

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GABRIELLE ARAÚJO DO NASCIMENTO

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE INDICADORES DE OBESIDADE E
DISLIPIDEMIAS E POLIMORFISMO *R3500Q* DO GENE *APOB 100*

CURITIBA

2014

GABRIELLE ARAÚJO DO NASCIMENTO

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE INDICADORES DE OBESIDADE E
DISLIPIDEMIAS E POLIMORFISMO *R3500Q* DO GENE *APOB 100*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II,
do Curso de Biomedicina do Setor de Ciências
Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a Dra. Lupe Furtado Alle

CURITIBA

2014

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Lupe Furtado Alle, por ser sempre tão atenciosa e paciente.

Aos meus pais, Gabriel e Thaciane, e meu irmão, Guilherme, por todo o apoio e amor incondicionais que sempre me deram.

A Luciane, que sempre me ajudou em tudo que eu precisei.

A todo o pessoal do Laboratório de Polimorfismos e Ligação, por sempre estarem dispostos a ajudar.

Ao Daniel, por sempre me escutar e se esforçar ao máximo para me ajudar.

A toda a minha família e amigos, que sempre estiveram do meu lado.

RESUMO

A prevalência das dislipidemias cresceu muito nos últimos anos, especialmente entre as crianças e adolescentes. Essa patologia é caracterizada por um distúrbio no metabolismo dos lipídeos, em que há aumento de LDL-C, TG e diminuição de HDL-C, o que a torna um importante fator de risco para doenças cardiovasculares, como a aterosclerose, além de estar associada à obesidade. Como a dislipidemia é uma doença de etiologia complexa, ocorre interação entre os fatores ambientais e fatores genéticos. Dentre esses, encontra-se o gene candidato *APOB 100*, que está localizado no braço curto do cromossomo 2 (2p24.1). Esse gene codifica a apolipoproteína B-100 (APOB 100), componente proteico das partículas de LDL e essencial para a ligação dessa lipoproteína com seu receptor (LDLR). Dentre as mutações já descritas do gene *APOB 100*, a mais frequente é a mutação *R3500Q* (rs5742904), em que há substituição de G por A no nucleotídeo 10.708, o que gera a troca de uma Arginina por uma Glutamina no códon 3500. Essa mutação provoca alterações no domínio de ligação da APOB 100 com o receptor B/E, o que reduz a afinidade da LDL por esse receptor. Dessa forma, há um prejuízo na captação de LDL pelas células, o que gera um aumento na concentração plasmática dessa lipoproteína e, conseqüentemente, aumento do risco de aterosclerose. Sendo assim, o presente estudo tem como objetivo verificar a influência da mutação *R3500Q* do gene *APOB 100* sobre variáveis antropométricas, clínicas e bioquímicas de 153 crianças e adolescentes (obesos, sobrepeso e eutróficos) de Curitiba (PR). O DNA foi extraído do sangue periférico através da técnica de *salting out* e a mutação foi genotipada pela técnica de genotipagem *Taqman*. A frequência encontrada do genótipo GG foi de 0,941 e do genótipo GA 0,059, sendo que não foi encontrado nenhum indivíduo com o genótipo AA. A frequência observada do alelo mutante (alelo A) foi de $0,029 \pm 0,97$. A frequência da mutação não difere entre crianças e adolescentes com excesso de peso ou obesidade e indivíduos eutróficos ($p = 0,1055$), assim como também não há diferença significativa na frequência da mutação entre os indivíduos que possuem níveis desejáveis de CT e LDL-C e indivíduos que possuem níveis alterados desses lipídeos (para CT, $p = 0,27$ e para LDL-C, $p = 0,31$). As crianças e adolescentes portadores da mutação possuem níveis de LDL-C menores do que os indivíduos com genótipo usual, e concluiu-se que essa alteração pode ter sido causada pelo estrógeno, visto que a maioria dos portadores é do sexo feminino. O genótipo é um fator de risco independente para os níveis plasmáticos de LDL-C ($\beta = 28,09 \pm 8,4$ e $p = 0,001$), assim como o sexo ($\beta = 7,8 \pm 3,9$ e $p = 0,049$).

Palavras chave: Dislipidemia. LDL. *APOB 100*. *R3500Q*.

LISTA DE SIGLAS

AGs – Ácidos Graxos

APOA – Apolipoproteína A

APOB - Apolipoproteína B

APOB 48 – Apolipoproteína B-48

APOB 100 – Apolipoproteína B-100

APOC-II - Apolipoproteína C-II

APOE - Apolipoproteína E

CA – Circunferência Abdominal

CC – Circunferência da Cintura

CETP - Proteína de Transferência de Colesterol Éster

CT – Colesterol Total

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

Gli - Glicose

HDL – Lipoproteína de Alta Densidade

HDL-C – Colesterol ligado à Lipoproteína de Alta Densidade

HF – Hipercolesterolemia Familiar

IDL – Lipoproteína de Densidade Intermediária

IMC – Índice de Massa Corporal

INS – Insulina

LDL - Lipoproteína de Baixa Densidade

LDL-C – Colesterol ligado à Lipoproteína de Baixa Densidade

LDLR – Receptor da Lipoproteína de Baixa Densidade

Lp(a) – Lipoproteína (a)

LT – Lipídeos Totais

mRNA – RNA mensageiro

NaCl – Cloreto de Sódio

OMS – Organização Mundial da Saúde

PAD – Pressão Arterial Diastólica

PAS – Pressão Arterial Sistólica

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SNP – Polimorfismo de Nucleotídeo Simples

TG – Triglicerídeos

VLDL – Lipoproteína de Muito Baixa Densidade

VLDL-C – Colesterol ligado à Lipoproteína de Muito Baixa Densidade

VO_{2máx} - Volume Máximo de Oxigênio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
1.1 OBJETIVOS.....	8
1.1.1 Objetivo geral.....	8
1.1.2 Objetivos específicos.....	8
1.2 JUSTIFICATIVA.....	8
2 REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1 DISLIPIDEMIAS.....	10
2.1.1 Metabolismo dos lipídeos.....	11
2.1.1.1 Via exógena ou intestinal.....	11
2.1.1.2 Via endógena ou hepática.....	12
2.1.2 Classificação, diagnóstico e terapia.....	14
2.1.3 Atividade física.....	15
2.1.4 Dislipidemias e obesidade.....	16
2.1.4.1 Obesidade.....	16
2.1.5 Dislipidemias de causa genética.....	22
2.1.5.1 <i>APOB 100</i>	22
3 METODOLOGIA	24
3.1 PARTICIPANTES DO ESTUDO.....	24
3.2 VARIÁVEIS.....	24
3.3 EXTRAÇÃO DE DNA.....	24
3.4 QUANTIFICAÇÃO E DILUIÇÃO.....	25
3.5 GENOTIPAGEM.....	25
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	25
4 RESULTADOS	28
5 DISCUSSÃO	38
6 CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS	42
ANEXO	47

1 INTRODUÇÃO

A dislipidemia é caracterizada por uma quantidade anormal de lipídeos (como colesterol e triglicerídeos (TG)) no sangue e é considerada um dos principais fatores de risco para doenças cardiovasculares (JUNG; CHOI, 2014; MEDEIROS *et al.*, 2014) que, por sua vez, são as causas mais frequentes de morbidade e mortalidade (LAKKA *et al.*, 2002 *apud* LEITE *et al.*, 2009a).

Os lipídeos são transportados por quatro classes principais de lipoproteínas (cujos níveis podem sofrer alteração nas dislipidemias), incluindo lipoproteína de alta densidade (HDL, do inglês *high density lipoprotein*), lipoproteína de baixa densidade (LDL, do inglês *low density lipoprotein*), lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL, do inglês *very low density lipoprotein*) e quilomícrons (XAVIER *et al.*, 2013). As dislipidemias podem ser primárias ou secundárias, e são classificadas de acordo com o tipo de lipídeo alterado em hipertrigliceridemia isolada (excesso de TG); hipercolesterolemia isolada (excesso de colesterol); hiperlipidemia mista (aumento de colesterol e TG) e colesterol da HDL (HDL-C) baixo (XAVIER *et al.*, 2013).

Em grande parte dos casos, a dislipidemia encontra-se associada ao excesso de peso ou obesidade, sendo que a prevalência de ambas as enfermidades têm crescido de maneira alarmante, especialmente entre as crianças e adolescentes (NETO *et al.*, 2012; WHO, 2013). O incentivo à realização de exercícios físicos é muito importante nesse grupo, visto que a prática de atividade física promove melhora no perfil lipídico e na composição corporal (LEITE *et al.*, 2009b; RIBAS; SILVA, 2014). Além do fator ambiental, a dislipidemia e a obesidade são influenciadas também por componentes genéticos (UUSITUPA, 2005; XAVIER *et al.*, 2013). Por isso, é importante o estudo de polimorfismos em genes relacionados ao metabolismo lipídico.

O objetivo desse estudo é avaliar a associação da mutação *R3500Q* do gene *APOB 100* com variáveis antropométricas, clínicas e bioquímicas de 153 crianças e adolescentes (obesos, sobrepeso e eutróficos) de Curitiba (PR).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

- Verificar a influência do polimorfismo *R3500Q* do gene *APOB 100* em variáveis antropométricas, clínicas e bioquímicas de crianças e adolescentes.

1.1.2 Objetivos específicos

- Investigar associação entre o polimorfismo *R3500Q* do gene *APOB 100* com variáveis antropométricas, como índice de massa corporal (IMC) e circunferência da cintura (CC).
- Avaliar influência do polimorfismo *R3500Q* do gene *APOB 100* na pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD) (variáveis clínicas).
- Analisar efeito do polimorfismo *R3500Q* do gene *APOB 100* em variáveis bioquímicas, como glicemia (gli) em jejum, insulina (INS) em jejum e perfil lipídico (colesterol total (CT), HDL-C, TG, colesterol da LDL (LDL-C), colesterol da VLDL (VLDL-C) e lipídeos totais (LT)).
- Calcular a frequência genotípica e alélica da mutação *R3500Q* na população estudada.
- Comparar as frequências genotípicas e alélicas obtidas com as frequências genotípicas e alélicas descritas na literatura.
- Comparar a frequência da mutação *R3500Q* entre indivíduos com níveis de CT e LDL-C desejáveis e indivíduos com níveis alterados desses lipídeos.
- Comparar a frequência do polimorfismo *R3500Q* entre indivíduos obesos ou sobrepeso e eutróficos.

1.2 JUSTIFICATIVA

A prevalência das dislipidemias e da obesidade tem aumentado em grande parte dos países, devido ao atual estilo de vida (sedentarismo e preferência por alimentos práticos que na maioria das vezes não são saudáveis) (NETO *et al*, 2012; WHO, 2013). Essas patologias estão associadas ao desenvolvimento de diversas

doenças, como aterosclerose, hipertensão, diabetes tipo 2, entre outras (JUNG; CHOI, 2014; MEDEIROS *et al.*, 2014).

É preciso destinar atenção especial ao aumento da prevalência dessas enfermidades em crianças e adolescentes, já que irão trazer consequências também na vida adulta. Dessa forma, é de extrema importância o diagnóstico precoce, para que sejam tomadas medidas a fim de diminuir o risco de doença cardiovascular e outras complicações (WHO, 2013; LEITE *et al.*, 2009a; MEDEIROS *et al.*, 2014).

Tanto a dislipidemia quanto a obesidade possuem, além de uma influência ambiental, componentes genéticos (UUSITUPA, 2005; RANG *et al.*, 2012). A identificação dos fatores genéticos associados é de grande auxílio porque possibilitaria tratamentos individualizados de acordo com as necessidades de cada paciente; já que se sabe que cada indivíduo responde de maneira diferente a determinada terapia de acordo com sua composição genética (SHAWKY; SADIK, 2012).

Há diversos genes relacionados ao metabolismo lipídico, entre eles, o *APOB100*. Esse gene codifica a apolipoproteína B-100 (APOB 100), que é o componente proteico da LDL (HUANG *et al.*, 1986 *apud* NELKEN *et al.*, 2008). Dentre as mutações já descritas desse gene, a mais frequente é a *R3500Q*, que provoca deformações na estrutura da APOB100, prejudicando a ligação da LDL com seu receptor. Como consequência, há um aumento dos níveis plasmáticos de LDL, aumentando o risco de aterosclerose (SORIA *et al.*, 1989; HORVATH *et al.*, 2001). Dessa maneira, o objetivo desse estudo é avaliar a influência dessa mutação em variáveis antropométricas, clínicas e bioquímicas de crianças e adolescentes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DISLIPIDEMIAS

As dislipidemias são caracterizadas por um distúrbio no metabolismo lipídico, e são uma das maiores responsáveis pelas doenças cardiovasculares, como aterosclerose (TONKIN; BYRNES, 2014). Os lipídeos são transportados do tecido de origem para os tecidos nos quais serão armazenados ou consumidos através de lipoproteínas. Estas são formadas por um núcleo central de lipídeos hidrofóbicos (como os TG e os ésteres de colesterol) que é envolvido por fosfolipídeos polares, colesterol livre e apolipoproteínas, conforme mostra a figura 1. As lipoproteínas são classificadas, de acordo com sua densidade, em: HDL, LDL, VLDL e quilomícrons, que estão representadas na figura 2. HDL e LDL são ricas em colesterol, enquanto VLDL e quilomícrons são ricas em TG. Há ainda a *intermediary density lipoprotein* (IDL) e a lipoproteína (a) [Lp(a)], que é formada pela ligação de LDL com a apolipoproteína A (APOA). A função fisiológica da Lp(a) ainda não é conhecida, mas estudos mostram associação com a aterosclerose (NELSON; COX, 2011; RANG *et al.*, 2012; XAVIER *et al.*, 2013).

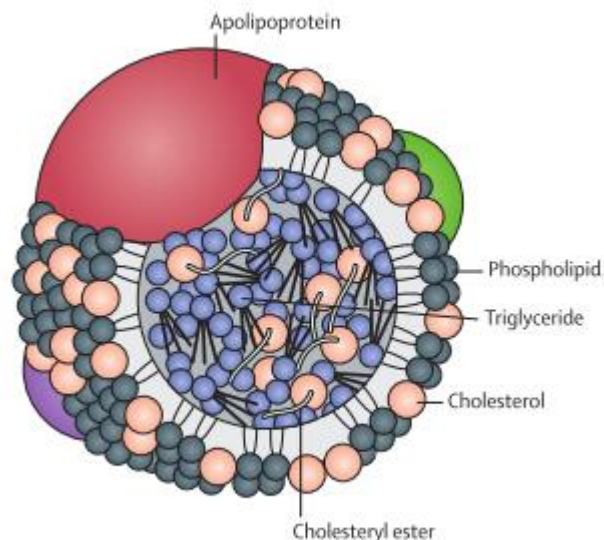


FIGURA 1 – Componentes estruturais das lipoproteínas.

FONTE: Adaptado de RIDKER, 2014.

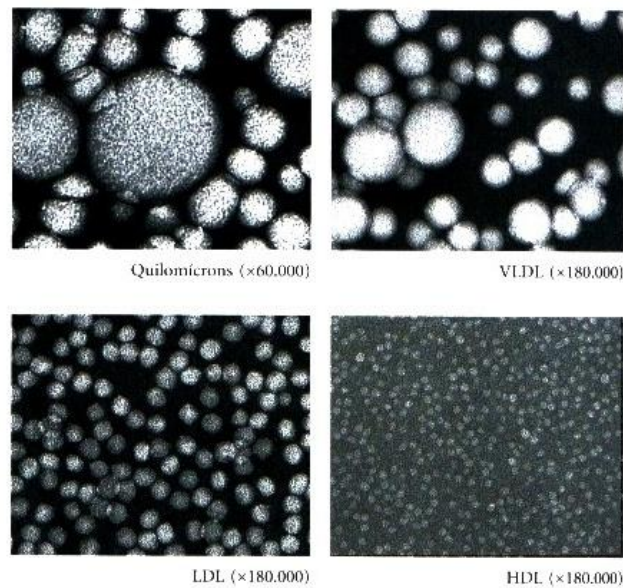


FIGURA 2 - Quatro classes de lipoproteínas, visualizadas ao microscópio eletrônico após coloração negativa. No sentido horário, a partir da parte superior à esquerda: quilomícron, 50 a 200 nm de diâmetro; VLDL, 28 a 70 nm; HDL, 8 a 11 nm e LDL, 20 a 25 nm.

FONTE: Adaptado de NELSON; COX, 2011.

2.1.1 Metabolismo dos lipídeos

2.1.1.1 Via exógena ou intestinal

Os TGs obtidos através da dieta são hidrolisados pelas lipases pancreáticas em diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos (AGs) livres e glicerol. Sais biliares emulsificam esses lipídeos formando micelas, o que facilita a absorção intestinal. Após a absorção, os AGs são utilizados na produção de quilomícrons, juntamente com o colesterol da dieta e apolipoproteínas, como a apolipoproteína B-48 (APOB 48) (exclusiva dessa classe de lipoproteínas), apolipoproteína C-II (APOC-II) e apolipoproteína E (APOE). Os quilomícrons são secretados para o sistema linfático e alcançam a corrente sanguínea, seguindo para grande parte dos tecidos. Nos capilares desses tecidos, os quilomícrons sofrem hidrólise pela lipase lipoproteica liberando AGs livres e glicerol que podem ser armazenados, no caso do tecido adiposo, ou oxidados para obtenção de energia, como no músculo esquelético. Os remanescentes de quilomícrons, desprovidos da maioria dos seus TG, mas ainda contendo colesterol e apolipoproteínas, vão para o fígado, onde se ligam, através da APOE, ao receptor de LDL. Há liberação de colesterol que pode ser armazenado,

oxidado a ácidos biliares, secretado inalterado na bile ou ingressar na via endógena (MURRAY; GRANNER; RODWELL, 2007; NELSON; COX, 2011; RANG *et al.*, 2012; XAVIER *et al.*, 2013).

2.1.1.2 Via endógena ou hepática

No fígado, os TG oriundos da lipogênese (síntese de AGs a partir dos carboidratos), de AGs livres e de remanescentes dos quilomícrons juntam-se ao colesterol e apolipoproteínas (principalmente APOB 100) para serem exportados na forma de VLDL (MURRAY; GRANNER; RODWELL, 2007). As partículas dessa lipoproteína seguem do fígado para a maior parte dos tecidos (como tecido adiposo e músculo esquelético), onde os TG são hidrolisados pela lipase, dando origem a AGs e glicerol que são absorvidos. Devido à hidrólise, as partículas lipoproteicas ficam menores e tornam-se remanescentes de VLDL, também chamados de IDL. Estas são rapidamente removidas do plasma, e contém duas apolipoproteínas: APOB100 e APOE. A remoção adicional de TG das IDLs produz LDL (que ainda contém o complemento total de ésteres de colesterol e possui como única apolipoproteína a APOB 100). A LDL tem grande importância no processo aterogênico, mas, fisiologicamente, fornece o colesterol para incorporação em membranas celulares e para a formação de esteroides. A LDL é captada por todos os tecidos (incluindo o fígado) através da interação dos receptores para LDL com a APOB 100 (GOLDSTEIN *et al.*, 1983 *apud* FAVERO; BYDLOWSKI, 2007). O colesterol pode retornar dos tecidos ao fígado por meio da HDL, o que é chamado de transporte reverso do colesterol, ação que protege o leito vascular contra a aterogênese (NELSON; COX, 2011; RANG *et al.*, 2012; XAVIER *et al.*, 2013) (um esquema do metabolismo lipídico encontra-se na figura 3). Além disso, a HDL tem ação anti-inflamatória, inibe a oxidação da LDL antes que esta se incorpore aos macrófagos para formar as células espumosas, inibe a fixação de moléculas de adesão e monócitos ao endotélio, inibe a trombose, aumenta a função endotelial, a sensibilidade à insulina e a liberação de óxido nítrico. Estudos epidemiológicos mostram também que há uma relação inversa entre a concentração plasmática de HDL e o risco de doenças cardiovasculares (RANG *et al.*, 2012; DI ANGELANTONIO *et al.*, 2009 *apud* TONKIN; BYRNES, 2014).

Durante a hidrólise das VLDLs, podem ocorrer trocas com HDL e LDL através da proteína de transferência de colesterol éster (CETP, do inglês, *cholesteryl ester transfer protein*). Por intermédio dessa proteína, as VLDLs trocam TG por ésteres de colesterol com HDLs e LDLs (XAVIER *et al.*, 2013), o que diminui a concentração de HDL-C e aumenta o conteúdo de TG nas HDLs e LDLs, que sofrem ação da lipase hepática (SALEH; SNIDERMAN; CIANFLONE, 2013 *apud* JUNG; CHOI, 2014). Como resultado dessa hidrólise, formam-se pequenas e densas partículas de HDL e LDL. A diminuição dos níveis de HDL e a formação das LDLs pequenas e densas estão associadas a um maior risco de doença cardiovascular (JUNG; CHOI, 2014; KAUR, 2014).

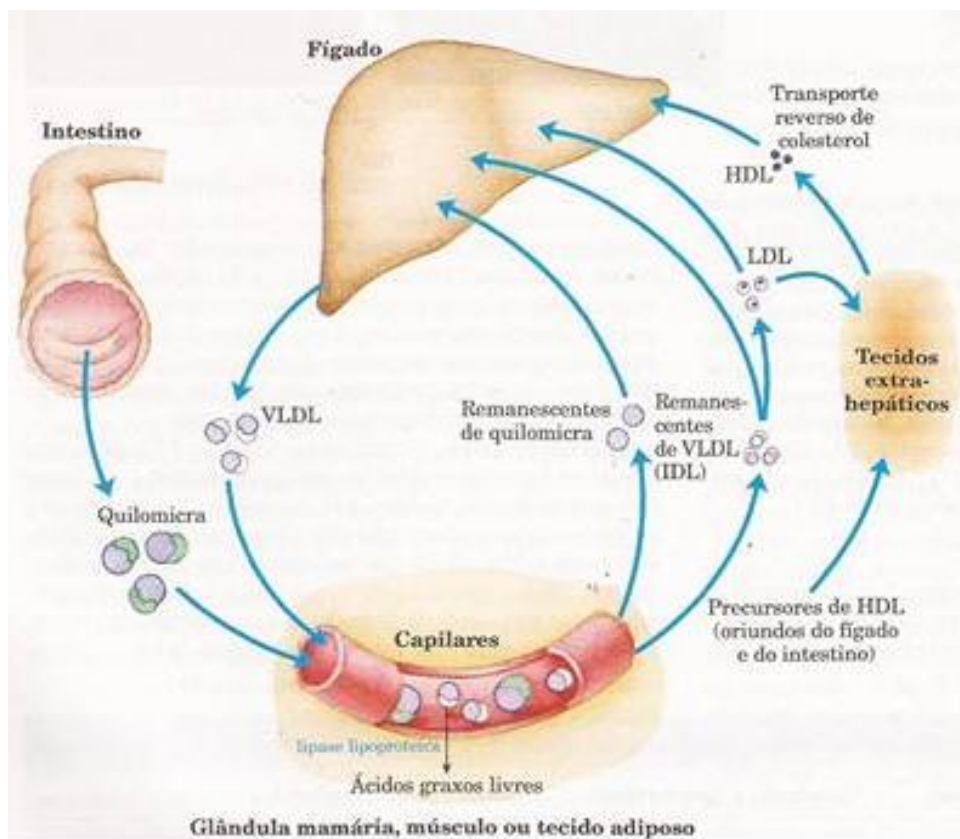


FIGURA 3 – Metabolismo lipídico. Os lipídeos provenientes da dieta são transportados na forma de quilomícrons até os capilares de grande parte dos tecidos (principalmente músculo e tecido adiposo), onde sofrem hidrólise pela lipase, liberando AGs livres e glicerol. Os remanescentes de quilomícrons (contendo na maior parte colesterol e apolipoproteínas) são captados pelo fígado. No fígado, os lipídeos são exportados na forma de VLDL. Essas lipoproteínas seguem para a maioria dos tecidos onde são hidrolisadas pela lipase, tornando-se remanescentes de VLDL (IDL). Estas podem ir direto para o fígado ou, em caso de perda adicional de TG, transformarem-se em LDL. A LDL pode ir para o fígado ou ser captada pelos tecidos extra-hepáticos. O colesterol pode retornar desses tecidos para o fígado pela HDL (transporte reverso do colesterol).

FONTE: NELSON; COX, 2011.

2.1.2 Classificação, diagnóstico e terapia

As dislipidemias são classificadas de acordo com o tipo de lipídeo alterado em hipertrigliceridemia isolada (valores aumentados de TG), hipercolesterolemia isolada (valores aumentados de colesterol), hiperlipidemia mista (valores aumentados de colesterol e TG) e HDL-C baixo (que pode estar associada a aumento do colesterol e/ou dos TG) (XAVIER *et al.*, 2013). Os valores de referência de CT, LDL-C, HDL-C e TG para crianças e adolescentes estão no quadro 1.

Lipídeos	Idade (anos)	Valores (mg/dL)		
		Desejáveis	Limítrofes	Aumentados
CT	2 - 19	< 170	170 – 199	≥ 200
		< 110	110 – 129	≥ 130
LDL-C	2 - 19	< 110	110 – 129	≥ 130
HDL-C	<10	≥ 40	---	---
	10 – 19	≥35	---	---
TG	< 10	≤100	---	> 100
	10 – 19	≥130	---	> 130

QUADRO 1 – Valores de referência de CT, LDL-C, HDL-C e TG em crianças e adolescentes (entre 2 e 19 anos de idade).

FONTE: SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 1996.

A medição do LDL-C é a forma mais usada na prática clínica para mensurar o risco cardiovascular, e é realizada geralmente através da fórmula de Friedewald ($LDL-C = CT - HDL-C - TG/5$, onde $TG/5$ representa o colesterol ligado à VLDL) (XAVIER *et al.*, 2013; JUNG; CHOI, 2014). Entretanto, como a fórmula é baseada na medição de diversos parâmetros, a sua acurácia depende da precisão desses valores. Então, para que sejam obtidos resultados mais confiáveis, foram desenvolvidos novos métodos para medição do LDL-C, como ensaios homogêneos baseados em detergentes seletivos que separam quilomícrons, VLDL e HDL de LDL (CONTOIS; WARNICK; SNIDERMAN, 2011 *apud* JUNG; CHOI, 2014) e um ensaio homogêneo para medida das pequenas e densas partículas de LDL (ITO *et al.*, 2011 *apud* JUNG; CHOI, 2014).

A APOB é um ótimo indicador das lipoproteínas aterogênicas no plasma, já que cada partícula de LDL, IDL e VLDL contém apenas uma partícula de APOB.

Dessa forma, a medição das partículas de APOB deveria ser incluída nos testes laboratoriais em indivíduos com risco de doença arterial coronária, o que é particularmente importante no caso de LDLs pequenas e densas. É um bom método imunológico, de fácil análise em aparelhos convencionais e não necessita de jejum (MASHAYEKHI *et al.*, 2014; XAVIER *et al.*, 2013).

O diagnóstico de dislipidemias na população pediátrica é especialmente importante, pois há um grande risco de complicações cardiovasculares em idade precoce (THOMAS *et al.*, 2007 *apud* LEITE *et al.*, 2009a). Nesse diagnóstico podem ser utilizadas medidas antropométricas simples, como mostra o estudo realizado por Leite *et al.* (2009a), em que foi encontrada correlação positiva entre CA e IMC com os TG e negativa com HDL-C. Com o diagnóstico precoce, podem ser tomadas medidas preventivas e terapêuticas para que o risco cardiovascular seja reduzido (LEITE *et al.*, 2009a).

A princípio, a recomendação às crianças dislipidêmicas é uma alimentação mais saudável e realização de atividades físicas. Caso essa mudança no estilo de vida não seja suficiente para que os níveis lipídicos alcancem os valores recomendados, pode ser indicado o uso de drogas hipolipemiantes quando houver: a) dislipidemia familiar com níveis de LDL-C > 190 mg/dL; b) antecedentes familiares de aterosclerose prematura ou, no mínimo dois ou mais fatores de risco, com LDL-C > 160 mg/dL; c) manifestação de aterosclerose, com LDL-C > 130 mg/dL (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 1996).

2.1.3 Atividade física

O perfil lipídico pode ser melhorado através de exercícios físicos, como mostra o estudo realizado por Milano *et al.* (2013). Após uma intervenção física de 12 semanas com 24 adolescentes obesos e 51 eutróficos, foi observada redução no IMC, circunferência abdominal (CA), porcentagem de gordura, PAS, PAD, TG, nível de glicose 120 minutos após ingestão de glicose com água (Gli 120), insulina, INS 120, e aumento do volume máximo de oxigênio ($VO_{2máx}$) (MILANO *et al.*, 2013). Resultados semelhantes foram encontrados em um estudo realizado por Leite *et al.* (2009b), onde foram analisados os efeitos de exercícios físicos e orientação nutricional na composição corporal, aptidão física, perfil lipídico e resistência insulínica entre adolescentes obesos com e sem síndrome metabólica. Em ambos

os grupos, após a intervenção, houve redução da massa corporal, IMC escore-Z, CA, massa gorda, TG e aumento na estatura, HDL-C e $VO_{2\text{pico}}$ (LEITE *et al.*, 2009b).

Geralmente, os efeitos mais significativos do exercício físico são nos níveis de HDL-C e TG. Pode não haver mudança no nível total de colesterol e de frações do LDL-C, mas pode haver mudança na qualidade das subfrações do LDL-C, como aumento dos níveis de partículas grandes de LDL e diminuição dos níveis de partículas pequenas de LDL (THOMAS *et al.*, 2007 *apud* LEITE *et al.*, 2009b).

2.1.4 Dislipidemias e obesidade

Há uma associação positiva entre excesso de peso e dislipidemias, de forma que o sobrepeso reflete em alterações lipídicas (BATISTA FILHO; RISSIN, 2003 *apud* NETO *et al.*, 2012).

Nas dislipidemias relacionadas à obesidade, há aumento dos níveis plasmáticos de AGs livres e TG, diminuição de HDL e composição anormal de LDL. Tais alterações ocorrem por causa de uma liberação incontrolada de AGs do tecido adiposo (especialmente tecido adiposo visceral) através da lipólise, o que causa aumento dos AGs no fígado e aumento na produção de VLDL. Essa elevação nos níveis de AGs pode diminuir a expressão do mRNA ou a atividade da lipoproteína lipase no tecido adiposo e no músculo esquelético, enquanto o aumento na produção de VLDL pode inibir a lipólise dos quilomícrons, o que causa hipertrigliceridemia (KLOP *et al.*, 2012 *apud* JUNG; CHOI, 2014). A alta na concentração de TG ativa a proteína de transferência CETP, promovendo a diminuição de HDL e a formação de pequenas e densas partículas de LDL, que estão associadas a um maior risco de doença cardiovascular (JUNG; CHOI, 2014).

2.1.4.1 Obesidade

A obesidade já é considerada uma epidemia pela Organização Mundial da Saúde (SHAWKY; SADIK, 2012), visto que o número de indivíduos obesos vem atingindo proporções alarmantes tanto nos países de alta renda quanto nos países de baixa renda (BULBUL; HOQUE, 2014). De 1980 a 2008 a prevalência global de obesidade quase dobrou, sendo que em 2008 mais de 1,4 bilhões de adultos estavam acima do peso. Desses, cerca de 200 milhões de homens e 300 milhões de

mulheres eram obesos (WHO, 2013). Dados de 2013 revelam que 50,8% dos brasileiros estão acima do peso, sendo que, destes, 17,5% são obesos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). Nos EUA, mais de um terço dos adultos (35,7%) são obesos (CDC, 2012). Devido às diversas implicações para a saúde associadas à obesidade, ela é estimada como a segunda principal causa de morte evitável (MASTERS *et al.*, 2013 *apud* JAHANGIR; SCHUTTER; LAVIE, 2014).

A obesidade e o excesso de peso são definidos como um acúmulo de gordura anormal ou excessivo que apresenta um risco para a saúde. Um indivíduo é considerado obeso quando seu (IMC), que é calculado pelo peso (em quilogramas) dividido pelo quadrado da altura (em metros), é maior do que 30. Quando o indivíduo possui um IMC igual ou maior a 25, é considerado acima do peso (WHO, 2013). Também existem outros critérios, menos utilizados, como peso corporal, medida da cintura, relação cintura-quadril, percentual de gordura e quantidade de gordura visceral e subcutânea (UUSITUPA, 2005).

Para as crianças e adolescentes, a classificação considera a idade e o sexo, como mostram os gráficos 1 e 2. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a criança ou adolescente é considerado acima do peso quando se encontra acima do percentil 85, e obeso quando se encontra acima do percentil 97 (MELO, 2011).

BMI-for-age BOYS

5 to 19 years (percentiles)

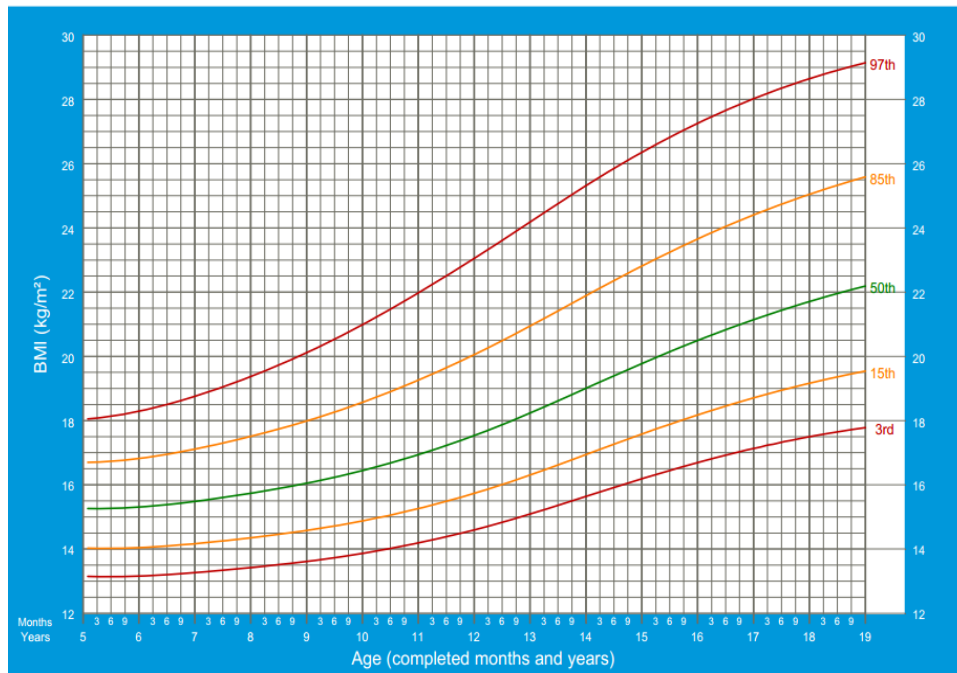


GRÁFICO 1 – IMC de acordo com a idade para meninos.
Fonte: WHO, 2007.

BMI-for-age GIRLS

5 to 19 years (percentiles)

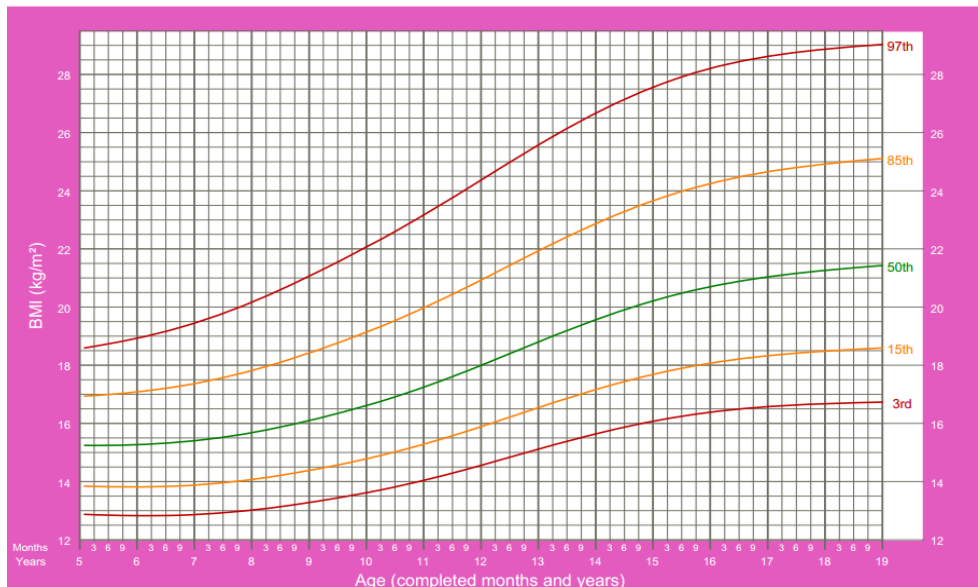


GRÁFICO 2 – IMC de acordo com a idade para meninas.
Fonte: WHO, 2007.

A obesidade ocorre devido a uma falta de equilíbrio entre a ingestão e o gasto de calorias. Além de a população estar consumindo mais alimentos ricos em gordura, há uma diminuição na prática de atividades físicas devido ao aumento de

formas de trabalho sedentárias, mudanças nos meios de transporte e urbanização (WHO, 2013).

Nos países em desenvolvimento, apesar de ainda haver problemas como doenças infecciosas e desnutrição, a quantidade de indivíduos obesos ou acima do peso está crescendo rapidamente. A obesidade vem aumentando devido à alimentação inadequada no período pré-natal, infância e adolescência, e ao consumo elevado de alimentos ricos em gordura, sal, açúcar, alta densidade energética e pobres em nutrientes; que são mais baratos mas possuem baixa qualidade nutricional (WHO, 2013).

A obesidade é um fator de risco para diversas doenças, como doenças cardiovasculares, asma, desordens ortopédicas, anormalidades no fígado, diabetes tipo 2, dislipidemias, resistência à insulina, síndrome do ovário policístico e alguns tipos de câncer (BIENERTOVÁ-VASKŮ *et al.*, 2010; MESSIAH *et al.*, 2012 *apud* BAIRDAIN *et al.*, 2014; JUNG; CHOI, 2014). Parte dessas doenças impossibilita o indivíduo de realizar atividades físicas, o que contribui ainda mais para o ganho de peso (BAIRDAIN *et al.*, 2014).

As crianças requerem uma atenção especial, pois, segundo a OMS, mais de 40 milhões de crianças com menos de cinco anos de idade estavam acima do peso em 2011 (WHO, 2013). Nos EUA, em 2012, aproximadamente 17% (12,5 milhões) das crianças e adolescentes eram obesos (CDC, 2011). Foi observado um rápido aumento na obesidade e excesso de peso entre crianças com menos de cinco anos: 60% de 1990 a 2010, com um aumento estimado de 9% de 2010 para 2020, sendo que o aumento mais notável ocorre nos países de baixa e média renda (KELISHADI *et al.*, 2014). A tecnologia presente no nosso dia a dia é um dos principais motivos pelos quais as crianças e adolescentes dedicam menos tempo a atividades físicas, já que geralmente preferem um lazer passivo, como televisão, computador e videogame, a um lazer ativo (como pular corda e andar de bicicleta) (BRACCO *et al.*, 2002 *apud* MILANO, 2008; SANTOS *et al.*, 2010 *apud* RIBAS; SILVA, 2014). Quando a criança é obesa, haverá maior risco de obesidade, morte prematura e incapacidade na sua vida adulta, sendo que aproximadamente 70% das crianças e adolescentes obesos tornam-se adultos obesos (REILLY, 2007 *apud* CETATEANU; JONES, 2014). Além disso, outros problemas podem ocorrer ainda na infância, como dificuldades respiratórias, aumento no risco de fraturas, hipertensão,

marcadores precoces da doença cardiovascular, resistência à insulina e efeitos psicológicos (WHO, 2013).

A atividade física é extremamente importante para prevenção da obesidade em crianças, mas não tem sido incentivada o suficiente nas escolas, principalmente no que diz respeito às meninas (FERMINO *et al.*, 2010 *apud* RIBAS; SILVA, 2014). Há diversos benefícios com a atividade física para as crianças, como controle do peso, diminuição do colesterol e resistência insulínica, pressão arterial baixa, bem-estar e maior predisposição para vida ativa na adolescência (RODRIGUES *et al.*, 2013 *apud* RIBAS; SILVA, 2014).

No Brasil, dados de 2009 mostram que um terço das crianças de 5 a 9 anos estava acima do peso (mais de oito vezes a frequência de déficit de peso) e 14,3% estavam obesas, sendo que os índices foram maiores para meninos. Analisando-se separadamente as regiões do Brasil, verificou-se que as maiores taxas de excesso de peso e obesidade encontravam-se no Sudeste, Sul e Centro-oeste (de 32% a 40%, enquanto no Norte e Nordeste oscilou de 25% a 30%). Em todas as regiões, as taxas foram maiores na área urbana do que na área rural. Com relação à renda familiar, a prevalência de excesso de peso e obesidade aumentou de acordo com a renda (IBGE, 2010).

Dentre os adolescentes (10 a 19 anos), um quinto estava com excesso de peso (seis vezes maior do que a frequência de déficit de peso), e 4,9% estavam obesos. Os maiores índices foram encontrados na população masculina e no grupo de 10 a 11 anos. Assim como para as crianças, a prevalência do excesso de peso e obesidade foi maior no Sudeste, Sul e Centro-oeste (20 a 27%, sendo que no Norte e Nordeste foi de 16 a 19%), com maior frequência na região urbana. A prevalência do excesso de peso aumentou de acordo com a renda para ambos os sexos, assim como a obesidade no sexo masculino. Já no sexo feminino, a obesidade apresentou uma relação curvilínea com a renda familiar, com as maiores prevalências observadas nas classes intermediárias de renda (IBGE, 2010).

O ambiente alimentar em que a criança ou adolescente está envolvido também colabora com o desenvolvimento da obesidade, como mostra o estudo realizado por Cetateanu e Jones (2014), em que foi verificada associação entre a prevalência de obesidade e excesso de peso em crianças inglesas com o ambiente alimentar a que estão submetidas. Foi visto que os índices são maiores em locais de baixa renda, onde há maior quantidade de restaurantes com comidas que não são

saudáveis, como *fast-food* (o que é conhecido como “paradoxo obesidade-fome”) (TANUMIHARDJO *et al.*, 2007 *apud* CETATEANU; JONES, 2014). Os autores acreditam que esses resultados podem ser aplicados a outros países desenvolvidos, e sugerem que devem ser adotadas medidas para reduzir a quantidade de restaurantes *fast-food*, aumentar as opções de comidas mais saudáveis, e aumentar os espaços destinados à atividade física (CETATEANU; JONES, 2014).

Além dos problemas físicos causados pela obesidade, podem também estar presentes problemas psicológicos, como baixa autoestima, autoavaliação negativa, ansiedade e depressão (LOFRANO-PRADO *et al. apud* ABDEL-AZIZ *et al.*, 2014). Para avaliar a qualidade de vida relacionada à saúde e comorbidades psiquiátricas como ansiedade e depressão, um estudo realizado por Abdel-Aziz *et al.* (2014) relacionou esses parâmetros com o IMC. Foi verificado, através de questionários respondidos pelos pais e pelas próprias crianças, que as crianças e adolescentes obesos possuíam qualidade de vida menor do que não obesos. O IMC e a CA são fatores de risco independentes para a qualidade de vida, sendo que esta é mais afetada conforme aumenta a duração e o grau de obesidade (que é refletido pelo aumento do IMC e CA). A ansiedade e depressão foram pré-existentes ou subsequentemente diagnosticadas em todas as crianças e adolescentes obesos, o que foi significativamente maior do que os não obesos; quanto maior o IMC, maior o grau de ansiedade e depressão (ABDEL-AZIZ *et al.*, 2014).

A obesidade está associada tanto a componentes genéticos quanto aos hábitos alimentares e ao estilo de vida de uma maneira geral (UUSITUPA, 2005). Já se sabe que há fatores genéticos envolvidos no comportamento alimentar, mas os mecanismos responsáveis por eles ainda não foram bem elucidados (BIENERTOVÁ-VAŠKŮ *et al.*, 2010). Essa dificuldade é encontrada porque há uma complexa interação entre os fatores do estilo de vida e os fatores genéticos, além da variabilidade genética entre os diferentes grupos étnicos (DIAMOND, 2003 *apud* UUSITUPA, 2005).

Estudos com gêmeos sugerem uma herdabilidade da massa corporal entre 40% a 70% com uma concordância de 0,7-0,9 entre gêmeos monozigóticos e 0,35-0,45 entre gêmeos dizigóticos (STUNKARD *et al.*, 1990 *apud* SHAWKY; SADIK, 2012).

2.1.5 Dislipidemias de causa genética

As dislipidemias podem ser primárias ou secundárias. A forma primária ocorre devido a uma combinação de dieta e genética (RANG *et al.*, 2012), enquanto a dislipidemia secundária pode ocorrer devido a outras condições, como obesidade, diabetes mellitus, alcoolismo, síndrome nefrótica, insuficiência renal crônica, hipotireoidismo, doença hepática e administração de fármacos (RANG *et al.*, 2012; MEDEIROS *et al.*, 2014).

Estudos familiares e com gêmeos mostram que os fatores genéticos são responsáveis por 40% a 80% da variação populacional nos níveis de LDL-C (FENGER *et al.*, 2008 *apud* SHEN *et al.*, 2010). Existem algumas formas raras de hipercolesterolemia monogênica (como a hipercolesterolemia familiar (HF), em que a principal causa é uma mutação no gene que codifica o receptor de LDL, e o defeito familiar da apolipoproteína B-100) (FARROKHI *et al.*, 2011), mas geralmente tal variabilidade nos níveis de LDL-C ocorre devido à interação entre fatores ambientais e diversos genes. Entre esses genes encontra-se o gene *APOB 100*.

2.1.5.1 *APOB 100*

O gene *APOB 100* possui 43 kb de comprimento, 28 íntrons e 29 éxons e está localizado no braço curto do cromossomo 2 (2p24.1) (AWAD; EL-TARRAS, 2011; LAW *et al.*, 1985 *apud* FARROKHI *et al.*, 2011), conforme mostra a figura 4.

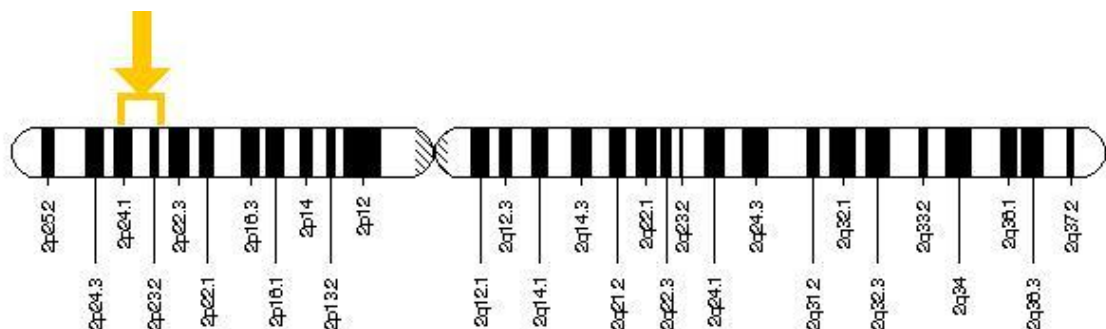


FIGURA 4 – Estrutura do cromossomo 2, com destaque para a região em que se encontra o gene *APOB100*.

FONTE: GENETICS HOME REFERENCE, 2012.

Esse gene codifica a apolipoproteína B-100 (APOB 100), que é uma proteína de 550 kDa com 4536 resíduos de aminoácidos secretada principalmente pelo fígado (HUANG *et al.*, 1986 *apud* NELKEN *et al.*, 2008; AWAD; EL-TARRAS, 2011; JELASSI *et al.*, 2013). Entre outras funções, a APOB 100 é o componente proteico das partículas de LDL e funciona como um ligante para o receptor de LDL (LDLR). Dessa forma, mutações na APOB 100 prejudicam a ligação da LDL ao LDLR, diminuindo a internalização das partículas de LDL. Como resultado, há uma hipercolesterolemia moderada a severa que aumenta o risco de início precoce de aterosclerose (HORVATH *et al.*, 2001). Alguns estudos confirmam a associação da mutação *R3500Q* com os níveis de LDL-C (SHEN *et al.*, 2010).

Foram identificadas algumas mutações no gene *APOB 100*, como *R3500Q* (SORIA *et al.*, 1989), *R3500W* (GAFFNEY *et al.*, 1995 *apud* FARROKHI *et al.*, 2011) e *R3531C* (PULLINGER *et al.*, 1995 *apud* FARROKHI *et al.*, 2011).

A mutação *R3500Q* (rs5742904) é a mais frequente e a primeira descrita. Há um polimorfismo de nucleotídeo simples (SNP), havendo substituição de G por A no nucleotídeo 10.708, o que gera troca de uma Arginina por uma Glutamina no códon 3500 (INNERARITY *et al.*, 1990; JACOBSEN *et al.*, 2002; JELASSI *et al.*, 2013). Tal mutação provoca alterações que interferem na conformação do domínio de ligação da APOB 100 com o receptor B/E e reduz a afinidade da LDL por esse receptor, aumentando assim os níveis séricos de LDL (FORTI *et al.*, 2003).

A mutação *R3500Q* é a principal causa do defeito familiar da apolipoproteína B-100, que é uma desordem autossômica co-dominante causada por mutações no gene *APOB 100* (INNERARITY *et al.*, 1990). Entretanto, a penetrância do alelo mutante não é de 100% (TRAPANI; SEGATTO; PALLOTTINI, 2012). Além disso, o gene *APOB 100* é a segunda principal causa de HF (FARROKHI *et al.*, 2011).

3 METODOLOGIA

Esse estudo provém de uma parceria entre o Departamento de Genética da UFPR (Laboratório de Polimorfismo e Ligação) e o Departamento de Educação Física da UFPR (Núcleo de Qualidade de Vida – NQV).

3.1 PARTICIPANTES DO ESTUDO

A amostra é constituída por 153 crianças e adolescentes (obesos, sobrepeso e eutróficos) da cidade de Curitiba (PR) com idade entre 9 e 17 anos (média de $13,75 \pm 1,74$ anos), sendo 78 meninos e 75 meninas. Os participantes do estudo receberam explicações sobre a pesquisa e seus pais ou responsáveis assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (em anexo).

3.2 VARIÁVEIS

Foram observadas variáveis antropométricas, clínicas e bioquímicas.

Dentre as medidas antropométricas, encontram-se a massa corporal (kg), estatura (m), IMC (kg/m^2), e CC (cm). Os dados antropométricos foram coletados de acordo com o *Anthropometric Standardization Reference Manual* (BRUCE, 2003), sendo que foram obtidas três medidas e o valor mediano entre elas foi considerado.

As variáveis clínicas analisadas foram a PAS e PAD (mmHg), e as bioquímicas foram glicemia em jejum (mg/dL), insulina em jejum (microUI/mL) e perfil lipídico (CT, HDL-C, TG, LDL-C, VLDL-C e LT) (mg/dL). A coleta das amostras sanguíneas foi realizada no período da manhã, com jejum de 8 a 12 horas.

3.3 EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA foi extraído pela técnica de *salting out*, de acordo com o método de Lahiri e Nurnberger (1991), com modificações.

São coletados 10 ml de sangue em EDTA, e esse sangue é centrifugado para que haja separação dos leucócitos. A camada leucocitária é colocada em *falcon* de 15 ml, e completa-se o volume para 10 ml com TKM1. São adicionados 125 μl de IGEPAL CA-630 (detergente solubilizador de membrana), e mistura-se no

vórtex ou manualmente. O material é centrifugado e o sobrenadante é desprezado. Completa-se o volume para 10 ml de TKM1 e ressuspende-se o precipitado com pipeta Pasteur, até que se torne homogêneo. Em seguida, é realizada a centrifugação. Os últimos dois passos são repetidos até que o precipitado esteja claro.

São adicionados 800 µl de TKM2, o precipitado é ressuspendido com a ponteira e o volume é transferido para um microtubo de 1,5 ml. Em seguida, adiciona-se 50 µl de SDS 10% e mistura-se, e então se incuba o material em banho-maria a 55°C overnight.

Os microtubos são retirados do banho-maria e são adicionados 300 µl de solução saturada de NaCl 5M. Em seguida, são colocados no vórtex (ocorre precipitação das proteínas).

O material é centrifugado, de forma que o sobrenadante contém o DNA, e o precipitado, as proteínas. Vira-se o sobrenadante para um tubo de ensaio, e nesse tubo adicionam-se dois volumes de etanol absoluto gelado (em relação ao volume inicial), para que ocorra a renaturação do DNA. Em seguida, tampa-se o tubo com parafilme e inverte-se delicadamente até que apareça a “nuvem” de DNA.

O DNA é pescado com a ponteira cortada e colocado em um novo microtubo, que fica na estufa a 37°C para secagem do álcool.

Em seguida, o DNA é ressuspendido com 200 µl de TE (conservante de DNA). Os microtubos ficam em banho-maria a 55°C por até três dias, o que permite a obtenção de uma solução mais viscosa.

3.4 QUANTIFICAÇÃO E DILUIÇÃO

A concentração do DNA foi determinada através de um equipamento chamado *Nanodrop*®. De acordo com essa concentração, foi feita a diluição das amostras com água Mili-Q para que fosse atingida a concentração desejada de DNA (20 ng/µl).

3.5 GENOTIPAGEM

A genotipagem foi realizada por *Taqman SNP Genotyping Assay* (*Applied Biosystems*). O aparelho utilizado foi o *Applied Biosystems Viia 7 Real-Time PCR*

System, sendo que foram feitas as seguintes etapas: 1) 50°C por 2 minutos, 2) 95°C por 10 minutos, 3) 50 ciclos de 95°C por 15 segundos, intercaladas por 62°C por 1 minuto, 4) 60°C por 2 minutos. Em cada reação foram incluídas três amostras controle previamente sequenciadas, que representam os três possíveis genótipos.

Primeiramente, aumenta-se a temperatura para que haja desnaturação do DNA. Em seguida, a temperatura é reduzida para que ocorra anelamento dos primers em posições específicas (a temperatura é definida de acordo com a sequência de nucleotídeos dos primers). Por fim, a temperatura é novamente aumentada para que a DNA polimerase faça a duplicação da cadeia a partir dos primers (extensão). Esse ciclo é repetido 50 vezes, gerando uma amplificação específica do DNA.

Na sequência de DNA liga-se uma sonda, que apresenta em uma extremidade um fluoróforo, e na outra extremidade um *quencher* (molécula que aceita energia do fluoróforo na forma de luz). Devido a atividade exonucleásica 5'→3' da *Taq*DNA polimerase a sonda é clivada, ocasionando a liberação do fluoróforo e aumentando a intensidade da fluorescência. Conforme os ciclos vão ocorrendo, a fluorescência vai aumentando de acordo com a quantidade de DNA amplificado. Quando somente uma das fluorescências está presente, pode-se dizer que a amostra é homocigota para aquele alelo; se as duas fluorescências são encontradas, a amostra é considerada heterocigota (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004; LIMA, 2013).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis foram testadas quanto à normalidade por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov com correção de Lilliefors. As médias das variáveis foram comparadas por testes paramétricos (teste T de Student) e não paramétricos (teste de Mann-Whitney), conforme sua distribuição. As frequências dos genótipos e alelos foram obtidas por contagem direta e comparadas por teste do qui-quadrado. Foi testado o equilíbrio de Hardy-Weinberg, referente às frequências genotípicas do SNP encontrado na amostra. As frequências encontradas no estudo foram comparadas com as frequências observadas em outras pesquisas através do teste do qui-quadrado. Os indivíduos foram separados de acordo com seu IMC, e as frequências genotípicas e alélicas desses grupos foram obtidas por contagem direta

e comparadas por teste exato de Fisher. A amostra também foi estratificada de acordo com os níveis lipídicos, e as frequências genóticas e alélicas dos grupos foram obtidas por contagem direta e comparadas através do teste de qui-quadrado com correção de Yates. A análise de regressão múltipla foi utilizada para testar a hipótese de que as variáveis são fatores de risco independentes para dislipidemia.

4 RESULTADOS

Foi realizada uma análise descritiva das crianças e adolescentes, levando em consideração todas as variáveis. Na tabela 1 estão representadas as variáveis com suas respectivas médias, erro padrão da média, mediana e desvio padrão.

TABELA 1 – N, MÉDIA +- ERRO PADRÃO DA MÉDIA, MEDIANA E DESVIO PADRÃO DE TODAS AS CRIANÇAS E ADOLESCENTES, PARA CADA UMA DAS VARIÁVEIS ANALISADAS

Variáveis	N	Média ± Erro Padrão da Média	Mediana	Desvio Padrão
Idade	153	13,75 ± 0,14	14,00	1,74
IMC	153	27,15 ± 0,45	27,03	5,53
CC	97	81,40 ± 1,20	81,33	11,78
PAS	111	109,35 ± 1,21	110,00	12,75
PAD	111	66,50 ± 0,95	65,00	10,06
INS	152	14,22 ± 0,80	11,60	9,88
Gli	153	85,58 ± 0,79	85,00	9,76
CT	153	159,40 ± 2,63	157,00	32,57
HDL-C	153	50,69 ± 0,92	49,90	11,32
LDL-C	152	86,62 ± 2,01	83,04	24,75
VLDL-C	97	20,58 ± 1,17	16,00	11,56
LT	97	535,87 ± 10,83	511,25	106,66
TG	153	108,38 ± 4,91	88,00	60,75

NOTA: O N varia devido à falta de dados de alguns indivíduos.

Foram calculadas as frequências alélicas e genóticas da mutação *R3500Q* do gene *APOB100* na amostra total, conforme mostra a tabela 2.

TABELA 2 – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DA MUTAÇÃO *R3500Q* (RS5742904) DO GENE *APOB100*

Genótipo	N	%	Alelos	N	% ± EP
GG	144	94,12	G	297	97,06 ± 0,97
GA	9	5,88			
AA	0	0	A	9	2,94 ± 0,97
Total	153	100	Total	306	

As frequências genóticas encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg, sendo o $\chi^2 = 0,14$ e $p = 0,708$.

Também foi realizada uma análise descritiva estratificando as crianças e adolescentes de acordo com o genótipo. Na tabela 3 estão representadas as variáveis juntamente com a média, erro padrão da média, mediana e desvio padrão

entre os portadores do genótipo usual, enquanto na tabela 4 estão representados os dados dos portadores da mutação.

TABELA 3 - N, MÉDIA +- ERRO PADRÃO DA MÉDIA, MEDIANA E DESVIO PADRÃO DAS CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM O GENÓTIPO USUAL (GG) PARA CADA UMA DAS VARIÁVEIS ANALISADAS

Variáveis	N	Média	±	Erro Padrão da Média	Mediana	Desvio Padrão
Idade	144	13,70	±	0,15	14,00	1,76
IMC	144	27,17	±	0,46	27,03	5,50
CC	88	81,51	±	1,25	81,32	11,73
PAS	105	109,73	±	1,26	110,00	12,95
PAD	105	66,81	±	1,00	68,00	10,21
INS	143	14,01	±	0,78	11,70	9,31
Gli	144	85,46	±	0,83	85,00	9,93
CT	144	160,24	±	2,73	157,35	32,82
HDL-C	144	50,67	±	0,95	49,60	11,46
LDL-C	143	88,15	±	2,05	85,70	24,55
VLDL-C	88	19,36	±	0,88	15,71	8,29
LT	88	532,07	±	10,35	512,93	97,13
TG	144	105,00	±	4,39	87,50	52,68

NOTA: O N varia devido à falta de dados de alguns indivíduos.

TABELA 4 - N, MÉDIA +- ERRO PADRÃO DA MÉDIA, MEDIANA E DESVIO PADRÃO DAS CRIANÇAS E ADOLESCENTES PORTADORES DA MUTAÇÃO (GA) PARA CADA UMA DAS VARIÁVEIS ANALISADAS.

Variáveis	N	Média	±	Erro Padrão da Média	Mediana	Desvio Padrão
Idade	9	14,56	±	0,38	14,00	1,13
IMC	9	26,69	±	2,09	27,44	6,27
CC	9	80,28	±	4,31	82,30	12,94
PAS	6	102,67	±	2,40	102,00	5,89
PAD	6	61,00	±	1,84	60,00	4,52
INS	9	17,56	±	5,67	11,50	17,00
Gli	9	87,51	±	2,14	85,70	6,42
CT	9	145,96	±	8,70	147,70	26,10
HDL-C	9	51,00	±	3,17	49,90	9,52
LDL-C	9	62,45	±	4,26	66,35	12,77
VLDL-C	9	32,51	±	8,70	18,34	26,09
LT	9	572,93	±	59,82	502,33	179,46
TG	9	162,53	±	43,49	91,68	130,46

Foi realizada uma comparação entre as médias das variáveis das crianças e adolescentes com o genótipo usual e portadores da mutação. Na tabela 5, estão representadas as variáveis com as respectivas médias dos usuais e portadores, juntamente com o valor de p.

TABELA 5 – COMPARAÇÃO ENTRE AS MÉDIAS DAS VARIÁVEIS DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM O GENÓTIPO USUAL E PORTADORES DA MUTAÇÃO

Variáveis	Média Usuais	Média Portadores	P
IMC	27,17	26,69	0,798
CC	81,51	80,28	0,767
Gli	85,46	87,51	0,542
CT	160,24	145,96	0,203
HDL-C	50,67	51,00	0,932
LDL-C	88,15	62,45	0,002*
VLDL-C	19,36	32,51	0,114
PAS	109,73	102,67	0,124
PAD	66,81	61,00	0,094
INS	14,01	17,56	0,759
LT	532,07	572,93	0,879
TG	105,00	162,53	0,254

* A única variável em que foi observada diferença significativa foi o LDL-C.

Nota: As variáveis paramétricas (IMC, CC, Gli, CT, HDL-C e LDL-C) foram comparadas pelo Teste t de Student, enquanto as variáveis não paramétricas (PAS, PAD, INS, VLDL-C, LT e TG) foram comparadas pelo Teste de Mann-Whitney.

Como é possível observar, a única variável em que foi observada diferença significativa foi o LDL-C. A distribuição do LDL-C para o genótipo usual e para o portador está representada na figura 5.

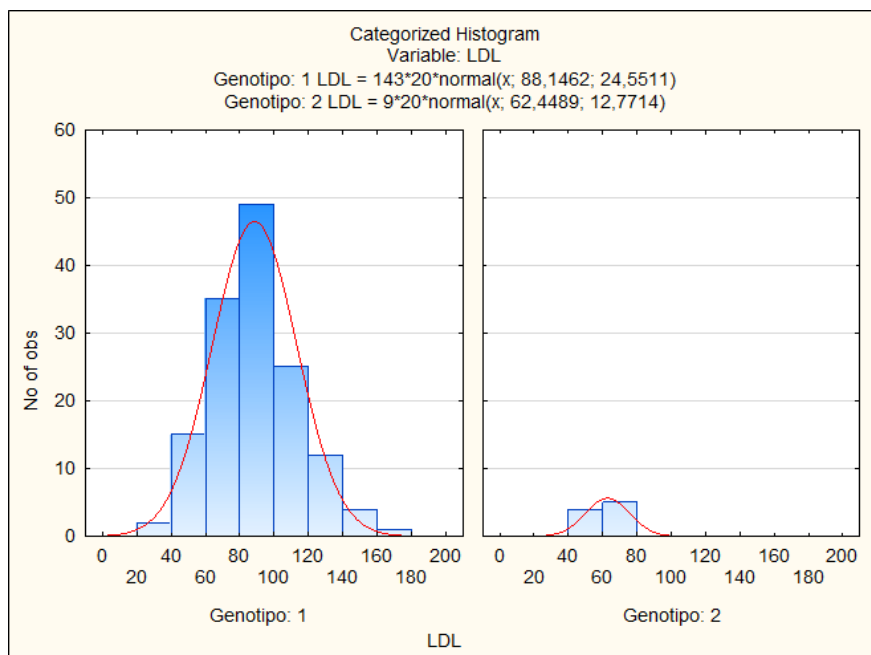


FIGURA 5 – Histograma do LDL-C para os indivíduos com o genótipo usual (genótipo 1) e para os portadores (genótipo 2). No eixo X está representado os níveis de LDL-C (em mg/dL) e no eixo Y está representado o número de observações.

As frequências alélicas ($G = 0,9706 \pm 0,97$; $A = 0,0294 \pm 0,97$) e genotípicas ($GG = 0,9412$; $GA = 0,059$) encontradas nesse estudo foram diferentes das frequências encontradas na maioria dos trabalhos, como mostra a tabela 6. As frequências genotípicas e alélicas encontradas nesse estudo foram comparadas com as frequências de outros trabalhos através do teste de qui-quadrado.

TABELA 6 – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS ENCONTRADAS NA LITERATURA

Estudo	N	Frequência genótipo GA	Frequência alelo A
Hämäläinen <i>et al.</i> (1990)	552 indivíduos da Finlândia com hiperlipidemia	0	0
Tybjserg-Hansen <i>et al.</i> (1990)	745 indivíduos do Reino Unido e Escandinávia com hiperlipidemia ou diagnóstico primário de aterosclerose	0,013 ($\chi^2 = 9,78$; p = 0,002)	0,007 ($\chi^2 = 10,04$; p = 0,001)
Friedl <i>et al.</i> (1991)	318 indivíduos da Áustria com doença cardíaca	0,006 ($\chi^2 = 9,62$; p = 0,002)	0,003 ($\chi^2 = 9,83$; p = 0,002)
Friedlander, Dann e Leitersdorf (1993)	625 indivíduos de Israel com hipercolesterolemia ou que já tiveram infarto do miocárdio	0	0
Tybjaerg-Hansen <i>et al.</i> , 1998	9255 indivíduos da Dinamarca	0,0008 ($\chi^2 = 250,7$; p = 0,0001)	0,0004 ($\chi^2 = 257,8$; p = 0,0001)
Bednarska-Makaruk <i>et al.</i> , 2001*	525 indivíduos da Polônia com hipercolesterolemia	0,025 ($\chi^2 = 3,07$; p = 0,08)	0,012 ($\chi^2 = 3,16$; p = 0,08)
Horvath <i>et al.</i> , 2001*	130 pacientes da Bulgária com hipercolesterolemia	0,031 ($\chi^2 = 0,62$; p = 0,43)	0,015 ($\chi^2 = 0,65$; p = 0,42)
Fard-Esfahani <i>et al.</i> , 2005	130 pacientes do Irã com hipercolesterolemia	0	0
Nelken <i>et al.</i> , 2008*	131 crianças e adolescentes do Canadá com hipercolesterolemia	0,023 ($\chi^2 = 1,31$; p = 0,26)	0,011 ($\chi^2 = 1,35$; p = 0,25)
Shen <i>et al.</i> , 2010	1504 indivíduos da <i>Old Order Amish</i> (população social e culturalmente homogênea) da Pensilvânia	0,120 ($\chi^2 = 4,31$; p = 0,04)	0,060 ($\chi^2 = 4,44$; p = 0,03)
Awad e El-Tarras, 2011	200 indivíduos da Arábia Saudita	0	0

* Estudos que encontraram frequências semelhantes às encontradas nesse estudo.

Nota: Em todos os estudos só foram encontrados indivíduos heterozigotos para a mutação R3500Q.

Foi realizada uma análise de regressão múltipla considerando o LDL-C como variável dependente e o sexo, idade, IMC e genótipo como variáveis independentes. Foi visto que o genótipo e o sexo contribuem de forma independente para os níveis de LDL-C, sendo que para o genótipo $\beta = 28,09 \pm 8,4$ e $p = 0,001$, e para o sexo $\beta = 7,8 \pm 3,9$ e $p = 0,049$.

Para realização de outras análises, as crianças e adolescentes foram divididas de acordo com o IMC em obesos ou sobrepeso e eutróficos, conforme mostra o gráfico 3.

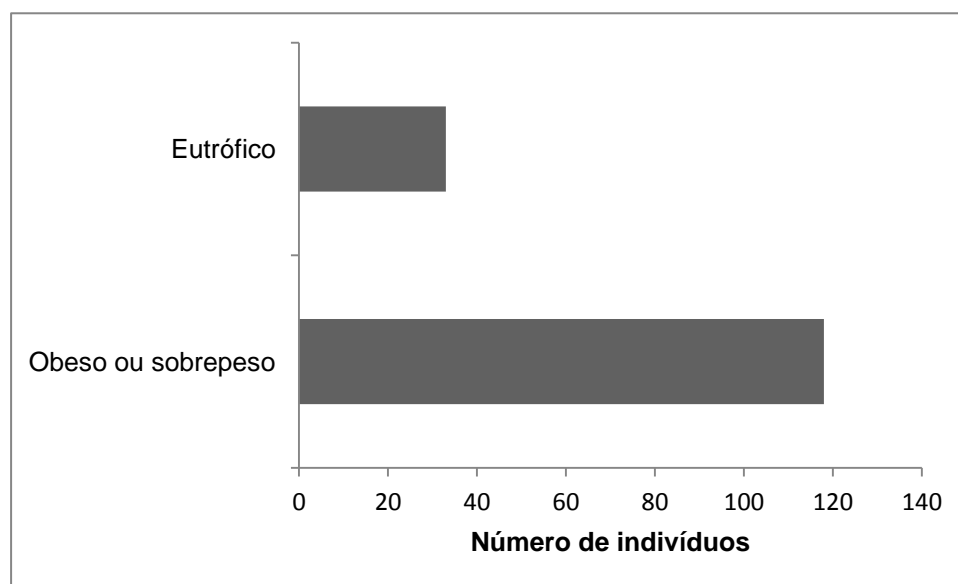


GRÁFICO 3 – Distribuição da amostra de acordo com o IMC.

Em seguida, os indivíduos foram separados de acordo com o genótipo. A quantidade de indivíduos com o genótipo usual e portador da mutação nos grupos “obesos ou sobrepeso” e “eutróficos” está representada no gráfico 4.

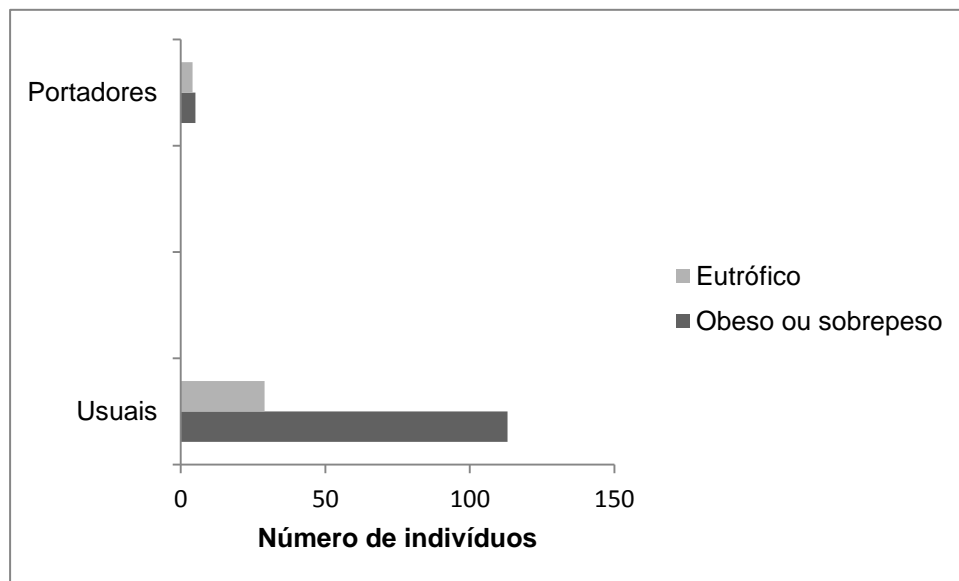


GRÁFICO 4 – Quantidade de indivíduos obesos ou sobrepeso e eutróficos de acordo com o genótipo.

As frequências alélicas e genotípicas para os indivíduos obesos ou sobrepeso e para os indivíduos eutróficos estão representadas na tabela 7.

TABELA 7 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DA MUTAÇÃO R3500Q DO GENE APOB100 PARA OS INDIVÍDUOS OBESOS OU SOBREPESO E PARA OS INDIVÍDUOS EUTRÓFICOS

Obesos ou sobrepeso					
Genótipo	N	%	Alelos	N	% ± EP
GG	113	95,76	G	231	97,88 ± 0,94
GA	5	4,24	A	5	2,12 ± 0,94
Total	118	100	Total	236	
Eutróficos					
Genótipo	N	%	Alelos	N	% ± EP
GG	29	87,88	G	62	93,94 ± 2,94
GA	4	12,12	A	4	6,06 ± 2,94
Total	33	100	Total	66	

Foi feita uma comparação entre os grupos “obeso ou sobrepeso” e “eutrófico” para os indivíduos com genótipo usual e portadores da mutação através do teste

exato de Fisher. Não houve nenhuma diferença significativa, ($p = 0,1055$), ou seja, a frequência da mutação não difere entre indivíduos obesos ou sobrepeso e eutróficos.

Também foram feitas análises estratificando a amostra de acordo com os níveis recomendados de CT e LDL-C, de maneira que as crianças e adolescentes foram separados em indivíduos com níveis desejáveis e indivíduos com níveis alterados desses lipídeos. Essa classificação foi realizada de acordo com o quadro 2.

Lipídeos	Valores		
	Desejáveis	Limítrofes	Aumentados
CT (mg/dL)	< 170	170 – 199	≥ 200
LDL-C (mg/dL)	< 110	110 – 129	≥ 130

QUADRO 2 – VALORES DE REFERÊNCIA DE CT e LDL-C EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES (ENTRE 2 E 19 ANOS DE IDADE).

FONTE: SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 1996.

As frequências de indivíduos com níveis desejáveis e de indivíduos com níveis alterados de CT e LDL-C estão representadas na tabela 8.

TABELA 8 – FREQUÊNCIA DE INDIVÍDUOS COM NÍVEIS DESEJÁVEIS E NÍVEIS ALTERADOS DE CT E LDL-C

LIPÍDEO	DESEJÁVEL		ALTERADO	
	N	%	N	%
CT	101	66,01	52	33,99
LDL-C	124	81,58	28	18,24

Como é possível observar, a maior parte das crianças e adolescentes possui níveis desejáveis de CT (66,01%) e LDL-C (81,58%). A distribuição dos níveis de LDL-C está representada na figura 6.

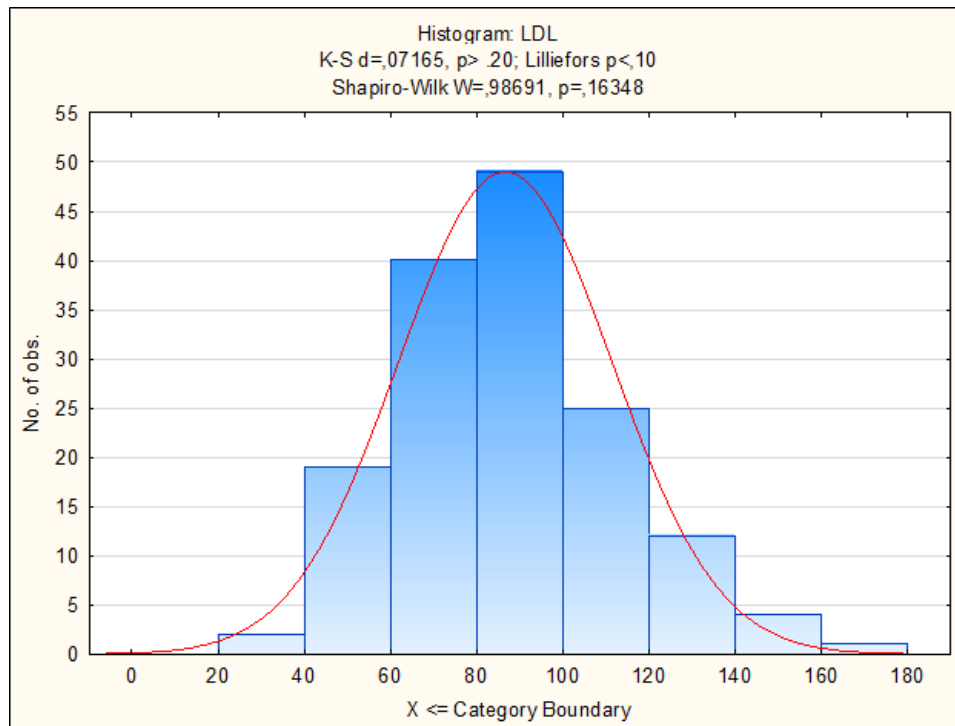


FIGURA 6 – HISTOGRAMA DO LDL-C. No eixo X está representado os níveis de LDL-C (em mg/dL) e no eixo Y está representado o número de observações.

Foram calculadas as frequências genóticas e alélicas de acordo com a separação da amostra considerando os níveis de CT e LDL-C, conforme mostram as tabelas 9 e 10, respectivamente.

TABELA 9 - FREQUÊNCIAS GENÓTIICAS E ALÉLICAS DA MUTAÇÃO *R3500Q* DO GENE *APOB100* NA AMOSTRA SEPARADA PELOS NÍVEIS DE CT

Desejável					
Genótipo	N	%	Alelos	N	% ± EP
GG	93	92,08	G	194	96,04 ± 0,01
GA	8	7,92	A	8	3,96 ± 0,01
Total	101	100	Total	202	
Alterado					
Genótipo	N	%	Alelos	N	% ± EP
GG	51	98,08	G	103	99,04 ± 0,96
GA	1	1,92	A	1	0,96 ± 0,96
Total	52	100	Total	104	

Foi realizado o teste Qui-quadrado com correção de Yates entre os grupos “CT desejável” e “CT alterado” para os indivíduos usuais (genótipo GG) e portadores da mutação (genótipo GA), sendo que não houve diferença significativa entre as frequências ($\chi^2 = 1,28$ e $p = 0,26$). Ao comparar os alelos, observou-se que $\chi^2 =$

1,24 e $p = 0,27$. Dessa maneira, podemos concluir que as frequências estão distribuídas de forma homogênea independente de o indivíduo estar com o nível de CT desejável ou alterado.

TABELA 10 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DA MUTAÇÃO R3500Q DO GENE APOB100 NA AMOSTRA SEPARADA PELOS NÍVEIS DE LDL-C

Desejável					
Genótipo	N	%	Alelos	N	% ± EP
GG	115	92,74	G	239	96,37 ± 1,19
GA	9	7,26	A	9	3,63 ± 1,19
Total	124	100	Total	248	
Alterado					
Genótipo	N	%	Alelos	N	% ± EP
GG	28	100	G	56	100 ± 0
GA	0	0	A	0	0
Total	28	100	Total	56	

Foi realizado o teste Qui-quadrado com correção de Yates entre os grupos “LDL-C desejável” e “LDL-C alterado” para os indivíduos usuais (genótipo GG) e portadores da mutação (genótipo GA), sendo que não houve diferença significativa entre as frequências, ($\chi^2 = 1,05$ e $p = 0,31$). Ao comparar os alelos, observou-se que $\chi^2 = 1,02$ e $p = 0,31$. Isso mostra que as frequências estão distribuídas de forma homogênea independente de o indivíduo estar com o nível de LDL-C desejável ou alterado.

5 DISCUSSÃO

O estudo avaliou vários fatores ligados a obesidade e dislipidemias em uma amostra de crianças e adolescentes, bem como a influência do polimorfismo *R3500Q* nesse contexto. Importantes resultados quanto a presença da mutação e os níveis de LDL-C foram observados. O esperado era que as crianças e adolescentes portadores da mutação possuísem níveis mais elevados de LDL-C, visto que a mutação em questão promove alterações na estrutura da APOB 100, o que prejudica a ligação da LDL ao seu receptor. Dessa maneira, ocorre um aumento dos níveis plasmáticos dessa lipoproteína, o que eleva o risco de início precoce da aterosclerose (SORIA *et al.*, 1989; HORVATH *et al.*, 2001). Entretanto, foi observado que os indivíduos portadores da mutação possuem níveis mais baixos de LDL-C do que os indivíduos com genótipo usual. Essa alteração pode ser explicada pelo fato de que 8 das 9 crianças e adolescentes portadores da mutação são do sexo feminino, e sabe-se que mulheres pré-menopausa possuem níveis mais baixos de LDL-C, devido a ação do estrógeno (MARINIS *et al.*, 2008). Estudos mostram que esse hormônio aumenta a expressão dos receptores de LDL, diminui a expressão da 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima-A-redutase (HMG CoA redutase), enzima responsável pela principal etapa da biossíntese do colesterol (FAVERO; BYDLOWSKI, 2007; MARINIS, *et al.*, 2008), e aumenta a velocidade de conversão do colesterol hepático em ácidos biliares (KUSHWAHA; BORN, 1991 *apud* GUETTA; CANNON, 1996). Como a média de idade dessas meninas portadoras da mutação é de 14,82 anos, é muito provável que elas já tenham passado pela menarca e estejam sob influência do estrógeno.

Além disso, a amostra é constituída por indivíduos que ainda são jovens, e sabe-se que o metabolismo de crianças e adolescentes é mais rápido do que o de adultos. Dessa maneira, os níveis de LDL-C nessa população tendem a ser menores. Isso ocorreu em um estudo realizado por Bednarska-Makaruk *et al.* (2001), em que quatro indivíduos portadores da mutação *R3500Q* que eram mais jovens não possuíam a alteração nos níveis de LDL-C observada nos adultos. Também é preciso considerar que o fenótipo da mutação abrange um largo espectro, sendo que alguns indivíduos não possuem nenhuma alteração lipídica (MYANT, 1993; NELKEN *et al.*, 2008).

O fato de as frequências genótípicas estarem em equilíbrio de Hardy-Weinberg aumenta a confiabilidade dos resultados obtidos, assim como a análise de regressão múltipla, onde foi confirmada a influência do genótipo nos níveis de LDL-C. Também foi visto que o sexo é um fator de risco independente para os níveis dessa lipoproteína, o que é um argumento a favor da explicação de que a diminuição dos níveis de LDL-C ocorreu devido ao fato de a maioria dos portadores da mutação serem do sexo feminino.

A frequência da mutação *R3500Q* varia entre os países e grupos étnicos (NELKEN *et al.*, 2008), sendo que são encontrados poucos dados com relação ao Brasil: Cavalli *et al.* (2000) não encontraram a mutação em uma amostra de 177 indivíduos com hipercolesterolemia, assim como Salazar (2002), que analisou 90 hipercolesterolêmicos familiares (FORTI *et al.*, 2003).

Em europeus brancos, por exemplo, a frequência é de 0,1% a 0,4% (SHEN *et al.*, 2010); sendo que 2 a 5% dos pacientes com hipercolesterolemia são homocigotos para o alelo defeituoso (TRAPANI; SEGATTO; PALLOTTINI, 2012). As maiores frequências são encontradas na Europa central (o que favorece a hipótese de que a mutação se originou nesta região), e a frequência diminui conforme se move para o leste, norte e sudoeste (HORVATH *et al.*, 2001). Em geral, a frequência dessa mutação varia de 1:500 a 1:1250 (AUSTIN *et al.*, 2004 *apud* SHEN *et al.*, 2010), sendo que na população suíça foi encontrada uma frequência de 1:209 (MISEREZ *et al.*, 1994 *apud* SHEN *et al.*, 2010). Apesar de essas taxas serem pequenas, é preciso levar em consideração que representam um número grande em nível populacional. Por exemplo, uma frequência de 0,1% nos Estados Unidos corresponderia (em 2008) a 305.000 portadores da mutação (SHEN *et al.*, 2010).

Comparadas com outros trabalhos, as frequências encontradas nesse estudo (frequência alelo A = $0,029 \pm 0,97$) são altas, mesmo com a maioria dos outros trabalhos tendo como amostra pacientes com hiperlipidemia, o que gera uma frequência superestimada (TYBJAERG-HANSEN *et al.*, 1998). O único estudo analisado que encontrou uma frequência maior foi o realizado por Shen *et al.* (2010) com indivíduos da *Old Order Amish* (social e culturalmente homogênea) da Pensilvânia (frequência alelo A = 0,060). A taxa nessa comunidade é muito maior do que em outras populações devido ao efeito fundador (SHEN *et al.*, 2010).

Alguns estudos encontraram frequências semelhantes à obtida nesse trabalho (BEDNARSKA-MAKARUK *et al.* (2001); HORVATH *et al.* (2001); NELKEN *et al.*

(2008)), sendo que o de Nelken *et al.* (2008) também foi realizado com crianças e adolescentes (com uma diferença na faixa etária, que é de 3 a 18 anos).

6 CONCLUSÃO

As dislipidemias e a obesidade são problemas crescentes em todo o mundo, de maneira que o estudo a respeito dessas doenças é fundamental. No presente trabalho foi verificado que a mutação *R3500Q* e o sexo são fatores de risco independentes para os níveis plasmáticos de LDL-C, sendo que a frequência do alelo mutado encontrada nesse estudo ($A = 0,029 \pm 0,97$) é alta considerando-se outros trabalhos.

A frequência da mutação *R3500Q* não difere entre indivíduos com excesso de peso ou obesidade e eutróficos, e, ao estratificar-se a amostra de acordo com os níveis recomendados de CT e LDL-C, foi visto que a frequência da mutação está distribuída de maneira homogênea independente de o indivíduo estar com os níveis desejáveis ou alterados desses lipídeos.

Comparando-se as crianças e adolescentes com o genótipo usual e portadores da mutação, observou-se uma redução dos níveis plasmáticos de LDL-C no grupo portador da mutação. Essa alteração pode ser explicada pela ação do estrógeno, já que dos 9 indivíduos portadores da mutação, 8 são do sexo feminino.

A investigação de associação de polimorfismos com determinadas variáveis é muito importante, visto que tais mutações podem afetar a saúde do indivíduo. De maneira geral, a identificação dos componentes genéticos é relevante pois: pode auxiliar no desenvolvimento de drogas mais específicas e seguras; ajudar na resposta a exercícios físicos, já que dependendo da constituição genética o indivíduo responderá de maneira diferente; e identificar subgrupos de indivíduos que, devido a sua característica genética, sejam mais sensíveis ou resistentes a determinadas alterações do ambiente (SHAWKY; SADIK, 2012).

REFERÊNCIAS

ABDEL-AZIZ, E. A. *et al.* Health related quality of life and psychological problems in Egyptian children with simple obesity in relation to body mass index. **Egyptian Journal of Medical Human Genetics**, v. 15, n. 2, p. 149–154, 2014.

AWAD, N. S.; EL-TARRAS, A. E. Molecular Biomarkers & Diagnosis Analysis of the APO B R3500Q Mutation and APOE Polymorphism in Taif Saudi Population using Polymerase Chain Reaction- Reverses Hybridization Technique. **J Mol Biomark Diagn**, v. 2, n. 2, p. 2–5, 2011.

BAIRDAIN, S. *et al.* A Single Institution's Overweight Pediatric Population and Their Associated Comorbid Conditions. **ISRN obesity**, v. 2014, p. 517694, 2014.

BEDNARSKA-MAKARUK, M. *et al.* Familial defective apolipoprotein B-100 in a group of hypercholesterolaemic patients in Poland. Identification of a new mutation Thr 3492 Ile in the apolipoprotein B gene. **European Journal of Human Genetics**, p. 836–842, 2001.

BIENERTOVÁ-VASKŮ, J. *et al.* Genotype x nutrient association of common polymorphisms in obesity-related genes with food preferences and time structure of energy intake. **The British journal of nutrition**, v. 103, n. 3, p. 352–9, 2010.

BRUCE, C. **Anthropometric Indicators Measurement Guide**. Food and Nutrition Technical Assistance Project. Academy for Educational Development, Washington, D.C., 2003.

BULBUL, T.; HOQUE, M. Prevalence of childhood obesity and overweight in Bangladesh: findings from a countrywide epidemiological study. **BMC pediatrics**, v. 14, n. 1, p. 86, 2014.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). About BMI for Children and Teens. 2011. Disponível em: < http://www.cdc.gov/healthyweight/assessing/bmi/childrens_bmi/about_childrens_bmi.html#How%20is%20BMI%20used%20with%20children%20and%20teens>. Acesso em: 16/04/2014.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Overweight and Obesity. 2012. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/obesity/data/facts.html>>. Acesso em: 16/04/2014.

CETATEANU, A.; JONES, A. Understanding the relationship between food environments, deprivation and childhood overweight and obesity: Evidence from a cross sectional England-wide study. **Health & place**, v. 27C, p. 68–76, 2014.

FARD-ESFAHANI, P. *et al.* Familial defective apolipoprotein b 100: frequency of R3500Q mutation of apolipoprotein b gene in Iranian hypercholesterolemic patients. **Acta Medica Iranica**, v. 43, nº 3, pg. 193-196, 2005.

FARROKHI, E. *et al.* Molecular characterization of Iranian patients with possible familial hypercholesterolemia. **Indian journal of clinical biochemistry : IJCB**, v. 26, n. 3, p. 244–8, 2011.

FAVERO, G. M.; BYDLOWSKI, S. P. Receptores de LDL: alvo para drogas anti-neoplásicas. **Publ. UEPG Ci. Biol. Saúde**, p. 53–58, 2007.

FORTI, N. *et al.* Alterações genéticas e colesterolemia: recentes estudos. **Arq. Bras. Cardiol.** v. 80, n. 5, p. 565-571, 2003.

FRIEDL, W. *et al.* Apolipoprotein B gene mutations in Austrian subjects with heart disease and their kindred. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 11, n. 2, p. 371–378, 1991.

FRIEDLANDER, Y.; DANN, E. J.; LEITERSDORF, E. Absence of familial defective in Israeli patients with dominantly inherited hypercholesterolemia and in offspring with parental history of myocardial infarction between meiotic chromosome pairing. **Human genetics**, p. 299–300, 1993.

GENETICS HOME REFERENCE. APOB. 2012. Disponível em: <<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/APOB>>. Acesso em: 25/11/2014.

GUETTA, V.; CANNON, R. O. Cardiovascular Effects of Estrogen and Lipid-Lowering Therapies in Postmenopausal Women. **American Heart Association**, v. 93, p. 1928-1937, 1996.

HÄMÄLÄINEN, T. *et al.* Absence of familial defective apolipoprotein B-100 in Finnish patients with elevated serum cholesterol. **Atherosclerosis**, v. 82, p. 177-183, 1990.

HORVATH, A *et al.* High frequency of the ApoB-100 R3500Q mutation in Bulgarian hypercholesterolaemic subjects. **J Med Genet**, v. 38, p. 536–540, 2001.

INNERARITY, T. L. *et al.* Familial defective apolipoprotein B-100: a mutation of apolipoprotein B that causes hypercholesterolemia. **Journal of Lipid Research**, v. 31, p. 1337–1349, 1990.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009. Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil. 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009/P_OFpublicacao.pdf>. Acesso em: 12/04/2014.

JACOBSEN, N. *et al.* Genotyping of the apolipoprotein B R3500Q mutation using immobilized locked nucleic acid capture probes. **Clinical chemistry**, v. 48, n. 4, p. 657–60, 2002.

JAHANGIR, E.; SCHUTTER, A. DE; LAVIE, C. J. The relationship between obesity and coronary artery disease. **Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine**, p. 1–9, 2014.

JELASSI, A. *et al.* Autosomal dominant hypercholesterolemia: needs for early diagnosis and cascade screening in the tunisian population. **Current genomics**, v. 14, n. 1, p. 25–32, 2013.

JUNG, U. J.; CHOI, M.-S. Obesity and Its Metabolic Complications: The Role of Adipokines and the Relationship between Obesity, Inflammation, Insulin Resistance, Dyslipidemia and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 4, p. 6184–223, 2014.

KAUR, J. A Comprehensive Review on Metabolic Syndrome. **Cardiology research and practice**, v. 2014, p. 943162, 2014.

KELISHADI, R. *et al.* Trend in the prevalence of obesity and overweight among Iranian children and adolescents: A systematic review and meta-analysis. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, v. 30, n. 4, p. 393–400, 2014.

LAHIRI, D.K., NURNBERGER JR., J.I. A rapid non-enzymatic method for the reparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Res.**, v. 19, p. 5444, 1991.

LEITE, N. *et al.* Associação entre o perfil lipídico e medidas antropométricas indicadoras de adiposidade em adolescentes. **Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum**, v. 11, n. 2, p.127-133, 2009a.

LEITE, N. *et al.* Effects of physical exercise and nutritional guidance on metabolic syndrome in obese adolescents. **Rev Bras Fisioter**, v. 13, n. 1, p. 73-81, 2009b.

LIMA, J. K. **Estudo de associação entre butirilcolinesterase e síndrome metabólica**. 57f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

MARINIS, E. *et al.* Sex differences in hepatic regulation of cholesterol homeostasis. **The Journal of endocrinology**, v. 198, n. 3, p. 635–43, 2008.

MASHAYEKHI, N. R. *et al.* The Correlation between Serum ApoA1 and B and Coronary Artery Disease as Well as Its Severity. **International cardiovascular research journal**, v. 8, n. 1, p. 1–5, 2014.

MEDEIROS *et al.* Cardiovascular risk assessment of dyslipidemic children: analysis of biomarkers to identify monogenic dyslipidemia. **J. Lipid Res**, v. 55, p. 947-955, 2014.

MELO, M.E. Diagnóstico da obesidade infantil. **Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica – ABESO**, 2011.

MILANO, G. E. **Consumo máximo de oxigênio em adolescentes obesos e não-obesos em esteira e bicicleta ergométrica no método convencional e alométrico**. 89f. Dissertação (Mestrado em Educação Física) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

MILANO, G. E. *et al.* Atividade da butirilcolinesterase e fatores de risco cardiovascular em adolescentes obesos submetidos a um programa de exercícios físicos. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v.57, n.7, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Vigitel: Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico. 2013. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/abril/30/Lancamento-Vigitel-28-04-ok.pdf>>. Acesso em: 05/05/2014.

MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; RODWELL, V. W. **Harper, Bioquímica Ilustrada**. 27ª edição. Rio de Janeiro: McGraw-Hill International, 2007.

MYANT, N. B. Familial defective apolipoprotein B-100: a review, including some comparisons with familial hypercholesterolaemia. **Atherosclerosis**, v. 104, n. 1-2, p. 1–18, 1993.

NELKEN, J. *et al.* Detection of familial defective apoB (FDB) mutations in hypercholesterolemic children and adolescents by denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC). **Clinical Biochemistry**, v. 41, p. 395–399, 2008.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NETO, O. D. A. *et al.* Fatores associados à dislipidemia em crianças e adolescentes de escolas públicas de Salvador, Bahia. **Rev Bras Epidemiol**, v. 15, n. 2, p. 335–345, 2012.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 33, p. 10–13, 2004.

RANG, H. P. *et al.* **Rang & Dale: Farmacologia**. 7ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

RIBAS, S. A.; SILVA, L. C. S. DA. Fatores de risco cardiovascular e fatores associados em escolares do Município de Belém, Pará, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 30, n. 3, p. 577–586, 2014.

RIDKER, P. M. LDL cholesterol: controversies and future therapeutic directions. **Lancet**, v. 384, p. 607–17, 2014.

SHAWKY, R. M.; SADIK, D. I. Genetics of obesity. **Egyptian Journal of Medical Human Genetics**, v. 13, n. 1, p. 11–17, 2012.

SHEN, H. *et al.* Familial Defective Apolipoprotein B-100 and Increased Low- Density Lipoprotein Cholesterol and Coronary Artery Calcification in the Old Order Amish Haiqing. **Arch Intern Med.**, v. 170, n. 20, p. 1850–1855, 2010.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. Consenso Brasileiro Sobre Dislipidemias. Detecção - Avaliação - Tratamento. **Arq Bras Cardiol**, v.67, p. 113–128, 1996.

SORIA, L. F. *et al.* Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B-100. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 2, p. 587–91, 1989.

TONKIN, A.; BYRNES, A. Treatment of dyslipidemia. **F1000prime reports**, v. 6, n. February, p. 17, 2014.

TRAPANI, L.; SEGATTO, M.; PALLOTTINI, V. Regulation and deregulation of cholesterol homeostasis: The liver as a metabolic “power station”. **World journal of hepatology**, v. 4, n. 6, p. 184–90, 2012.

TYBJSERG-HANSEN, A. *et al.* Familial defective apolipoprotein B-100 : detection in the United Kingdom and Scandinavia , and clinical characteristics of ten cases. **Atherosclerosis**, v. 80, p. 235–242, 1990.

TYBJSERG-HANSEN, A. *et al.* Association of mutations in the apolipoprotein b gene with hypercholesterolemia and the risk of ischemic heart disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 338, p. 1577-84, 1998.

UUSITUPA, M. Gene-diet interaction in relation to the prevention of obesity and type 2 diabetes: Evidence from the Finnish Diabetes Prevention Study. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 15, n. 3, p. 225–233, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Growth reference 5-19 years. 2007. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/obesity/en/>>. Acesso em: 20/09/2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Obesity. 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/obesity/en/>>. Acesso em: 11/02/2014.

XAVIER *et al.* V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 101, n. 4, 2013.

ANEXO**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****TÍTULO DO PROJETO: XXXXXXXX****INVESTIGADOR: XXXXXXXX****LOCAL DA PESQUISA:** Departamento de Genética e Departamento de Educação Física**Telefone (41) 3361 1730**

Você está sendo convidado (a) para participar de uma pesquisa. Este termo de consentimento livre e esclarecido tem informações para ajudá-lo a decidir se irá permitir que seu filho (a) participe deste estudo.

O objetivo deste estudo é investigar fatores de predisposição genética à obesidade em adolescentes submetidos a sessões de exercícios físicos e de orientação nutricional.

Caso o seu filho participe da pesquisa, será necessário fazer exames de rotina médica, bioimpedância, testes cardiorrespiratórios em esteira e bicicleta ergométrica, avaliação do estágio puberal e eletrocardiograma.

Como em qualquer tratamento seu filho (a) poderá experimentar alguns desconfortos, principalmente relacionados ao uso de máscara na calorimetria, ao utilizar o bucal e o clamp nasal para respiração exclusivamente oral e dores musculares e articulares após os testes ergométricos máximos.

Os riscos que envolvem a avaliação de seu filho (a) são dores musculares e articulares após o teste ergométrico.

Para tanto seu filho deverá comparecer no Hospital de Clínicas (HC) para consulta médica, realizar a avaliação puberal, bioimpedância e eletrocardiograma, e ao

Departamento de Educação Física (DEF) da Universidade Federal do Paraná (UFPR) para a realização de testes em esteira e bicicleta ergométrica.

Estão garantidas todas as informações que você queira, antes, durante e após o estudo.

A participação de seu filho (a) é voluntária. Você tem a liberdade de recusar a participar do estudo, ou retirar seu consentimento a qualquer momento.

As informações relacionadas ao estudo poderão ser inspecionadas pelos médicos que executam a pesquisa e pelas autoridades legais, no entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a confidencialidade seja mantida.

Todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa **não** são da responsabilidade do paciente ou do seu responsável.

Pela participação do seu filho (a) no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro.

Quando os resultados forem publicados, não aparecerá o nome de filho (a), e sim um código.

Durante o estudo seu filho (a) não poderá ingerir medicamentos sem informar antecipadamente os pesquisadores responsáveis por este estudo.

Eu, _____ li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo de estudo no qual meu filho (a) _____ foi convidado (a) a participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios do estudo. Entendi que sou livre para interromper a sua participação no estudo a qualquer momento sem justificar a minha decisão e sem que esta decisão afete o seu tratamento com o seu médico. Eu entendi que não posso fazer durante o estudo e

sei que qualquer problema relacionado ao tratamento será tratado sem custos para mim ou para o meu filho (a).

Eu concordo voluntariamente do (a) meu (minha) filho (a) em participar deste estudo.