C5-
O82	110	F	15,5	27,35		87,9		78,4		196	178	67	47	128	126	55	43	90	96	4,09	5,48	C5-
O83	111	M	14,8	30,38		106,3		82,6		131		56		76		44		96		5,39		C5-
O84	112	M	14,75	26,17		91,3		77,7		147		62		91		44		97		5,62		C5-
O85	114	F	15,08	28,12		96,4		67,2		137		49		85		42		65,0		11,70		C5-
O86	115	M	12,1	25,57		96		59,3		121		45		72		40		80,0		17,87		C5-
O87	116	F	12,3	33,35		109,2		95,7		212		97		152		41		79,0		15,19		C5-
O88	121	F	13	31,47		108		83,6		182		282		82,6		41		95		6,71		C5-
O89	122	M	10	25,54	25,991	84,1	83,9	44,5	46,6	172	170	128	115	91,4	108	55	39	89	81	11,26	4,18	C5-
O90	123	F	12	27,22		89,5		65,4		162		155		83		48		80		5,86		C5-
O91	124	M	13	30,51		100,5		85,1		168		171		89,8		44		71		7,20		C5-
O92	125	M	13	36,79		115,3		102,6		150		174		71,2		44		100		8,49		C5-
O93	126	M	10	28,44	29,227	90	95	59,8	62,3	86	115	118	75	26,4	69	36	31	82	99	5,10	4,62	C5-
O94	127	M	10	25,25		74,4		47,4		84		68		22,4		37		74		6,94		C5-
O95	128	M	11	30,49		93,1		67,7		154		109		94,2		38		82		7,70		C5-
O96	129	M	12	39,22		124		104,2		181		156		110		39		79		8,16		C5-
O97	130	M	12	28,51		92,1		68,5		224		316		123,8		37		102		11,18		C5-
O98	131	F	11	27,03	26,665	95	92	60	59,2	141	156	106	122	70,8	92,6	49	39	84	87	8,77	5,97	C5-
O99	132	M	12	32,09		92,1		72,2		158		64		92,5		50		86		4,91		C5-
O100	133	F	14	29,32	28,361	102,5	99	73,2	70,8	159	163	53	34	85,4	96,2	63	60	95	97	3,66	3,52	C5-
O101	134	M	10	25,59	24,664	84,3	80,1	51,6	52	148	135	110	135	82	95,8	44	32	87	83	5,35	5,03	C5-
O102	136	M	11	37,48	37,305	110,2	109	91,2	95,5	201	212	138	84	123,4	154,2	50	41	83	82	7,30	5,20	C5-
O103	137	F	12	29,85		103,5		88,3		173		171		97,8		41		80		4,49		C5-
O104	139	M	14	44,45		120,2		114,8		250		194		167		44		114		7,72		C5-
O105	140	F	9	25,90		93		51,5		177		119		114,2		39		87		5,89		C5-
O106	141	M	15	48,64		123,5		115,2		232		95		55		55		103		3,59		C5-
O107	146	M	12	32,37		106,1		86		207		282		112,6		38		84		10,20		C5-
O108	147	F	14	26,04	25,279	104	102	72,7	70,5	216	214	88	94	142,4	128,2	56	67	82	86	5,73	5,59	C5+
O109	148	M	16	35,86	33,292	110,8	108,9	109,2	104	166	153	104	82	106,2	86,6	39	50	84	81	7,90	4,25	C5-
O110	149	F	11	29,34		104		70,5		142		75		89		38		75		6,00		C5-
O111	151	F	10	26,00	25,301	83	84	51,7	52,1	161	181	172	142	87,6	101,6	39	51	95	89	10,28	6,78	C5-
O112	152	M	11	26,44		83,5		51,9		187		99		103,2		64		97		7,78		C5-
O113	153	M	13	35,03	35,268	107	105,1	92,5	95,9	130	144	55	90	71	72	48	54	88	93	9,85	4,94	C5-
O114	155	F	10	34,31	34,024	107,5	108	83,5	82,8	167	149	94	73	114,2	86,4	34	48	97	87	6,10	4,07	C5-
O115	156	M	11	31,24				67,5		155		307		51,9		41,7		75,8		5,74		C5-
O116	157	M	11	26,88	26,459	94	96	71,6	70,3	123	134	41	33	62,8	81,4	52	46	90	84	6,13	13,04	C5-
O117	158	F	11	23,84	23,841	85,5	84	54	53,7	171	158	76	51	107,8	89,8	48	58	83	91	7,57	3,73	C5-
O118	160	M	10	23,39	22,464	85	83,6	46,5	46	147	135	150	85	70	77	47	41	84	80	7,75	6,37	C5-

**NOTA:** As siglas da tabela representam: A: Amostra; N: Numeração; S: sexo: (F-Feminino / M-Masculino); ID: idade; IMC: índice de massa corporal, CA: circunferência abdominal; P: peso; COLEST: colesterol total; TRIGL: triglicérides; LDL: colesterol LDL; HDL: colesterol HDL; GLIC: glicose; ATIV: atividade enzimática BChE; CHE2: loco CHE2 (C5+ ou C5-). Os valores 1 e 2 indicam respectivamente antes dos exercícios e após os exercícios.