

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PUERICULTURA E PEDIATRIA

CRISTINA COSTA DE BARROS MALERBA

“Estudo do gene do receptor-3 da melanocortina em crianças
e adolescentes obesos”

RIBEIRÃO PRETO

- 2010 -

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

CRISTINA COSTA DE BARROS MALERBA

“Estudo do gene do receptor-3 da melanocortina em crianças
e adolescentes obesos”

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Mestre em Saúde da Criança e do
Adolescente.

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.
Opção: Investigação em Pediatria

Orientadora: Profa. Dra. Heloisa Bettiol

Ribeirão Preto

- 2010 -

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Malerba, Cristina Costa de Barros

Estudo do gene do receptor-3 da melanocortina em crianças e adolescentes obesos. Ribeirão Preto, 2010.

79 p. : il. ; 30cm

Tese de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.

Orientadora: Heloisa Bettiol

1. Receptor-3 da melanocortina. 2. Polimorfismos.
3. Metabolismo energético. 4. Obesidade. 5. Crianças.

Dedico este trabalho aos meus filhos.

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho expressa o gosto que tenho pelo aprendizado, e a vontade que tenho de estudar.

Sou muito grata a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho:

- aos professores Heloisa Bettiol, Lucila Leico K. Elias e Sonir Roberto Rauber Antonini pela orientação e estímulo.

- aos amigos Rogério e Wendy pelos ensinamentos e ótima convivência no laboratório.

- aos amigos e colegas de pós-graduação Letícia, Ana Cláudia, Sabrina, Bia, Renata, Silvia e Tatiana pelo carinho e apoio que jamais esquecerei.

- Em especial ao meu marido, pelo estímulo e apoio incondicionais.

RESUMO

MALERBA, C. C. B. “*Estudo do gene do receptor 3 da melanocortina em crianças e adolescentes obesos.*” 2010. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Introdução: O sistema melanocortina central é a via neuronal que regula a ingestão alimentar e homeostase energética por meio da ligação do hormônio estimulante do melanócito α a receptores específicos. Camundongos deficientes do receptor-3 do hormônio estimulador do melanócito- α (MC3R) tem aumento do depósito de gordura, redução da massa muscular e maior eficiência alimentar do que os camundongos não deficientes, apesar de serem hipofágicos e manterem taxas metabólicas normais. Na literatura os estudos apresentam resultados divergentes, alguns estudos em humanos descreveram mutações ou polimorfismos no gene do *MC3R* associados à obesidade e outros não observaram essas associações. **Objetivo:** Identificar a presença de mutações e/ou polimorfismos no gene do *MC3R* em crianças e adolescentes obesos. Comparar a frequência das mutações e/ou polimorfismos encontrados nas crianças obesas com a frequência dessas variações genótípicas em indivíduos de peso normal. Comparar os dados clínicos, antropométricos e bioquímicos dos obesos com e sem mutação/polimorfismo.

Material e Métodos: Participaram do estudo 67 crianças e adolescentes do Ambulatório de Obesidade Infantil do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP que tenham obesidade grave iniciada antes dos 8 anos de idade. Foram feitas PCRs (*Polimerase Chain Reaction*) com primers para amplificar a cadeia de DNA e seqüenciamento do segmento de interesse na busca de variações no gene do *MC3R*. O seqüenciamento obtido foi comparado com o *Gene Bank*. Foram realizados também exames de bioimpedância para estimar a composição corporal e dosagens de colesterol e frações, glicemia e insulina de jejum. A frequência das variações genótípicas foi comparada com um grupo de 71 indivíduos com peso normal aplicando-se o teste exato de Fisher. Os valores dos exames sanguíneos e composição corporal foram comparados entre obesos com e sem variações genótípicas, utilizando-se o teste não paramétrico de Wilcoxon. O nível de significância adotado foi de 5%.

Resultados: Foram encontradas dois polimorfismos no gene do *MC3R*, c.17C>A e c.241G>A que não estavam associadas à obesidade. Nenhuma variante rara foi encontrada. Os indivíduos obesos com estes polimorfismos não apresentaram diferenças no escore z de IMC, relação peso/estatura, circunferência da cintura, cor da pele, impedância bioelétrica, glicemia, insulina plasmática de jejum, HOMA-IR e colesterol total e frações.

Conclusão: Este estudo não fornece evidências para um efeito das variantes da região codificadora do gene do *MC3R* na obesidade grave de início precoce deste grupo de 67 crianças e adolescentes.

Palavras-chave: Receptor 3 da melanocortina, polimorfismos, balanço energético, obesidade, crianças.

ABSTRACT

MALERBA, C. C. B. “*Study of the melanocortin-3 receptor gene in obese children and adolescents.*” 2010. (Dissertation) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Introduction: The central melanocortin system is a neuronal pathway that regulates food intake and energy homeostasis through the binding of the stimulating hormone α -melanocyte to specific receptors. Melanocortin 3 receptor deficient mice have increased fat mass, reduced lean mass and higher feed efficiency than wild-type littermates, despite being hypophagic and maintaining normal metabolic rates. In humans, there are several studies that did not find any melanocortin 3 receptor mutations associated to obesity, and a few that did so.

Objective: To identify the presence of mutations and/or polymorphisms in the *MC3R* gene in obese children and in a control group of individuals of normal weight, and to assess the association of genotypic changes of *MC3R* with clinical, anthropometric and biochemical data in the obese subjects with and without mutation/polymorphism.

Subjects and Methods: The participants in the case-control study were 67 children from the Childhood Obesity Outpatient Clinic of the University Hospital, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, USP and 71 control individuals of normal weight. The polymerase chain reaction (PCR) was used with primers to amplify the DNA chain, followed by sequencing and single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis of the mutations and/or polymorphisms in *MC3R* gene. The variations found in the obese group were screened by restriction fragment length polymorphisms in the control group. The sequencing obtained was compared with the Gene Bank. The obese group was also submitted to bioimpedance examination to estimate body composition and to the determination of levels of cholesterol and fractions, fasting glycemia and insulin and TSH. The frequency of *MC3R* variants were compared between the patient and control groups using the Fisher exact test. The values of biochemical blood tests and of body composition were compared between obese children carrying or not the genotypic variations using the Wilcoxon non-parametric test. The significance level adopted was 5%

Results: We identified two *MC3R* gene-coding common variants, p.Thr6Lys and p.Val81Ile that were not associated with obesity. None rare variant was found. These common variants were not associated with BMI z score, waist circumference, body fat %, glucose, insulin, total cholesterol, total triglycerides, HDL and LDL-cholesterol levels.

Conclusion: The present study provides no evidence for a major role of the *MC3R* coding mutations in this group of 67 children and adolescents with early onset obesity.

Key words: Melanocortin 3 receptor, polymorphisms, energy balance, obesity, children.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABI	<i>Applied Biosystems</i>
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AGL	ácidos graxos livres
AGNE	ácidos graxos não esterificados
AgRP	<i>Agouti</i> relacionado à proteína
AOIA	Ambulatório de Obesidade na Infância e Adolescência
CART	transcrito regulado pela cocaína e anfetamina
CDC	<i>Center for Disease Control</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido tetraacético etilendiamina
GATA <i>box</i>	seqüência conservada da região promotora que regula a transcrição do gene.
GDP	Difosfato de guanosina
GENBANK	Banco genético
GPCR	Receptor acoplado à proteína G
GTP	Trifosfato de guanosina
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
HCRP	Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto
HDL-C	Colesterol-lipoproteína de alta densidade
HOMA-IR	<i>Homeostasis Model Assessment-Insulin Resistance</i>
IMC	Índice de massa corporal
ING	Índice de obesidade de Newen-Goldstein
LDL-C	Colesterol-lipoproteína de baixa densidade
MC1R	Receptor 1 da melanocortina
MC2R	Receptor 2 da melanocortina
MC3R	Receptor 3 da melanocortina
MC4R	Receptor 4 da melanocortina
MC5R	Receptor 5 da melanocortina
mc3r	Receptor 3 da melanocortina em animais
mc4r	Receptor 4 da melanocortina em animais
NPY	Neuropeptídeo Y

OBIN	Ambulatório de Obesidade Infantil
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i>
PKA	proteína quinase A
POMC	Hormônio pró-ópio melanocortina
APUE	Ambulatório de Puericultura e Pediatria
RFLP	<i>Restriction Fragments Length Polimorphisms</i>
SAS	<i>Statistical Analysis System</i> , programa estatístico
SNP	single nucleotide polimorphism = polimorfismo de um único nucleotídeo
SSCP	<i>single-strand conformation polymorphism</i>
STATA	<i>Software</i> de análise de dados e estatística
TSH	Hormônio tireotrófico
TSR	<i>Template Supression Reagent ABI Prism</i>
USP	Universidade de São Paulo
WHO	<i>World Health Organization</i>
α -MSH	Hormônio melanócito estimulante - alfa

LISTA DE SÍMBOLOS

cm	Centímetros
g	Gramma
Kg	Quilograma
Kg/m ²	Quilograma por metro quadrado
m	metro
mg/dl	miligrama por decilitro
μUI/mL	Micro unidades internacionais por mililitro
mmHg	Milímetro de mercúrio
°C	Grau centígrado
χ ²	Qui-quadrado
U	Unidade
=	Igual
±	Mais ou menos

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Resposta biológica aos níveis de leptina. 19
- Figura 2:** Localização dos *primers* para os fragmentos 1 e 2 e do *primer* para sequenciamento no éxon do *MC3R*. 35
- Figura 3:** Exemplo de um heterozigoto para o polimorfismo 1:c.17C>A de um único nucleotídeo (SNP) que cai dentro do sítio de restrição da enzima *TaiI* e altera o sítio. A PCR revela dois tamanhos de fragmentos: o DNA cortado em três fragmentos representa o alelo normal, e o DNA cortado em dois fragmentos representa o alelo polimórfico. 37
- Figura 4:** Localização dos polimorfismos na estrutura bidimensional do *MC3R*. 47
- Figura 5:** O polimorfismo **c.17C>A** representa a troca de uma citosina por adenina (ACG→AAG) no códon 6, que troca o aminoácido Tre por Lis. 48
- Figura 6:** O polimorfismo c.241G>A representa a troca de uma guanina por adenina (GTT→ATT) no códon 81 que troca o aminoácido Val por Ile. 48
- Figura 7:** Localização das mutações e polimorfismos descritos no gene do *MC3R* em relação ao estudo dos aminoácidos importantes para a ligação/ativação do receptor 63

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Características gerais da amostra de obesos	29
Tabela 2: Temperaturas das PCRs dos dois fragmentos.....	35
Tabela 3: Dados de interrogatório da amostra de obesos	39
Tabela 4: Comorbidades referidas pelos indivíduos da amostra de obesos	40
Tabela 5: Antecedentes familiares da amostra de obesos	41
Tabela 6: Exame clínico e antropometria da amostra de obesos.....	42
Tabela 7: Exame físico da amostra de obesos	42
Tabela 8: Distribuição do estadiamento puberal segundo sexo da amostra de obesos.	43
Tabela 9: Exames laboratoriais da amostra de obesos.	43
Tabela 10: Dosagens séricas realizadas dos dois indivíduos com glicemia alterada.	44
Tabela 11: Valores de insulina dos indivíduos obesos classificados de acordo com os critérios da I Diretriz de prevenção da aterosclerose na infância e na adolescência.....	44
Tabela 12: Distribuição dos valores médios de insulina pelo sexo, faixas etárias, categorias de ING, acantose e puberdade.	45
Tabela 13: Número absoluto e relativo dos 67 indivíduos com níveis de lipídeos desejáveis, limítrofes ou aumentados	45
Tabela 14: Frequências de genótipos para os alelos normal e mutado do polimorfismo 1:c.17C>A na amostra de crianças obesas	48
Tabela 15: Frequências de genótipos para os alelos normal e mutado do polimorfismo 1:c.241G>A na amostra de crianças obesas.	49

Tabela 16: Frequências de genótipos para os alelos normal e mutado do polimorfismo 1:c.17C>A na amostra de crianças com peso normal.....	49
Tabela 17: Distribuição das frequências genotípicas esperadas e observadas do polimorfismo c.17C>A no gene do <i>MC3R</i>	49
Tabela 18: Distribuição das frequências genotípicas esperadas e observadas do polimorfismo c.241G>A no gene do <i>MC3R</i>	50
Tabela 19: Distribuição da cor da pele auto-referida segundo a presença do polimorfismo ..	51
Tabela 20: Idades e índices antropométricos segundo a presença do polimorfismo.....	51
Tabela 21: Distribuição das dosagens bioquímicas do grupo de obesos segundo a presença dos polimorfismos	51
Tabela 22: Distribuição das dosagens bioquímicas do grupo de obesos segundo a presença dos polimorfismos	52
Tabela 23: Distribuição dos valores médios de insulina segundo os genótipos para o polimorfismo c.17C>A.....	52
Tabela 24: Comparação da distribuição dos valores médios de insulina segundo os genótipos para o polimorfismo c.17C>A entre dois estudos.....	58

SUMÁRIO

1. Introdução	15
1.1 Justificativa do estudo.....	25
2. Objetivos.....	26
3. Métodos	28
3.1 Desenho do estudo	29
3.2 Indivíduos	29
3.3 Controles.....	30
3.4 Cálculo amostral	30
3.5 Aspectos éticos	31
3.6 Avaliação nutricional.....	31
3.6.1 Antropometria	31
3.6.2 Interrogatório.....	32
3.6.3 Coleta de sangue e bioimpedanciometria.....	32
3.7 Exames laboratoriais.....	33
3.8 Coleta das amostras de sangue.....	33
3.9 Valores de referência para a análise dos dados bioquímicos.....	34
3.10 Análise de DNA.....	35
3.11 Análise estatística	37
4. Resultados	38
4.1 Características da amostra.....	39
4.1.1 Dados clínicos, anamnese e exame físico	39
4.1.2 Bioquímica sanguínea e valores de HOMA – IR (<i>Homeostasis model assessment – Insulin resistance</i>)	43
4.1.3 Avaliação da porcentagem de gordura corporal pela impedância bioelétrica.....	46
4.1.4 Análise do gene do receptor 3 da melanocortina	46
4.1.4.1 Comparação das frequências dos polimorfismos c.17C>A e c.241G>A entre os indivíduos obesos e controles	49
4.1.4.2 Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	49
4.2 Associação entre a presença do polimorfismo e as variáveis estudadas.....	50
4.2.1 Comparação da cor da pele auto-referida entre os indivíduos controles e obesos, e a presença ou ausência do polimorfismo c.17C>A	50
4.2.2 Associação com idade e índices antropométricos	51

4.2.3 Associação com a porcentagem de gordura corporal.....	51
4.2.4 Comparação dos valores dos exames sanguíneos entre obesos com e sem variações genótípicas.....	52
4.2.5 Insulina.....	52
5. Discussão	53
5.1 Frequência alélica e efeitos da raça	54
5.2 Obesidade.....	55
5.3 Circunferência da cintura.....	55
5.4 Impedância bioelétrica.....	56
5.5 Efeitos cardiometabólicos.....	57
5.6 Insulina.....	58
5.7 Lipídeos	60
5.8 Análise molecular – estudos funcionais.....	61
6. Conclusão	65
7. Referências	67

1. Introdução

Obesidade e sobrepeso representam uma ameaça em crescimento acelerado à saúde das populações em um crescente número de países. As comorbidades da obesidade incluem doença cardíaca coronariana, hipertensão e infarto agudo do miocárdio, alguns tipos de câncer, diabetes mellitus não insulino dependente, doenças da vesícula biliar, dislipidemia, osteoartrite e gota, e doenças pulmonares incluindo apnéia do sono. As causas fundamentais da obesidade epidêmica são o estilo de vida sedentário e dieta com densidade energética rica em gordura, ambas resultantes de profundas mudanças que ocorrem na sociedade e de padrões comportamentais das comunidades como consequência do aumento da urbanização e industrialização e do desaparecimento do tradicional estilo de vida. Por isso, a partir do ano de 2000, a Organização Mundial de Saúde passou a definir obesidade como o excesso de gordura corporal acumulada no tecido adiposo, com implicações para a saúde (WHO, 2000).

O desenvolvimento normal da adiposidade durante o crescimento apresenta três fases sucessivas: aumento rápido no primeiro ano de vida; diminuição do tecido adiposo de então até os 6 anos aproximadamente, quando a criança parece ter emagrecido e eventualmente após essa fase, a adiposidade se desenvolve novamente. Na puberdade, o índice de massa corporal (IMC = peso/estatura²) aumenta mais rapidamente no sexo feminino do que no masculino, mas aos 18 anos, quando a média de IMC é 21,0, as curvas se cruzam e o IMC do sexo masculino se torna maior. Por causa dessa variação de crescimento do tecido adiposo, que é mostrado pelas curvas de crescimento padrão de IMC, é que surge a necessidade de medidas que normalizem os valores de IMC para possibilitar a comparação de crianças e adolescentes de sexo e idade diferentes. Vale lembrar, que por serem curvas de construção transversal, elas dão uma impressão geral das mudanças com a idade, mas não mostram o padrão de crescimento longitudinal de um único indivíduo (Rolland-Cachera, 1987).

O sistema mais utilizado para se classificar obesidade e sobrepeso assim como monitorar mudanças de peso em programas de controle de peso é o IMC (WHO, 2000). Entretanto, o peso muda com a idade durante a infância e precisa ser ajustado para se comparar uma criança individual com outras da mesma idade. O IMC é uma medida útil de adiposidade, e pode ser convertido em percentís ou score z ajustado para idade e sexo com o uso das curvas de referência. Medidas em um único momento e variação de adiposidade em um curto prazo são mais bem avaliadas pelo IMC como unidade.

O percentil de IMC é útil para se classificar a adiposidade das crianças, mas é pobre na quantificação de variação de adiposidade e também não é muito apropriado como ferramenta estatística sumária, pois é limitado entre 0 e 100. A escala é drasticamente encurtada nos extremos da distribuição, e as crianças obesas inevitavelmente mudam menos do que as não

obesas em termos de percentís, e o mesmo acontece com as crianças muito magras. Nos Estados Unidos os pontos de corte recomendados para crianças e adolescentes de 2 a 20 anos são: IMC para a idade e sexo maior que o percentil 85 e menor ou igual ao percentil 95 define risco de obesidade e maior que o percentil 95 define obesidade (Dietz, 1991). Entretanto, no Reino Unido, baseado em critérios estatísticos, outros percentís são sugeridos, em particular o 91 para sobrepeso, 98 para obesidade e 99,6 para superobeso (Cole, 1995). O critério clínico assume que as crianças acima daquele percentil estão em maior risco do que aquelas que se encontram abaixo dele, e que o percentil separa aqueles que estão doentes daqueles que estão bem. Entretanto, na prática isto não é real, já que o risco aumenta uniformemente. O ajuste de um ponto de corte implica que sujeitos acima dele necessitam de tratamento para obesidade, e isto tem profundas implicações, quanto maior o ponto de corte menor será a população que precisará de tratamento. Ao mesmo tempo, se a obesidade for associada a efeitos tardios, o risco será maior com o uso de pontos de corte mais extremos. Portanto, para o uso populacional, a escolha do ponto de corte define a prevalência da obesidade e também a força da associação com os efeitos tardios (Cole, 1997).

Escore - z (ou escore de desvio padrão) é o desvio do valor para um indivíduo do valor da média da população de referência, dividido pelo desvio padrão para a população de referência:

$$\text{Escore-z ou dp-escore} = \frac{(\text{valor observado}) - (\text{valor de referência médio})}{\text{Desvio padrão da população de referência}}$$

O escore z de IMC é útil para se verificar a medida transversal de adiposidade, e diferente do percentil de IMC, ele pode ser sumarizado para propósitos de pesquisa, isto é, permite que se calcule média e desvio padrão para um grupo de escores-z. Contudo, para se medir variação de adiposidade no tempo é uma escolha lógica, porém, menos ideal, já que sua variabilidade se torna progressivamente menor conforme a criança engorde mais. A escala de escore z é encurtada na parte superior da distribuição por causa do deslizamento da distribuição do IMC, o que faz com que os percentís inferiores sejam mais juntos uns dos outros do que os percentís maiores. Isto significa que uma dada mudança no IMC corresponde a uma menor mudança no escore z, quanto maior o percentil da distribuição (Cole, 2005). A Organização Mundial de Saúde define os seguintes critérios de ponto de corte para escore z de IMC (WHO, 2007):

Sobrepeso escore z de IMC de +1 a +2

Obesidade escore z de IMC >2

Outro índice menos utilizado na literatura, porém muito utilizado na prática médica é o índice de obesidade de Newen-Goldstein (Damiani, 1989; Marcondes, 1991). Ele se ajusta muito bem para meninas até 12 anos e para meninos até 14 anos. A partir dessas faixas etárias, inicia-se o platô das curvas de crescimento, quando não se consegue mais uma correspondência entre a estatura atual e a ideal. Este índice chamado de Newen-Goldstein (ING), é definido pela seguinte fórmula:

$$\text{ING} = \frac{\text{peso/altura}}{\text{peso ideal / altura ideal}} \times 100$$

O peso e altura ideais são os encontrados no percentil 50 da curva de distribuição, e os pontos de corte são os seguintes:

Sobrepeso ING entre 111 e 120

Obesidade grau I ING > 120

Obesidade grau II ING > 130

Obesidade grau III ING > 140

A escolha sobre qual o melhor índice antropométrico depende do que se quer mostrar e de qual intervenção se deseja fazer, ou mesmo se ela é ou não necessária.

Com o crescente aumento da obesidade, muito se tem estudado sobre as vias centrais que controlam a ingestão alimentar e o metabolismo energético.

O sistema da melanocortina central é a via neuronal que regula a ingestão alimentar e homeostase energética através da ligação do hormônio estimulante do melanócito α (α -MSH) a receptores específicos. Sinais periféricos mediados pela insulina e leptina dirigem-se ao núcleo arqueado do hipotálamo, para ativar ou inibir dois outros subconjuntos de fibras: o primeiro é anorexigênico e formado pelos neurônios da pró-opiomelanocortina (POMC) e transcritor regulado pela anfetamina e cocaína (CART), e o segundo é orexigênico e formado pelos neurônios do neuropeptídeo Y (NPY) e da proteína ligada ao *Agouti* (AgRP). Insulina e leptina são hormônios que circulam no sangue em concentrações proporcionais ao conteúdo de tecido adiposo e ao balanço energético. Em condições de aumento de massa gorda eles agem nos núcleos arqueado do hipotálamo inibindo os neurônios que expressam o NPY e AgRP, e ativando os neurônios da POMC que expressam o α -MSH. Durante a perda de peso, níveis baixos de leptina e insulina no cérebro aumentam a atividade da via neuronal anabólica (NPY e AgRP) que estimula o apetite, diminui o gasto energético e diminuem a atividade da

via catabólica (α -MSH) que reduz o apetite e aumenta o gasto energético (Schwartz et al., 2000). A figura 1 mostra como o sistema endócrino e nervoso atuam de maneira coordenada para regular a ingestão alimentar e o metabolismo energético atendendo às necessidades fisiológicas (Schwartz et al., 2000; Luquet, 2009).

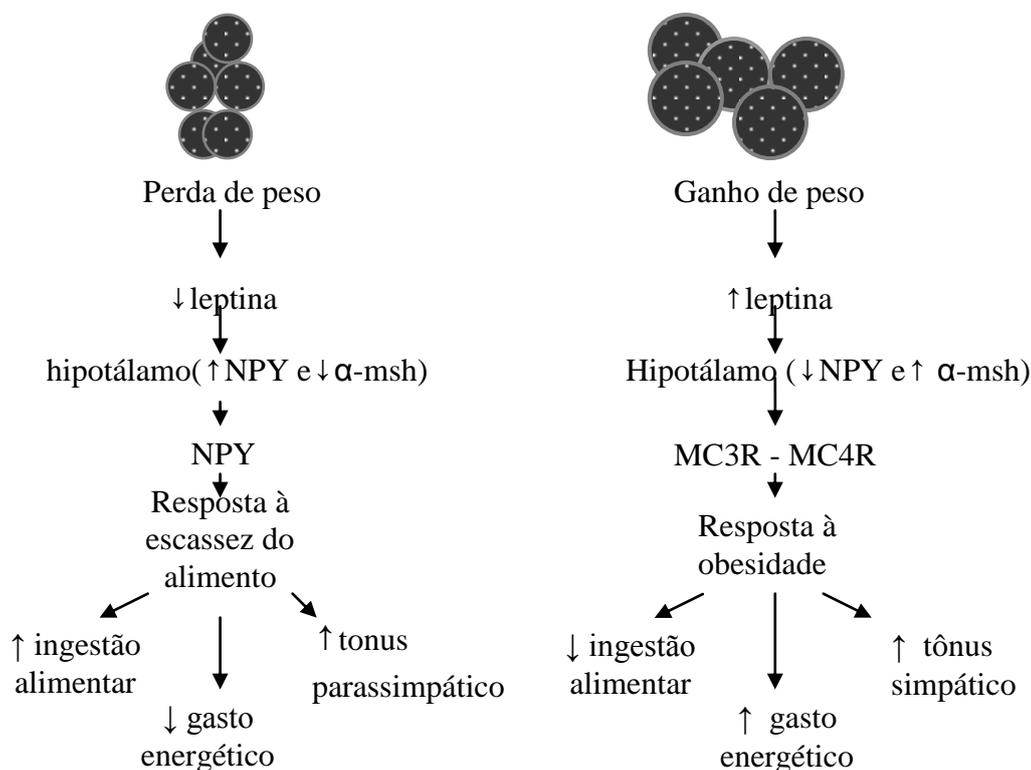


Figura 1 – Resposta biológica aos níveis de leptina

Esse sistema é pautado em estudos em animais que mostram que a injeção de NPY nos ventrículos cerebrais ou diretamente no hipotálamo de ratos causa hiperfagia, hiperinsulinemia, diminui o gasto energético e ativa as enzimas lipogênicas no fígado, aumentando o tecido adiposo branco (Billington et al., 1991). A leptina, por sua vez, inibe a expressão do NPY no núcleo arqueado (Schwartz, 1996).

Dentre as moléculas sinalizadoras dos efeitos catabólicos destacam-se o α -MSH e o CART, entre os mais estudados. A síntese neuronal desses peptídeos aumenta em resposta ao aumento do sinal central de adiposidade emitido pela leptina e insulina (Schwartz et al., 2000).

O α -MSH é um peptídeo originado da clivagem da molécula precursora pró-opiomelanocortina (POMC) pela pró-convertase-2. A clivagem da POMC dá origem ao α -MSH, β -MSH, γ -MSH e ACTH que interagem com uma família de cinco receptores de melanocortina, o

MC1R, MC2R, MC3R, MC4R, e MC5R. O MC1R é o receptor do MSH expresso na pele e controla a pigmentação. MC2R é o receptor do ACTH expresso na glândula adrenal e regula a esteroidogênese e o desenvolvimento adrenal. MC3R e MC4R são os chamados receptores neurais porque sua expressão foi descrita inicialmente no cérebro. MC4R é expresso no córtex, tálamo, hipotálamo, tronco cerebral e medula espinal. MC3R é expresso no córtex, tálamo, hipocampo e hipotálamo (núcleos arqueado e ventromedial) (Mountjoy, 1994). Posteriormente foi descoberta a expressão do MC3R em outros órgãos como estômago, duodeno, pâncreas, placenta (Gantz, 1993) e coração (Chhajlani, 1996). Ambos regulam diferentes aspectos da homeostase energética. O MC5R é expresso nas glândulas exócrinas e regula a secreção dessas glândulas (Hruby et al., 2007). Dos cinco receptores, somente o MC3R e MC4R são de interesse no controle da ingestão alimentar e do balanço energético.

A estimulação dos receptores 3 e 4 da melanocortina ativa as vias neuro-endócrinas que regulam o peso corporal, e antagonistas ou a deleção dos genes destes receptores pode levar à obesidade (Nogueiras et al., 2007).

Nos tecidos periféricos, a adrenalina e o glucagon, por meio do aumento do AMP cíclico, com subsequente ativação da PKA, fosforilam um precursor inativo da triacilglicerolipase no interior dos adipócitos, que degrada triacilglicerídeos, liberando ácidos-graxos livres para a circulação. No sangue, eles são transportados na forma não esterificada, ligados à albumina sérica, para os músculos, coração e rins. Circula no sangue, somente uma pequena quantidade de tais ácidos graxos livres (AGL), também chamados de ácidos graxos não esterificados (AGNE). A insulina age de maneira inversa, ativando a lipase lipoprotéica que hidroliza os triacilglicerídeos das lipoproteínas circulantes para que os AGL passem para o interior dos adipócitos, e inibe a lipase hormônio-sensível, enzima localizada no interior dos adipócitos que hidroliza os triacilglicerídeos, levando a um aumento destes no interior dos adipócitos. (Nelson; Cox, 2010). Ácidos graxos são estocados no tecido adiposo na forma de triacilglicerídeos. O sistema nervoso autônomo, para atender à demanda energética, controla diretamente o metabolismo lipídico periférico (estimulando a lipólise em situações de aumento da demanda energética, ou inibindo-a em situações de diminuição da demanda energética), ou ele pode agir por ação indireta por meio dos hormônios insulina, glucagon e adrenalina (Nogueiras et al., 2007).

Após a clonagem dos genes dos receptores de melanocortina 3 (Gantz et al., 1993a) e 4 (Gantz et al., 1993b) surgiram evidências de que um agonista sintético desses receptores suprime a ingestão alimentar, enquanto que um antagonista sintético tem o efeito oposto. O relato de que camundongos com deleção do receptor de melanocortina-4 (*mc4r*) são

hiperfágicos e muito obesos indica que a sinalização do mc4r limita a ingestão alimentar e a massa gorda corporal. Camundongos com deleção em heterozigose do *MC4R* se tornam obesos, embora menos que os *knockouts* homozigotos (Schwartz et al., 2000). Ausência total do MC4R portanto, predispõe a hiperfagia e ganho de peso patológico. Esses achados têm se estendido a humanos com mutações no *MC4R* que também apresentam obesidade (Vaisse et al., 1998; Yeo et al., 1998).

O MC4R é uma proteína de 332 aminoácidos codificada por um gene de um único exon localizado no cromossomo 18q22 (Gantz et al., 1993b). Ele pertence à família de receptores acoplados à proteína G (GPCR) e sua sinalização envolve a cascata de ativação mediada pela adenilato-ciclase (Sundaramurthy et al., 1998), com geração de AMP cíclico. A expressão do MC4R ocorre virtualmente em quase toda a região cerebral, incluindo córtex, tálamo, hipotálamo, tronco cerebral e medula espinal. Diferentemente do MC3R, o RNA mensageiro do *MC4R* é encontrado tanto nos neurônios parvicelulares quanto nos magnocelulares dos núcleos paraventriculares do hipotálamo, sugerindo uma função no controle central da função pituitária. Ele é expresso em várias regiões corticais e do tronco cerebral envolvidos com a regulação da ingestão alimentar (Mountjoy et al., 1994). A ativação do receptor de melanocortina-4 pelo hormônio estimulador do melanócito (α -MSH) aumenta o gasto energético e diminui a ingestão de alimentos (Kim et al., 2002).

Nos últimos 10 anos, alguns distúrbios monogênicos que exercem efeitos deletérios sobre as moléculas sinalizadoras dos circuitos centrais da regulação da ingestão alimentar que levam à obesidade de início precoce foram caracterizados: nos genes do receptor da leptina (Clement et al., 1998) e da convertase 1 (Schwartz et al., 2000), da proopiomelanocortina (Krude et al., 1998), da leptina (Montague et al., 1997) e do receptor de melanocortina-4 (Gotoda et al., 1997). Esses estudos ajudaram a melhor caracterizar a ação dos receptores das melanocortinas, gerando esclarecimentos fisiológicos relevantes do sistema melanocortina.

Mutações no *MC4R* parecem ser a causa mais comum de obesidade genética, talvez pelo fato de os indivíduos clinicamente afetados apresentarem mutações que ocorrem em heterozigose e, portanto, apenas um evento mutacional ser necessário. De todas as causas genéticas de obesidade, a leptina, apesar de rara, foi a primeira a permitir uma terapia de reposição hormonal (Farooqi et al., 2002).

Heranças dominantes e recessivas de obesidade causadas por mutações monogênicas no receptor de melanocortina-4 do tipo *missense*, *nonsense* e *frameshift* já foram descritas em várias populações, e a frequência dessas mutações variou entre 0,5% nos adultos obesos e 6% em crianças com obesidade grave (Farooqi; O'Rahilly, 2006). Caracteristicamente, essas

crianças apresentam um fenótipo de hiperfagia que quase sempre se inicia no primeiro ano de vida. Com o decorrer do tempo, ocorre aumento do conteúdo de tecido adiposo e tecido muscular e um grande aumento da densidade mineral óssea. Estes indivíduos também apresentam crescimento linear acelerado na infância, consequência da hiperinsulinemia, e função reprodutiva preservada. Adultos obesos portadores de mutações no *MC4R* relatam hiperfagia menos acentuada e são menos hiperinsulinêmicos e obesos do que crianças com a mesma mutação, confirmando que a gravidade deste quadro clínico tende a melhorar com o tempo (Farooqi; O’Rahilly, 2006).

O objeto deste estudo é o gene do *MC3R*, que tem um único éxon, e está localizado no cromossomo 20q13.2-q13.3. Ele codifica uma proteína de 361 aminoácidos que funciona como um receptor que pertence à família dos receptores acoplados à proteína G. Estruturalmente, é uma cadeia polipeptídica que apresenta sete alfa-hélices transmembrana, com um N terminal extracelular que é glicosilado, uma ampla alça citoplasmática que é composta principalmente de aminoácidos hidrofílicos entre as alças 5 e 6 onde se liga a proteína G, e um domínio hidrofílico no terminal C citoplasmático. As proteínas G são assim chamadas por causa de sua interação com os nucleotídeos guanina, GTP e GDP. Proteínas G consistem de 3 subunidades α , β e γ . Quando um agonista é ligado ao receptor de membrana, ocorre uma mudança conformacional envolvendo o domínio citoplasmático do receptor, levando-o a adquirir alta afinidade pelo complexo $\alpha\beta\gamma$. A associação desse complexo com o receptor causa a saída do GDP da subunidade α e a sua substituição por GTP [troca GDP/GTP], que por sua vez, causa a dissociação do trímero da proteína-G liberando α -GTP e $\beta\gamma$. Estas são as formas “ativas” da proteína-G, que se difundem na membrana e podem se associar a várias enzimas e canais de íons, causando ativação da adenilato-ciclase e aumentando a produção de AMPc (adenosina mono fosfato cíclico) na célula. O AMPc aumenta a atividade da PKA (proteína quinase A). A PKA por sua vez, catalisa a transferência do fosfato terminal do ATP para certos resíduos de serina ou treonina em algumas enzimas específicas (Boron; Boulpaep, 2009).

A expressão do *MC3R* foi primeiramente verificada no cérebro (córtex, tálamo, hipocampo e hipotálamo), placenta, estômago, duodeno e pâncreas. No hipotálamo, o *MC3R* está localizado nos neurônios dos núcleos arqueado e ventromedial, porém, com uma distribuição mais restrita do que a expressão do *MC4R*, e frequentemente está co-localizado com o mesmo. Seus principais agonistas são os peptídeos biologicamente ativos derivados da POMC: α -MSH, β -MSH, γ -MSH e ACTH. Todos os seus ligantes possuem um núcleo heptapeptídico comum [Met-Glu(Gly)-His-Phe-Arg-Trp(Asp)]. Sua atividade farmacológica

verificada pela produção de AMPc mostra que ele responde bem aos 4 ligantes, e isso é atribuído provavelmente ao núcleo conservado heptapeptídico desses ligantes (Gantz et al., 1993a). Os antagonistas endógenos são *agouti* e AgRP.

A partir de então, estudos em camundongos evidenciaram que a ausência do receptor levava ao aumento do depósito de gordura, redução da massa muscular, e maior eficiência alimentar, que é a taxa de ganho de peso por ingestão alimentar, do que os não deficientes (Chen et al., 2000). Consistente com o aumento do depósito de gordura, esses camundongos apresentam hiperleptinemia e os machos desenvolvem hiperinsulinemia moderada, porém, não apresentam alteração significativa dos níveis de corticosterona ou tiroxina total (T4). Camundongos que não expressam o *mc3r* e *mc4r* se tornam mais pesados do que os camundongos que não expressam só o gene do *mc4r* (*mc4r*^{-/-}). Daí conclui-se que os receptores *mc3r* e *mc4r* exercem funções independentes na regulação da homeostase energética (Chen et al., 2000). Estudos que analisam o balanço energético de camundongos que não expressam o *mc3r* e *mc4r* indicam que a adiposidade aumentada observada em ambos os modelos envolve um desbalanço da ingestão de gordura ingerida e a sua oxidação (Butler, 2006). Em contraste com os camundongos que não expressam o *mc4r*, que exibem aumento da ingestão alimentar, aumento do crescimento somático e alterações no metabolismo, camundongos *mc3r*^{-/-} só apresentam síndrome metabólica. Além disso, eles também apresentam um aumento incomum da frequência respiratória quando são submetidos à dieta rica em gordura, sugerindo uma redução da taxa de oxidação gordura/carboidrato. Os camundongos machos *mc3r*^{-/-} também exibem letargia, sugerindo redução do gasto energético (Butler, 2000).

Estudos em camundongos têm demonstrado outras ações para o *mc3r* como a participação central do *mc3r* na modulação da resposta inflamatória do hospedeiro, e com detecção do receptor no peritônio e em macrófagos da articulação do joelho (Getting et al., 1999, 2001, 2002, 2003). No coração, a ativação do *mc3r* parece também mostrar um efeito protetor na reperfusão da lesão isquêmica (Getting et al., 2004; Guarini et al., 2002).

Embora esteja bem estabelecido que mutações espontâneas no gene do *MC4R* sejam as formas mais comuns de obesidade monogênica, a relevância de mutações no *MC3R* na obesidade humana ainda não ficou clara. Os primeiros estudos genéticos humanos sugeriram que os *loci* que compreendem o gene do *MC3R* no cromossomo 20q13 estariam associados com obesidade e diabetes tipo 2 (Bowden et al., 1997; Ji et al., 1997; Lembertas et al., 1997; Zouali et al., 1997). Porém, existem vários estudos de triagem em larga escala em pacientes com obesidade grave que não identificaram qualquer mutação nesse gene; encontraram

apenas polimorfismos, e alguns deles nem estavam associados à obesidade (Boucher et al., 2002; Feng et al., 2005; Hani et al., 2001; Li et al., 2000; Schalin-Jantti et al., 2003; Wong et al., 2002; Yiannakouris et al., 2004).

Entretanto, Lee et al. (2002), em uma amostra de 41 crianças e adolescentes obesos, detectou a mutação p.Ile183Asn em uma criança de 13 anos com obesidade grave (IMC 36,6 Kg/m²). Essa mutação representa uma troca do aminoácido isoleucina pela asparagina no codon 183, localizado na segunda alça intracitoplasmática, que leva a um defeito na sinalização do receptor. Esse receptor mutante poderia causar obesidade por haploinsuficiência. A isoleucina no códon 183 é um resíduo altamente conservado e hidrofóbico. O domínio transmembrana interage diretamente com as proteínas G. A asparagina é hidrofílica e aboliu totalmente a produção de AMPc por causa de uma interação anormal com a proteína G. A expressão na superfície celular e ligação do agonista são normais. Em estudos funcionais, essa mutação mostrou completa ausência de sinalização.

Em 2007, o mesmo autor, em uma amostra de 201 obesos detectou mais duas novas mutações. A primeira delas foi p.Ala70Thr em uma criança de 11 anos com IMC de 35 kg/m². Essa mutação representa uma troca do aminoácido alanina por uma treonina no codon 70, localizada no domínio extracelular dentro da região crítica para ligação com o agonista. A alanina é hidrofóbica e a treonina hidrofílica, o que pode resultar numa mudança significativa na conformação e função do receptor. Em estudos funcionais, essa mutação mostrou sinalização reduzida. A segunda foi p.Met134Ile, em uma criança de 12 anos com IMC de 31,6 kg/m². Essa mutação representa uma troca do aminoácido metionina pela isoleucina no codon 134, localizada na segunda região transmembrana dos 7 domínios transmembrana. A metionina e a isoleucina são hidrofóbicas. Em estudos funcionais, essa mutação mostrou sinalização reduzida.

Em 2008, Mencarelli et al., em um estudo com 290 obesos, detectaram mais 3 mutações que serão descritas a seguir. A mutação p.Ala293Tre foi encontrada em um indivíduo de 67 anos, com IMC de 46 de kg/m². Essa mutação representa uma troca do aminoácido alanina por uma treonina no códon 293, no sexto domínio transmembrana do receptor. O estudo funcional desta mutação não revelou perda de função do receptor. A mutação X361Ser foi encontrada em um indivíduo de 22 anos, com IMC de 44,3 kg/m². Essa mutação representa a abolição do códon de parada e inserção de 7 aminoácidos (SDAGPWL) ao C terminal intracelular do receptor. O estudo funcional desta mutação não revelou defeitos na expressão da superfície celular, sítio de ligação e sinalização. A mutação p.Ile335Ser foi encontrada em um indivíduo de 56 anos, com IMC de 39 Kg/m². Essa mutação representa uma troca do aminoácido isoleucina por uma serina no códon 335, no sétimo domínio

transmembrana do receptor. Essa mutação levou à retenção intracelular que impediu a ligação e sinalização do receptor. A isoleucina na posição 335 é totalmente conservada em todos os receptores de melanocortina clonados. Mutações na isoleucina junto a resíduos polares com carga como o ácido aspártico e arginina resultaram em retenção intracelular (Tao, 2007).

Todas estas mutações se apresentaram em heterozigose, quatro delas revelaram perda de função, por se localizarem em regiões mais conservadas, importantes na manutenção da estrutura do receptor.

Dois polimorfismos foram encontrados na região codificadora do *MC3R*. O polimorfismo Tre6Lis foi localizado no domínio extracelular N-terminal onde ele poderia romper o ponto de fosforilação pós-transdução pela serina/treonina quinase caseína quinase II e o p.Val81Ile foi localizado na primeira hélice transmembrana. Embora individualmente eles não tenham efeito no sítio de ligação e sinalização (Wong et al, 2002; Tao & Segaloff, 2004; Feng et al, 2005), a co-ocorrência dos dois causa inativação parcial e está associada com maior obesidade em Afro-americanos (Feng et al, 2005), sugerindo interação raça e genótipo.

1.1 Justificativa do estudo

A clonagem dos receptores da melanocortina, assim como seus estudos em camundongos *knock-out* para os genes desses receptores e a busca por mutações em humanos que reproduzam esses estudos, tem levado ao conhecimento da fisiologia do sistema melanocortina, que regula a ingestão alimentar e o balanço energético, e das alterações do mesmo.

O α -MSH é o principal agonista dos receptores 3 e 4 da melanocortina. Várias mutações no *MC4R* já foram identificadas em humanos, e estão presentes em 0,5 – 6,0 % das crianças com obesidade grave (Farooqi; O’Rahilly, 2006), sendo que no *MC3R* os poucos estudos existentes não são suficientes para se estabelecer uma forte relação causal com a obesidade. Em camundongos, está bem caracterizado que a ausência de expressão desse receptor leva à massa gorda aumentada, diminuição de massa magra e maior eficiência alimentar quando comparados com camundongos selvagens (Chen et al., 2000). Com base nessas evidências é importante que se verifique a presença de mutações e/ou polimorfismos no *MC3R* na população, e que se fortifique a relação de causalidade destas mutações com a obesidade grave de início precoce.

2. Objetivos

O objetivo deste estudo é identificar a presença de mutações ou polimorfismos no gene do *MC3R*, em uma população composta de um grupo de crianças obesas e comparar com um grupo controle de indivíduos com peso normal.

Visa ainda avaliar a associação de alterações genótípicas do *MC3R* com dados clínicos, antropométricos e bioquímicos nos obesos com e sem a mutação/polimorfismo.

3. Métodos

3.1 Desenho do estudo

O desenho do estudo foi de caso-controle. Foi feita triagem de mutações e/ou polimorfismos no gene do *MC3R* por meio do sequenciamento do gene no grupo de crianças obesas, e pela técnica de *Restriction Fragments Length Polimorphisms* (RFLP) foi investigada a presença ou ausência destas variações no grupo controle sem obesidade. Parâmetros antropométricos, clínicos e bioquímicos foram comparados entre os indivíduos obesos com e sem mutação e/ou polimorfismos.

3.2 Indivíduos

Foram selecionadas para o estudo 67 crianças obesas e sem nenhum grau de parentesco dos Ambulatórios de Obesidade na Infância e Adolescência (AOIA), de Obesidade Infantil (OBIN) e de Puericultura (APUE) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP (HCFMRP-USP) e das Unidades de Saúde da Prefeitura de Ribeirão Preto que preencheram os seguintes critérios de inclusão: crianças gravemente obesas e cuja obesidade tenha se iniciado aos 8 anos ou antes (Tabela 1). Como definição de crianças gravemente obesas, utilizou-se o índice de obesidade de Newen-Goldstein que classifica como gravemente obesa a criança cujo peso exceda a 40% do peso ideal para idade e sexo quando comparado à curva de referência do CDC 2000 (Kuczmarski et al., 2000). Entraram no estudo 40 crianças do sexo masculino e 27 do sexo feminino, sendo 46,3% brancas, 46,3% mulatas e 7,5% negras cuja cor foi auto-referida pela criança ou pela mãe quando esta não fosse capaz de fazê-lo. Não foram incluídas no estudo, crianças com doenças endócrinas, metabólicas, genéticas ou outras doenças crônicas que interfiram na obesidade.

Tabela 1 - Características gerais da amostra de obesos.

Variáveis	Média ± dp	Maximo	Mínimo	Mediana
Idade (anos e fração de ano)	8,46 ± 4,10	15,0	0,4	9,0
Idade início obesidade (anos)	3,2 ± 2,5	8,0	0,1	3,0
Relação peso/estatura (n = 62)	170,0 ± 26,3	262,9	137,8	162,6

3.3 Controles

Foram utilizados como controles para comparação da frequência de mutações e/ou polimorfismos, 71 adultos jovens que tiveram material para DNA coletado aos 23-25 anos de idade em um estudo de coorte de nascimentos (Barbieri et al., 2006), que haviam nascido com peso adequado para a idade gestacional de acordo com a curva de Williams et al. (1982), com IMC entre 18,5 e 24,9 kg/m² na idade adulta, e que tinham sido avaliados aos 8 anos de idade e não apresentavam sobrepeso ou obesidade, segundo os critérios do CDC2000 (IMC maior que o percentil 10 e menor que o percentil 85 - para os meninos: 14,2<IMC<18; para as meninas: 14<IMC<18,2).

3.4 Cálculo amostral

O cálculo do tamanho amostral foi realizado utilizando-se o programa computacional STATA. Para este cálculo foi considerado nível de confiança (Z_c) de 80%, o tamanho populacional (N) foi estimado pelo tamanho da população alvo, isto é, número de pacientes com obesidade de início precoce atendidos pelo HCFMRP-USP, e a margem de erro (m) da média da população foi estabelecida em 3%.

sampsi 0.40 0.20, alfa (0.05) poder (.80) razão(2)

Amostra estimada para comparação de proporções de 2 grupos

Teste Ho: $p_1 = p_2$, onde p_1 é a proporção na população 1 (obesos)

e p_2 é a proporção na população 2 (controles)

Assumptions:

alfa = 0.0500 (two-sided)

poder = 0.8000

$p_1 = 0.4000$

$p_2 = 0.2000$

$n_2/n_1 = 2.00$

Tamanho estimado da amostra necessária:

$n_1 = 67$

$n_2 = 134$

3.5 Aspectos éticos

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP (processo HCRP N° 8322 / 2008). Foram assinados pelos pais ou responsáveis um termo de consentimento esclarecendo os objetivos do estudo e uma autorização para guarda de material biológico.

3.6 Avaliação nutricional

3.6.1 Antropometria

Os dados antropométricos peso, estatura e circunferência da cintura foram medidos com técnica padronizada (Lohman, 1988) e por equipe de enfermagem treinada, na sala de antropometria do Ambulatório de Pediatria, no dia da primeira entrevista. O IMC é apresentado na forma de percentil e escore z que foram calculados com o programa EpiInfo que usa como referência as curvas do CDC 2000, para as crianças maiores que 5 anos, e com o programa WHO Anthro v 3.0.1 para os menores que 5 anos. O z escore do IMC foi classificado como obesidade quando maior que 2, e obesidade grave quando maior que 3 (Weiss, 2004; WHO, 2007). A circunferência da cintura foi medida no ponto médio entre a borda superior da crista ilíaca e a borda inferior da última costela, no momento da expiração profunda, com o indivíduo em pé, com os pés afastados 25 – 30 cm e os braços soltos ao longo do corpo. O ponto de corte utilizado para classificar obesidade com a circunferência da cintura foi maior ou igual ao percentil 90 (McDowell, 2005).

A pressão arterial foi medida segundo as recomendações da I Diretriz de prevenção da aterosclerose na infância e na adolescência. A escolha do tamanho do manguito foi feita baseada na medida da circunferência máxima braquial e o esfigmomanômetro utilizado foi o de coluna de mercúrio. A pressão arterial sistólica foi anotada quando do aparecimento dos ruídos de Korotkoff (fase I) e a diastólica correspondeu ao desaparecimento dos ruídos (fase V).

3.6.2 Interrogatório

No primeiro contato com os pacientes feito nos consultórios do AOIA, OBIN e APUE, os pacientes receberam informações sobre a pesquisa, e sobre como seria a sua participação nela. Assinado o termo de consentimento, foi preenchida a ficha com os dados dos pacientes. As comorbidades das crianças obesas foram obtidas com base no interrogatório dos diferentes aparelhos feito com o acompanhante da criança, sendo anotada a presença ou ausência de sintomas ou doenças previamente diagnosticadas referentes aos aspectos psicológicos/emocionais, e aos aparelhos respiratório, locomotor, gastrointestinal, endocrinológico, neurológico, cardiovascular e urinário. Dos antecedentes familiares foram identificadas as seguintes morbidades que podem estar associadas à obesidade, presentes em parentes: hipertensão arterial, diabetes mellitus tipo 2, obesidade materna, presença de irmãos obesos, doença hipertensiva específica da gravidez, síndrome do ovário policístico, puberdade precoce, intolerância à glicose, diabetes mellitus gestacional.

3.6.3 Coleta de sangue e bioimpedanciometria

O segundo contato foi feito na Unidade de Pesquisa Clínica do HCFMRP-USP, quando foram colhidos os exames de sangue e feita a bioimpedância. Este é o método que foi utilizado para estimar a composição corporal em porcentagem de água corporal total, massa livre de gordura e a gordura corporal (Houtkooper et al., 1992). O aparelho utilizado foi o Bodystat® QuadScan 4000 com eletrodos TBW. O exame foi realizado pela manhã, logo após a coleta de sangue, em jejum, sem sapatos e meias, com roupas leves e removidos todos e quaisquer adornos de metal. As crianças foram posicionadas em decúbito dorsal, sobre uma superfície não condutora de corrente elétrica, com os braços e pernas separados em torno de 45° de ângulo um em relação ao outro. Os eletrodos foram colocados em contato com a pele previamente limpa com álcool. Os eletrodos fontes de corrente foram colocados na mão e no pé direitos, e os eletrodos sensores no pulso e tornozelo direitos. O aparelho foi calibrado antes do exame de cada criança e a leitura foi feita pelo próprio aparelho (Heyward; Stolarczyk, 2000). A adiposidade corporal foi comparada com a tabela de referência de

McCarthy et al., 2006, que sugere os percentis 85 e 95 respectivamente, para sobrepeso e obesidade.

3.7 Exames laboratoriais

Amostras de sangue (total de 15ml) para análise do DNA foram colhidas das crianças obesas, em jejum de 12 horas, no momento em que elas colheram os exames de colesterol e frações, glicemia de jejum, insulina basal, e TSH que são exames de rotina solicitados no ambulatório, em data mais próxima possível da última consulta, para evitar transtornos ao paciente. Resistência insulínica foi calculada usando o modelo de homeostase HOMA-IR (Atabek & Pirgon, 2007).

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{Insulina de jejum } (\mu\text{U/ml}) \times \text{glicemia de jejum } (\text{mmol/l})}{22,5}$$

3.8 Coleta das amostras de sangue

As amostras de sangue das crianças obesas foram colhidas na Unidade de Pesquisa Clínica do HCFMRP-USP. Confirmado o estado de jejum de doze horas (previamente orientado na inclusão), em posição sentada a criança foi submetida à coleta de 15 ml de sangue para extração de DNA e análise das concentrações basais plasmáticas de glicose, insulina, TSH, colesterol total, triglicérides, HDL-C e LDL-C. Esta coleta de sangue foi feita por punção de veia na prega cubital com cateter ou agulha Vacutainer®. As amostras de sangue foram coletadas em tubo Vacutainer® com EDTA para extração de DNA, em tubo Vacutainer® com fluoreto de sódio para dosagem da glicose plasmática, em tubo Vacutainer® com soro e gel para dosagem de TSH e para as dosagens de insulina, colesterol total, triglicérides, HDL-C e LDL-C as amostras foram colhidas em tubo Vacutainer® seco. Todas as amostras sanguíneas foram acondicionadas em frascos previamente rotulados, aqueles destinados à dosagem da glicose e do DNA foram resfriados a temperatura entre zero e 5°C por até 60 minutos. As dosagens de glicose foram realizadas no mesmo dia, no Laboratório de Endocrinologia do HC-FMRP/USP, pelo método da glicose oxidase (Labtest).

As dosagens de TSH (*Immulite 2000*, DPC *Cirrus*) e insulina (DPC) também foram realizadas no laboratório de endocrinologia pelo método da quimioluminescência, com os respectivos kits comerciais. Para as dosagens de colesterol total, triglicérides, HDL-C e LDL-C as amostras de sangue foram encaminhadas para o laboratório de Nutrição do HCRP/USP e dosadas pelo método enzimático do kit comercial Labtest.

3.9 Valores de referência para a análise dos dados bioquímicos

Os valores de referência utilizados basearam-se nas recomendações da I Diretriz de Prevenção da Aterosclerose na Infância e na Adolescência (2005).

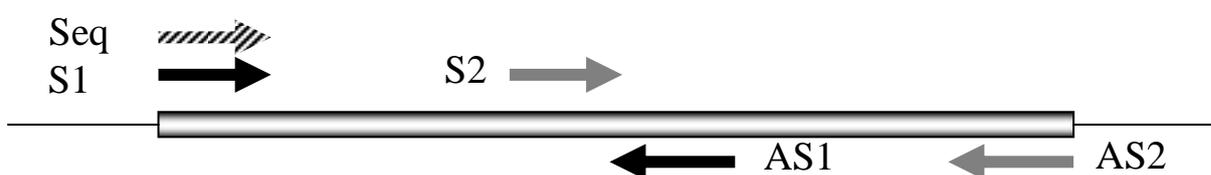
Não existe consenso sobre os critérios de definição da Síndrome metabólica para crianças e adolescentes, embora alguns estudos já utilizem o termo também para este grupo populacional (Weiss 2004, Reinehr, 2007). A I Diretriz não recomenda nenhum critério diagnóstico para síndrome metabólica em crianças e adolescentes, e neste estudo os parâmetros da síndrome metabólica foram avaliados individualmente em concordância com os critérios da I Diretriz de Prevenção da Aterosclerose na Infância e na Adolescência.

- Colesterol total aumentado: valores ≥ 170 mg/dL;
- Triglicérides aumentados: valores ≥ 130 mg/dL.
- HDL-C – colesterol baixo: valores < 45 mg/dL;
- LDL-C – colesterol aumentado: valores ≥ 130 mg/dL
- Glicemia de jejum alterada: valores ≥ 100 mg/dL
- Insulina basal normal $< 15\mu\text{U/L}$,
 limítrofe alto 15 a $20\mu\text{U/L}$,
 alto $> 20 \mu\text{U/L}$
- Ponto de corte para HOMA-IR em pré-púberes: 2,5 (Madeira, 2008)
- Ponto de corte para HOMA-IR em púberes: 3,0 (Atabek e Pirgon, 2007).

3.10 Análise de DNA

Foi feita no laboratório de endocrinologia do HCRP da FMRP-USP. Foi analisado o DNA genômico extraído dos leucócitos periféricos. O único exon do gene do *MC3R* foi amplificado por reação de cadeia de polimerase (PCR) em dois fragmentos que cobriram toda a região codificadora do *MC3R*.

A figura abaixo mostra o desenho dos *primers* para os fragmentos 1 e 2:



MC3R primer sense 1 (S1): 5'- GGGAGACAGAAGGAAGACAGC - 3' e
MC3R primer anti-sense 1 (AS1): 5'- GACGCCGCAGCAGACCCAGAT - 3';
MC3R primer sense 2 (S2): 5'- TGCAACCTCCTGGCCATCGC - 3' e
MC3R primer anti-sense 2 (AS2): 5'- CGTGGATGGAAAGTCAAAAAGT - 3';
MC3R primer sequenciamento (Seq): 5'- TCTCTCTACCCTCCCCATCC-3'.

Figura 2 – Localização dos *primers* para os fragmentos 1 e 2 e do *primer* para sequenciamento no éxon do *MC3R*.

O fragmento 1 tem 932 pares de bases e o fragmento 2 tem 632 pares de bases. A tabela 2 mostra as temperaturas com as quais as reações foram padronizadas.

Tabela 2 – Temperaturas das PCRs dos dois fragmentos.

Fragmentos	Desnaturação prolongada	Número de ciclos	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão prolongada
Fragmento 1	95°C – 5'	35	95°C – 45''	63°C – 45''	72°C – 1'	72°C – 10'
Fragmento 2	95°C – 5'	36	95°C – 45''	56°C – 45''	72°C – 1'	72°C – 10'

Os dois segmentos alongados *amplicons* foram seqüenciados usando os *primers* de seqüenciamento:

MC3R primer Seq: 5'TCTCTCTACCCTCCCCATCC-3',

MC3R primer AS1: 5'- GACGCCGCAGCAGACCCAGAT -3',

MC3R primer S2: 5'-TGCAACCTCCTGGCCATCGC-3', e

MC3R primer AS2: 5'-CGTGGATGGAAAGTCAAAAGT-3'.

O seqüenciamento foi feito pelo kit de seqüenciamentos *ABI Prism® Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing* (*Applied Biosystems, Foster City, CA*). Após a reação de seqüenciamento, as amostras foram purificadas com isopropanol. Depois, esses produtos purificados foram liofilizados e então ressuspensos em 20 µL de TSR (*Template Supression Reagent ABI Prism*), sendo então submetidos à eletroforese no seqüenciador automático *ABI Prism 310* (*Applied Biosystems*). Os cromatogramas foram comparados com a seqüência normal do gene do *MC3R* depositada no GENBANK (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>, número de acesso L06155). As seqüências gênicas foram analisadas pelo *software Codon Code Aligner v 3.5.4*.

A descrição das alterações genéticas é apresentada de acordo com a nomenclatura recomendada pela *Human Genome Variation Society*, que pode ser obtida no endereço eletrônico <http://www.hgvs.org/mutnomen/>

Para identificar a presença de polimorfismos nos controles foi usada a técnica de detecção de polimorfismos por comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) para o polimorfismo 1:c.17C>A (rs3746619). A endonuclease de restrição *TaiI*, isoesquizômero da *MaeII*, corta o DNA em um sítio específico (A[^]CGT), porém o DNA polimórfico altera o sítio de restrição, o que produzirá fragmentos de DNA de diferentes comprimentos. Os fragmentos produzidos foram visualizados em gel de agarose e a diferenciação foi feita entre os DNAs mutados e normais pelo número e comprimento dos fragmentos cortados pela endonuclease (Figura 2).

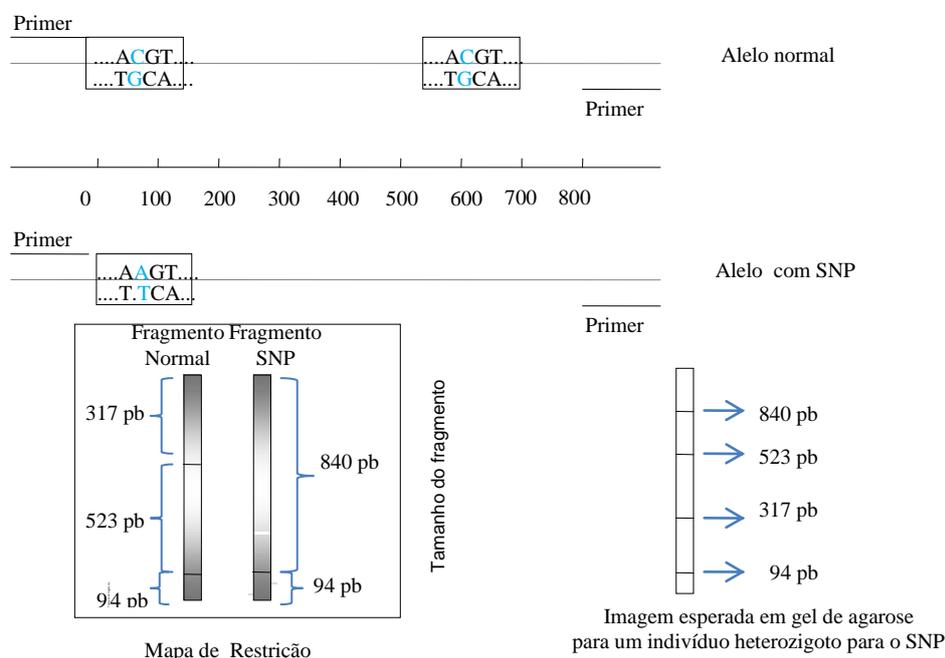


Figura 3 – Exemplo de um heterozigoto para o polimorfismo 1:c.17C>A de um único nucleotídeo (SNP) que leva à perda do sítio de restrição da enzima *Tai*I e altera o sítio. A PCR revela dois tamanhos de fragmentos: o DNA cortado em três fragmentos representa o alelo normal, e o DNA cortado em dois fragmentos representa o alelo polimórfico.

3.11 Análise estatística

Estatística descritiva dos dados foi realizada nos programas *Epi Info*, 2008, v. 3.5.1, e *SAS V. 9*, 2002, sendo apresentados sob a forma de tabelas.

Para verificar a associação entre a presença de variações dos genes estudados e a obesidade foi realizado o teste Qui-Quadrado ou teste exato de Fisher quando pertinente, ao nível de significância de $\alpha = 0,05$. Os resultados das dosagens hormonais e bioquímicas do sangue são expressos em média \pm dp (desvio padrão da média), valor máximo, mínimo e mediana. São comparados os valores dos exames bioquímicos do sangue (glicemia, insulinemia, lipidograma, TSH) e da composição corporal avaliada pela impedância bioelétrica entre os obesos portadores das variações genotípicas e os não portadores. Essas comparações foram feitas pelo teste não paramétrico de Wilcoxon. O nível de significância adotado foi de 5%.

4. Resultados

4.1 Características da amostra

4.1.1 Dados clínicos, anamnese e exame físico

Foram incluídos 67 indivíduos (40 do sexo masculino) com obesidade grave de início precoce. Quarenta e quatro (65,7%) eram pré-púberes (28 do sexo masculino e 16 do sexo feminino). O início da obesidade variou de um mês até oito anos (média $3,21 \pm 2,5$ dp). A população do estudo é composta de 61,2% de crianças provenientes de outras cidades da região e 38,8% provenientes de Ribeirão Preto. Brancos e mulatos participaram em igual proporção (46,3%), e 44,8% das mães tinham oito anos de escolaridade.

Características que podem sofrer influência da obesidade como idade de início da puberdade e idade da menarca, apresentaram valores normais (Tabela 3).

Tabela 3 - Dados de interrogatório da amostra de obesos.

Variáveis	Média \pm dp	Maximo	Mínimo	Mediana
Idade início características sexuais femininas	$9,26 \pm 1,65$	12,0	7,0	10,0
Idade início características sexuais masculinas	$10,47 \pm 1,46$	13,0	8,0	10,0
Idade da menarca (n=6)	$11,58 \pm 1,69$	13,0	8,5	12,0

*Idades em anos e fração decimal de anos.

As comorbidades das crianças obesas e as doenças presentes nas famílias do grupo de obesos são apresentadas nas tabelas 4 e 5 em ordem decrescente de frequência.

Tabela 4 - Comorbidades referidas pelos indivíduos da amostra de obesos.

Variáveis	n	%
Psicológico		
Não	19	28,4
Sim	48	71,6
Respiratório		
Não	28	41,8
Sim	39	58,2
Locomotor		
Não	38	56,7
Sim	29	43,3
Gastrintestinal		
Não	50	74,6
Sim	17	25,4
Endócrino		
Não	61	91,0
Sim	6	9,0
Neurológico		
Não	61	91,0
Sim	6	9,0
Cardiovascular		
Não	63	94,0
Sim	4	6,0
Urinário		
Não	64	95,5
Sim	3	4,5

As doenças presentes na família que podem estar associadas à obesidade estão apresentadas na tabela 5 em ordem decrescente de frequência. As três mais frequentes são: hipertensão arterial, Diabetes Mellitus e obesidade materna.

Tabela 5 - Antecedentes familiares da amostra de obesos.

Variáveis	n	%
Hipertensão arterial		
Ausente	9	13,4
Presente	8	86,6
Diabetes mellitus		
Ausente	23	34,3
Presente	44	79,1
Obesidade materna		
Ausente	24	35,8
Presente	43	64,2
Irmãos obesos		
Ausente	35	52,2
Presente	20	29,9
Sem informação	12	17,9
Doença hipertensiva específica da gravidez		
Ausente	48	71,6
Presente	19	28,4
Síndrome do ovário policístico		
Ausente	49	73,1
Presente	18	26,9
Puberdade precoce		
Ausente	58	86,6
Presente	9	13,4
Intolerância à glicose		
Ausente	59	88,0
Presente	8	12,0
Diabetes mellitus gestacional		
Ausente	59	88,1
Presente	8	11,9

As três tabelas a seguir, referem-se ao exame físico, sendo que a tabela 6 descreve a antropometria, a tabela 7 os aspectos da pele e a tabela 8 o estadiamento puberal.

Na tabela 6 nota-se escore z do peso e do IMC bem aumentados em relação ao escore z da estatura. Os percentís de IMC encontraram-se entre o valor máximo de 99,9 e mínimo de 94,4. O escore z de IMC com média 2,9 e desvio padrão $\pm 1,0$ evidencia a obesidade da amostra.

Tabela 6 - Exame clínico e antropometria da amostra de obesos.

Variáveis	Média \pm dp	Máximo	Mínimo	Mediana
Escore z do peso	2,95 \pm 0,73	5,0	1,0	2,9
Escore z da estatura	1,17 \pm 1,02	3,5	-0,8	1,0
Escore z do IMC	2,9 \pm 1,0	7,4	1,6	2,6
Relação peso/estatura (n = 62)	170,0 \pm 26,3	262,9	137,8	162,6

IMC = Índice de massa corporal

A circunferência da cintura foi transformada em percentís (programa Epi Info, 2008, v. 3.5.1) e posteriormente categorizada acima ou abaixo do percentil 90, que é indicado como ponto de corte por estar associado a maior chance de doença aterosclerótica. Todas as crianças encontraram-se acima do percentil 90 em relação à tabela de percentís de circunferência da cintura publicada pelo CDC (McDowell, 2005).

Os valores de pressão arterial foram comparados com a tabela de percentís de pressão arterial segundo sexo, idade e estatura da I Diretriz de prevenção de aterosclerose na infância e na adolescência, e categorizados acima ou abaixo do percentil 90, que é o valor indicado pela mesma para diagnosticar pré-hipertensão. 54% por cento dos meninos e 50% das meninas tiveram pelo menos uma das pressões acima do percentil 90 (I Diretriz, Arq. Brás. Cardiol, 2005).

Na tabela 7, a frequência de lipomastia é a mais alta, seguida pela de estrias e acantose.

Tabela 7 - Exame físico da amostra de obesos.

Variáveis	n	%
Lipomastia (n = 40)		
Não	9	13,4
Sim	56	83,6
Sem informação	2	3,0
Estrias		
Não	32	47,8
Sim	35	52,2
Acantose		
Não	35	52,2
Sim	32	47,8
Hirsutismo		
Não	66	98,5
Sim	1	1,5

Foi feita avaliação do estadiamento puberal que classificou 70,0% dos meninos e 59,3% das meninas como impúberes, o que deve estar relacionado com a idade das crianças selecionadas pela amostra.

Tabela 8 - Distribuição do estadiamento puberal segundo sexo da amostra de obesos.

Variáveis	Masculino (n = 40)		Feminino (n = 27)	
	n	%	n	%
Gônadas / Mamas				
Estadio 1	28	70,0	16	59,3
Estadio 2	3	7,5	2	7,4
Estadio 3	7	17,5	4	14,8
Estadio 4	1	2,5	4	14,8
Estadio 5	1	2,5	1	3,7
Pêlos				
Estadio 1	26	65,0	15	55,6
Estadio 2	3	7,5	3	11,1
Estadio 3	5	12,5	4	14,8
Estadio 4	4	10,0	3	11,1
Estadio 5	2	5,0	2	7,4

4.1.2 Bioquímica sanguínea e valores de HOMA – IR (*Homeostasis model assessment – Insulin resistance*)

Tabela 9 - Exames laboratoriais da amostra de obesos.

Variáveis	Média ± dp	Máximo	Mínimo	Mediana
Glicemia (mg/dl)	84,5 ± 25,4	280,0	65,0	82,0
Insulina basal (µIU/ml)	19,6 ± 50,5	390,0	2,0	11,0
Homa-IR*	7,3 ± 35,4	269,4	0,4	2,3
Colesterol total (mg/dl)	161,8 ± 29,5	270,0	108,0	157,0
Triglicerídeos (mg/dl)	102,8 ± 59,8	400,0	26,0	90,0
HDL-C (mg/dl)	39,2 ± 8,6	69,0	24,0	40,0
LDL-C (mg/dl)	103,0 ± 24,0	170,0	64,0	97,0
TSH (µIU/ml)	2,4 ± 1,5	7,1	0,3	2,1

HOMA-IR = *homeostasis model assessment for insulin resistance*; HDL-C = *high density lipoprotein – cholesterol*; LDL-C = *low density lipoprotein – cholesterol*; TSH = *Thyrotropin hormone*.

Na amostra de obesos, dois indivíduos do sexo masculino apresentaram valores de glicemia alterados. Um menino de 12 anos e 8 meses, obeso desde os 2 anos, com pai e mãe obesos e avós diabéticos (segundo informações da mãe), apresentou índice de obesidade =

193%, circunferência da cintura = 132cm, com acantose, estrias, ginecomastia, estadiamento puberal G3P4 e pressão arterial 150x90 mm Hg. O outro menino de 6 anos, obeso desde o primeiro ano de vida, cuja mãe é obesa e o pai hipertenso e diabético, apresentou índice de obesidade 158,9%, sem acantose, com lipomastia, estadiamento puberal G1P1, circunferência da cintura acima do percentil 90 e pressão arterial entre os percentís 95 e 99 (hipertensão arterial estágio I segundo a I Diretriz). Os resultados das dosagens séricas desses dois indivíduos são apresentados na tabela 10.

Tabela 10 - Dosagens séricas realizadas dos dois indivíduos com glicemia alterada.

Idade	Glicemia	Insulina	HOMA	CT	TG	HDL	LDL	TSH
12,66	280	390	269,41	270	400	36	159	1,71
6	101	<2	-	157	73	47	95	6,42*

Idade em anos e fração decimal de anos, insulina em $\mu\text{IU/mL}$, glicemia e colesteróis em mg/dl.

*Este indivíduo teve dosagem de T4L = 1,6 $\mu\text{IU/mL}$

A tabela 11 mostra a classificação das dosagens de insulina segundo os critérios da I Diretriz de prevenção da aterosclerose na infância e na adolescência que evidenciou 16,1% de indivíduos com valores altos de insulina. Foram excluídos dessa análise o paciente diabético e outros 10 indivíduos impúberes, 9 do sexo masculino que apresentaram valores indetectáveis de insulina (insulina < 2 $\mu\text{IU/ml}$).

Tabela 11 – Valores de insulina dos indivíduos obesos classificados de acordo com os critérios da I Diretriz

Insulina ($\mu\text{IU/ml}$)	Valores	n	%
< 15	Normal	35	62,5
Entre 15 e 20	Limítrofe alto	12	21,4
> 20	Alto	9	16,1

A tabela 12 mostra a distribuição da insulina com alguns fatores de risco para a resistência insulínica.

Tabela 12 – Distribuição dos valores médios de insulina por sexo, faixas etárias, categorias de ING, acantose e puberdade.

n = 56	Média de Insulina (μ IU/ml)
Sexo	
Masculino	11,69
Feminino	14,42
Idade (anos)	
0 a 5	4,47
5 a 10	8,08
10 a 15	12,38
ING	
1º quartil (137-156)	10,90
2º quartil (157-164,5)	12,10
3º quartil (165-189,5)	13,00
4º quartil (190-263)	13,00
Acantose	
Ausente	9,87
Presente	15,60
Puberdade	
Ausente	10,7
Presente	16,2

ING = Índice de obesidade de Newen-Goldstein.

Como o escore z de IMC na idade da puberdade é prejudicado pelo o estirão de crescimento e, portanto, para a análise da distribuição da insulinemia de jejum pela obesidade, foi utilizado o Índice de obesidade de Newen-Goldstein (ING)

Os valores de HOMA-IR foram classificados como alterados quando $\geq 2,5$ para os indivíduos impúberes (Madeira, 2008) e quando $\geq 3,0$ para os púberes (Atabek e Pirgon, 2007). Apresentaram valores alterados 38% dos impúberes e 55% dos púberes. O indivíduo com valor de HOMA-IR = 269,41 foi excluído desta análise.

Dez indivíduos impúberes apresentaram valores indetectáveis de insulina (insulina $< 2\mu$ IU/ml). Para esses mesmos indivíduos não foi possível calcular o HOMA.

A tabela 13 mostra o resultado da dosagem das frações de colesterol do grupo de 67 obesos comparados com a I Diretriz de prevenção de aterosclerose na infância e adolescência.

Tabela 13 - Número absoluto e relativo dos 67 indivíduos com lipídeos desejáveis, limítrofes ou aumentados.

Lipídeos	Desejáveis		Limítrofes		Alterados	
	n	%	n	%	n	%
CT	24	35,8	18	26,9	25	37,3
TG	41	61,2	12	17,9	14	20,9
HDL-C	15	22,4	-	-	52	77,6
LDL-C	36	53,7	15	22,4	16	23,9

CT: colesterol total; TG: triglicérides; HDL-C: HDL colesterol; LDL-C: LDL colesterol

4.1.3 Avaliação da porcentagem de gordura corporal pela impedância bioelétrica

Das 67 crianças da amostra, 38 (24 do sexo masculino e 14 do sexo feminino) tiveram a adiposidade corporal avaliada pela impedância bioelétrica e 9 não tinham idade suficiente para fazer o exame. Trinta e seis pacientes encontraram-se acima do percentil 95 e um indivíduo encontrou-se entre o percentil 85 e 95 em relação aos valores da tabela de percentís de gordura corporal de acordo com sexo e idade publicada por Mc Carthy et al., em 2006.

4.1.4 Análise do gene do receptor 3 da melanocortina

Foi feito sequenciamento de toda a região codificadora do gene do *MC3R* da amostra de 67 crianças obesas e não foi encontrada nenhuma mutação, entretanto, foi detectada a presença de três polimorfismos do tipo *missense* na região codificadora do gene (Figura 3). Duas variantes alélicas, 1:c.17C>A (rs3746619) e 1:c.241G>A (rs3827103), resultam em mudanças dos aminoácidos treonina por lisina no códon 6 e valina por isoleucina no códon 81 respectivamente. A proteína do MC3R é um receptor com sete domínios transmembrana, e o códon 6 está localizado na extremidade N-terminal extracelular e o códon 81 na primeira hélice transmembrana. Uma terceira variante, 1:c.769C>A (rs61735259), que resulta na mudança do aminoácido arginina por serina no códon 257 também foi encontrada na região codificadora do gene. Ela está localizada na terceira alça intracitoplasmática (na região onde se liga a proteína G), e não foi considerada nas análises por não ter nenhum relato de associação com a obesidade na literatura (Figura 4).

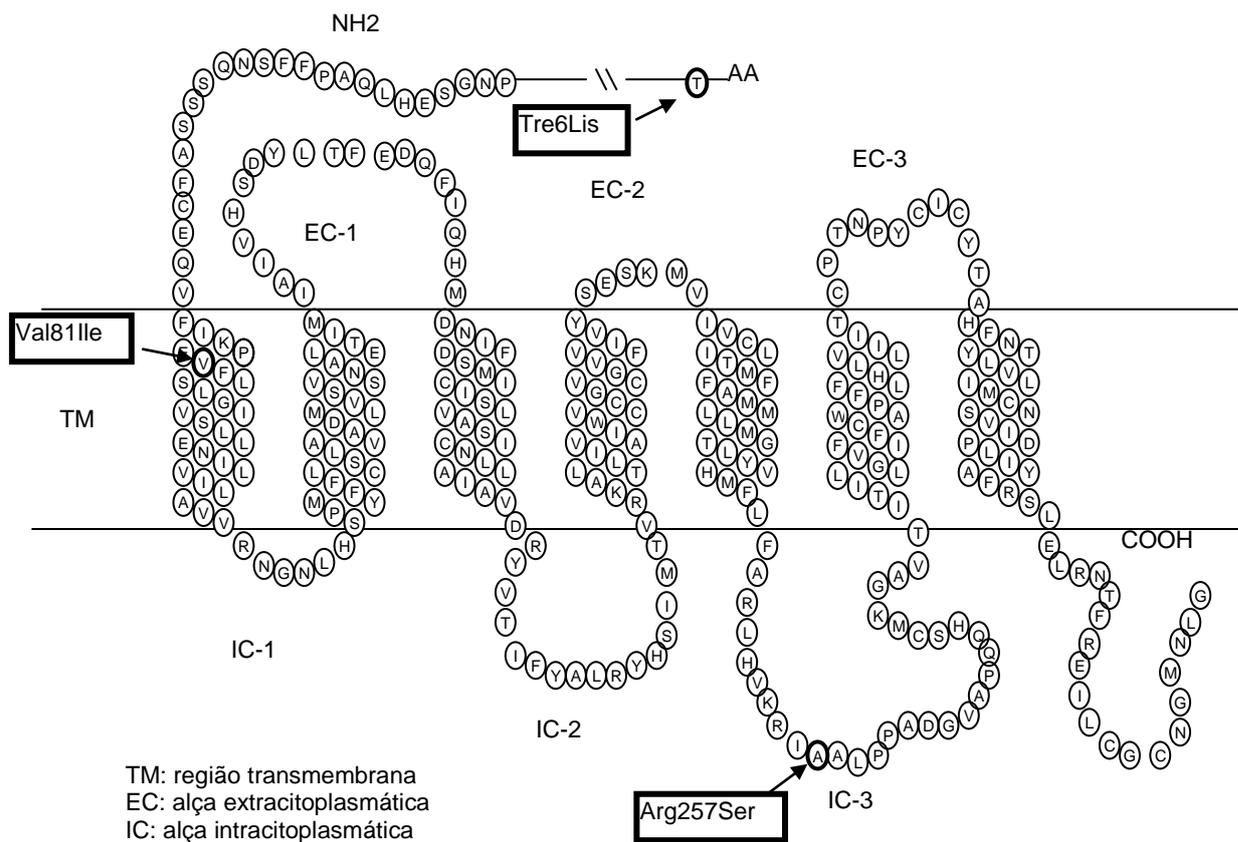


Figura 4 – Localização dos polimorfismos na estrutura bidimensional do MC3R.

O polimorfismo 1:c.17C>A foi observado em 25 crianças obesas (22 heterozigotas e 3 homozigotas), enquanto que o 1:c.241G>A foi observado em 26 das 67 crianças obesas, 25 das quais também apresentaram o polimorfismo 1:c.17C>A, evidenciando o desequilíbrio de ligação.

As figuras 5 e 6 mostram os cromatogramas com os resultados de indivíduos com os dois alelos normais, um heterozigoto para o alelo variante e um homozigoto para o alelo variante para os polimorfismos c.17C>A e c.241G>A respectivamente.

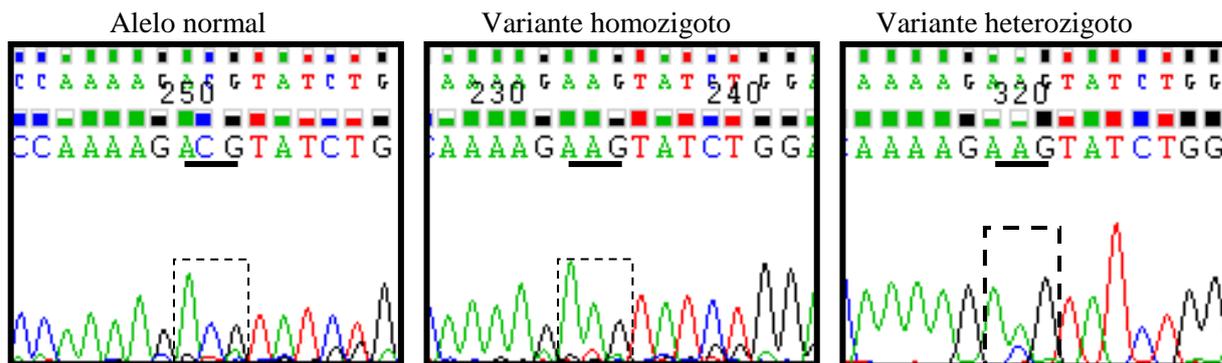


Figura 5 - O polimorfismo **c.17C>A** representa a troca de uma citosina por adenina (ACG→AAG) no códon 6, que troca o aminoácido Tre por Lis.

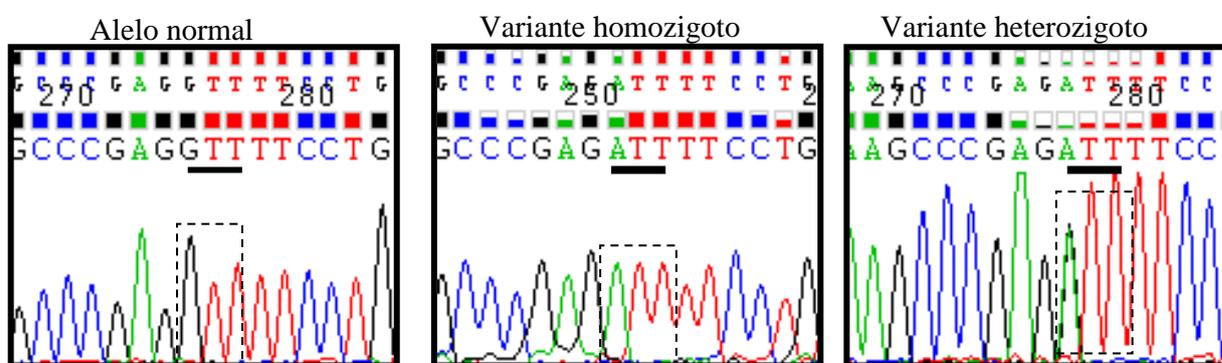


Figura 6 - O polimorfismo **c.241G>A** representa a troca de uma guanina por adenina (GTT→ATT) no códon 81 que troca o aminoácido Val por Ile.

Como os dois polimorfismos analisados se encontram em desequilíbrio de ligação, para a busca nos controles foi feito RFLP somente para o polimorfismo s.17C>A. O polimorfismo s.17C>A e consequentemente, devido ao quase completo desequilíbrio de ligação, o polimorfismo c.241G>A foram encontrados em 23 controles (22 em heterozigose e 1 em homozigose).

As frequências com que esses polimorfismos se apresentaram tanto no grupo de obesos (Tabelas 14 e 15) quanto no grupo controle (Tabela 16) são mostradas abaixo.

Tabela 14 - Frequências de genótipos para os alelos normal e mutado do polimorfismo 1:c.17C>A na amostra de crianças obesas.

Genótipo	Crianças obesas	Frequência relativa observada do genótipo	Alelo	Frequências derivadas de alelo
CC	42	0,627		
CA	22	0,328	C	0,785
AA	3	0,046	A	0,215
Total	67	1		

Tabela 15 - Frequências de genótipos para os alelos normal e mutado do polimorfismo 1:c.241G>A na amostra de crianças obesas.

Genótipo	Crianças obesas	Frequência relativa observada do genótipo	Alelo	Frequências derivadas de alelo
GG	41	0,612		
GA	24	0,358	G	0,791
AA	2	0,03	A	0,209
Total	67	1		

Tabela 16 - Frequências de genótipos para os alelos normal e mutado do polimorfismo 1: c.17C>A na amostra de crianças com peso normal.

Genótipo	Crianças controles	Frequência relativa observada do genótipo	Alelo	Frequências derivadas de alelo
CC	48	0,676		
CA	22	0,310	C	0,83
AA	1	0,014	A	0,17
Total	71	1		

4.1.4.1 Comparação das frequências dos polimorfismos c.17C>A e c.241G>A entre os indivíduos obesos e controles

A comparação das frequências dos genótipos para o polimorfismo c.17C>A no grupo de obesos e controles (Tabelas 17 e 18) não mostrou diferença entre os dois grupos ($p=0,522$).

4.1.4.2 Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Tabela 17 - Distribuição das frequências genotípicas esperadas e observadas do polimorfismo c.17C>A no gene do *MC3R*.

Genótipos		Frequência esperada n (%)	Frequência observada n (%)	χ^2
Obesos (67)	CC	41,9 (62,6%)	42 (62,7%)	$\chi^2 = 0,10225$ χ^2 Tabulado = 0,103
	CA	23,4 (33%)	22 (32,8%)	
	AA	3,1 (4,4%)	3 (4,5%)	
Controles (71)	CC	49 (69,0%)	48 (67,6%)	$\chi^2 = 0,72041$ χ^2 Tabulado = 0,103
	CA	20 (28,0%)	22 (31,0%)	
	AA	2 (2,9%)	1 (1,4%)	

χ^2 tabulado para $p < 0,05$ e 2 graus de liberdade.

Os polimorfismos c.17C>A e c.241G>A do gene do *MC3R* no grupo de crianças obesas não se afastam do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabelas 17 e 18). No grupo controle, o polimorfismo c.17C>A também não se afasta do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabelas 17 e 18).

Tabela 18 - Distribuição das frequências genotípicas esperadas e observadas do polimorfismo c.241G>A no gene do *MC3R*.

	Genótipos	Frequência esperada	Frequência observada	χ^2
		n (%)	n (%)	
Obesos	GG	41,9 (62,6%)	41 (61,2%)	$\chi^2 = 0,516$ χ^2 Tabulado = 0,103
	GA	22,1 (33%)	24 (35,8%)	
	AA	3,0 (4,4%)	2 (3,0%)	
Controles	GG	49 (69,0%)	48 (67,6%)	$\chi^2 = 0,72041$ χ^2 Tabulado = 0,103
	GA	20 (28,0%)	22 (31,0%)	
	AA	2 (2,9%)	1 (1,4%)	

χ^2 tabulado para $p < 0,05$ e 2 graus de liberdade.

4.2 Associação entre a presença do polimorfismo e as variáveis estudadas.

Para as análises comparativas entre crianças obesas com a presença ou ausência do polimorfismo foi utilizado somente o polimorfismo c.17C>A já que ele se encontrou em desequilíbrio de ligação com o polimorfismo c.241G>A. Portanto, a amostra ficou em 25 crianças com o polimorfismo versus uma amostra de 42 crianças sem o polimorfismo.

Não houve associação da presença do polimorfismo com nenhum dos índices de obesidade estudados.

4.2.1 Comparação da cor da pele auto-referida entre os indivíduos controles e obesos, e a presença ou ausência do polimorfismo c.17C>A

Não houve associação entre o polimorfismo c.017C>A e a cor da pele auto-referida (Tabela 19). Nesta análise primeiramente foi calculado o valor de p somente para o grupo de obesos. Compararam-se brancos, negros e mulatos de acordo com a presença do polimorfismo e não houve associação nem mesmo juntando-se mulatos e negros ($p = 0,427$). Foi feita também a comparação de obesos agrupados com os controles para aumentar o n da amostra, porém também não houve associação do polimorfismo com a cor da pele.

Tabela 19 - Distribuição da cor da pele auto-referida segundo a presença do polimorfismo.

Variáveis	Polimorfismo				p
	Ausente		Presente		
	n	%	n	%	
Obesos (67)					
Cor da pele					0,713
Branca	22	52,4	9	36	
Mulata	17	40,5	14	56	
Negra	3	7,1	2	8	
Obesos e controles (138)					
Cor da pele					0,179
Branca	58	64,4	23	48	
Mulata	29	32,2	20	41,7	
Negra	3	3,3	5	10,4	

4.2.2 Associação com idade e índices antropométricos

Tabela 20 - Idades e índices antropométricos segundo a presença do polimorfismo c.17C>A.

Variáveis	Polimorfismo								p
	Ausente				Presente				
	Média ± dp	Máximo	Mínimo	Mediana	Média ± dp	Máximo	Mínimo	Mediana	
Idade	9,1 ± 4,2	15,0	0,4	9,8	7,9 ± 4,1	14,7	0,7	8,5	0,290
Idade início obesidade	3,0 ± 2,7	8,0	0,1	2,0	3,1 ± 2,3	8,0	0,2	3,0	0,820
Escore z de peso	2,9 ± 0,7	4,6	1,0	3,0	2,99 ± 0,71	5,0	2,2	2,9	0,52
Escore z de estatura	1,1 ± 1,1	3,5	-0,8	1,0	1,28 ± 0,90	2,7	-0,5	1,2	0,74
Escore z de IMC	2,8 ± 1,1	7,4	2,1	2,4	3,0 ± 0,9	5,7	1,6	2,7	0,190
Índice de obesidade* n = 62	172,8 ± 23,3	227,0	137,8	168,0	169,0 ± 28,7	262,9	138,5	157,2	0,140

Idades em anos e fração decimal, referidas pelo acompanhante. * Índice de obesidade de Newen-Goldstein. Na puberdade, dependendo da estatura, este índice não pode ser calculado.

4.2.3 Associação com a porcentagem de gordura corporal

A Tabela 21 mostra que também não houve associação da presença do polimorfismo c.17C>A com a adiposidade corporal medida pela impedância bioelétrica.

Tabela 21 - Porcentagem de gordura corporal medida pela impedância bioelétrica na amostra de obesos.

Variáveis	Polimorfismo				p
	Ausente		Presente		
	n	%	n	%	
Gordura %					0,403
Entre p 85 e p 95	1	5,0	1	6,0	
Maior que p 95	20	95,0	16	94,0	

4.2.4 Comparação dos valores dos exames sanguíneos entre obesos com e sem variações genotípicas

Não houve associação entre os polimorfismos c.17C>A e c.241G>A e os níveis médios das dosagens séricas de glicose, insulina, colesterol, triglicerídeos, HDL e LDL. Também não houve associação com o HOMA-IR.

Na tabela 22 observa-se o valor da média da insulina basal e do HOMA-IR aumentados na presença do polimorfismo, provavelmente devido à presença no grupo, de um indivíduo do sexo masculino de doze anos, que apresentou valor da glicemia de 280 mg/dl e insulina basal 390 μ IU/ml com HOMA-IR calculado no valor de 269,4. Foi feita a retirada deste indivíduo do grupo, e o valor médio da insulina basal caiu para $10,97 \pm 8,56$, tendo ficado portanto, inferior ao valor do grupo sem o polimorfismo.

Tabela 22 - Distribuição das dosagens bioquímicas do grupo de obesos segundo a presença dos polimorfismos.

Variáveis	Polimorfismo								p
	Ausente				Presente				
	Média \pm dp	Máximo	Mínimo	Mediana	Média \pm dp	Máximo	Mínimo	Mediana	
Glicemia (mg/dl)	82,8 \pm 8,4	101,0	65,0	84,0	85,9 \pm 32,3	280,0	65,0	85,5	0,450
Insulina basal (μ IU/ml)	12,7 \pm 6,5	28,0	2,0	11,5	24,1 \pm 66,2	390,0	2,0	10,0	0,760
HOMA-IR	2,6 \pm 1,4	4,3	3,2	2,3	10,7 \pm 46,5	269,4	0,4	2,1	0,700
Colesterol total (mg/dl)	157,6 \pm 25,7	198,0	108,0	157,6	165,2 \pm 32,1	270,0	108,0	159,0	0,480
Triglicerídeos (mg/dl)	91,4 \pm 42,1	187,0	26,0	86,0	108,3 \pm 68,6	400,0	31,0	94,5	0,350
HDL (mg/dl)	39,8 \pm 7,4	54,0	27,0	41,0	39,3 \pm 9,2	69,0	24,0	39,0	0,480
LDL (mg/dl)	99,1 \pm 22,6	140,0	64,0	97,0	106,1 \pm 25,3	170,0	67,0	100,5	0,350

A tabela 23 mostra a distribuição da insulina de acordo com os genótipos normal, heterozigoto e homozigoto para o polimorfismo c.17C>A.

4.2.5 Insulina

Tabela 23 – Distribuição dos valores médios de insulina segundo os genótipos para o polimorfismo c.17C>A.

n = 56	Genótipo		
Genótipo	CC	CA	AA
Média de Insulina (μ IU/ml)	13,11	12,55	14,5

No presente estudo, este polimorfismo não mostrou associação com a obesidade e não houve diferença nas variáveis estudadas para a amostra de crianças obesas com ausência ou presença do polimorfismo.

5. Discussão

Foi investigada a presença de variações na região codificadora do gene do *MC3R* em um grupo brasileiro de crianças e adolescentes obesas e sua associação com a obesidade e níveis glicêmicos de glicose, insulina e lipídeos.

Foram encontrados dois polimorfismos previamente identificados do tipo *missense* c.17C>A e c.241G>A que correspondem às substituições dos aminoácidos p.Tre6Lis e p.Val81Ile cujas frequências alélicas não foram significativamente diferentes quando comparadas entre o grupo de crianças obesas (n=67) e o grupo controle (n=71) sem obesidade. Também não foi encontrada associação significativa entre o polimorfismo c.17C>A e a cor auto-referida da pele, escore z de peso, escore z de IMC, índice de obesidade de Newen-Goldstein, porcentagem de gordura corporal, nem com níveis glicêmicos, insulinêmicos e lipídêmicos.

5.1 Frequência alélica e efeitos da raça

Neste estudo, com um grupo de 67 crianças com obesidade de início precoce ($3,2 \pm 2,5$ anos) foram observados 22 indivíduos heterozigotos e 3 homozigotos para o polimorfismo c17C>A. A frequência alélica deste polimorfismo neste estudo foi 0,21 no grupo de obesos e 0,17 no grupo controle, sendo que outros estudos em populações européias a frequência do alelo polimórfico encontrada foi igual a 0,08 nos obesos e 0,10 nos controles (Hani, 2001) e 0,10 nos obesos (Rutanen, 2007). Já outros estudos com populações africanas e americano-africanas mostraram uma maior frequência alélica para o polimorfismo c.17C>A (0,575 e 0,350 respectivamente www.ensemble.org).

No Brasil, o censo do IBGE do ano de 2000 mostrou que com uma população de 169 milhões, 53,7% de brasileiros se auto identificaram como “Branços”, 39,1% como “Pardos”, 6,2% como “Negros” 0,5% como “Amarelos” e 0,4% como “Indígenas” (<http://ibge.com.br>, accessed on 10/Fev./2010). Existe portanto uma miscigenação racial no Brasil, com maior predominância de pardos e negros em relação às populações caucasianas. Assim, embora a amostra deste estudo seja de um tamanho modesto, a maior frequência encontrada para o alelo polimórfico c.17C>A poderia ser explicada pela maior miscigenação da população brasileira.

5.2 Obesidade

A amostra deste estudo foi menor do que a de outros estudos que também não encontraram associação com a obesidade (Li, 2000; Hani, 2001; Rutanen, 2007). Outros estudos com amostras maiores encontraram associação dos polimorfismos c.17C>A e c.241G>A com o IMC, escore z de IMC e porcentagem de gordura corporal (Feng, 2005; Lee, 2007). Neste estudo publicado por Feng em 2005, o autor incluiu 190 crianças com obesidade, e encontrou 29 delas com dupla homozigosidade para os dois polimorfismos e apenas os duplo-homozigotos não foram encontrados no grupo controle. Além de mostrar associação com a obesidade, ele mostrou que os indivíduos com o genótipo heterozigoto apresentaram um grau intermediário de obesidade. Ele relatou que a dificuldade em se encontrar relação entre essas variações e a obesidade em outros estudos pode estar relacionada a amostras pequenas e com pouco número de duplo homozigotos. No presente estudo, foi encontrado apenas 1 indivíduo com dupla homozigosidade para os polimorfismos c.17C>A e c.241G>A do gene do *MC3R* e portanto, não foi possível realizar a análise de associação dos duplo homozigotos com a obesidade.

Em um estudo de larga escala, onde foram encontrados 13 duplos homozigotos para os polimorfismos c.17C>A e c.241G>A entre 497 adultos gravemente obesos e 11 entre 538 controles a autora também não encontrou associação com a obesidade (Calton, 2009). Curiosamente, os dois estudos citados que encontraram associação com a obesidade eram em crianças com obesidade de início precoce: um com 355 (8,2% de duplo homozigotos) e o outro com 198 crianças (3,5% de duplo homozigotos) (Feng, 2005; Lee, 2007). Além disto, este autor mostrou pela primeira vez, a associação da co-ocorrência destes polimorfismos com a circunferência da cintura.

5.3 Circunferência da cintura

A circunferência da cintura é uma ferramenta simples e fácil de se utilizar para a verificação da obesidade abdominal, e é o principal componente da síndrome metabólica em adultos, por estar fortemente relacionada com os fatores de risco para Diabetes Mellitus tipo 2 e doença cardiovascular: obesidade, dislipidemia, hiperglicemia e hipertensão arterial (Freedman, 1999; Taylor, 2000; Maffei, 2001). Além disso, a medida da circunferência da cintura apresenta boa correlação com a gordura da região central quando comparada ao

DEXA (*Dual-Energy X-ray Absorptiometry*) em ambos os sexos (Taylor, 2000). Em crianças, a medida da circunferência da cintura varia com o sexo e a idade e portanto, é necessário que curvas de referência sejam construídas para as diferentes populações. As curvas que existem até hoje, são curvas de percentís construídas com dados transversais, e os critérios da síndrome metabólica definem obesidade quando a circunferência da cintura for maior ou igual ao percentil 90 para sexo e idade (Alberti, 2005). A circunferência da cintura é sempre maior em meninos do que em meninas, e essa diferença aumenta a partir dos 11,5 anos de idade (Moreno, 1999). Existe uma divergência em relação ao local de medida da circunferência da cintura entre os diferentes estudos que a utilizaram, entretanto, a padronização de um local de medida da circunferência da cintura é importante para que se possam comparar dados com outros estudos. Estudos brasileiros têm utilizado a curva Britânica como referência devido ao seu perfil metodológico adequado assim como pelo tamanho de sua amostra que é representativa da população de seu país. A segunda e mais importante razão de sua escolha é a similaridade na prevalência do estado nutricional da população Britânica com a Brasileira: 11% de sobrepeso e 18,5 % de obesidade *versus* 17,9% de sobrepeso e 6,7% de obesidade (Soar, 2004). A maioria dos estudos, inclusive os do Reino Unido, tem utilizado o ponto médio entre a borda superior da crista ilíaca e a borda inferior da última costela como local de medida da circunferência da cintura. Neste estudo, também foi utilizado este local de medida, porém foi feita a comparação com as curvas de percentís do CDC porque foi a mesma referência utilizada para os outros índices antropométricos. Os resultados do presente estudo mostraram que todas as crianças e adolescentes encontraram-se acima do percentil 90 para sexo e idade em relação à tabela de percentís de circunferência da cintura publicada pelo CDC 2005. O estudo de Feng, publicado em 2005, o único com população pediátrica que utilizou a circunferência da cintura, incluiu crianças de 5-18 anos e mostrou que elas apresentaram a média da circunferência da cintura igual a 91,3 cm. No presente estudo, foram incluídas 67 crianças e adolescentes obesos de 0,4 a 15 anos, 59,7% de meninos, e evidenciou a média da circunferência da cintura igual a 90,8 cm. Entretanto, estes dados não são comparáveis pelo fato de que a circunferência da cintura em crianças varia com a idade e sexo.

5.4 Impedância bioelétrica

Embora o índice de massa corporal seja simples de ser medido e tenha sido uma ferramenta valiosa na monitoração de tendências em obesidade, ele tem também algumas desvantagens (Prentice, 2001). Uma delas é que ele não distingue entre aumento de massa na

forma de gordura, massa magra ou osso, e pode inclusive levar a significantes erros de classificação. Desde que a doença associada à obesidade vem do excesso de tecido gorduroso, a ferramenta de monitoração ideal deveria verificar diretamente a obesidade. A impedância bioelétrica distingue tecidos ricos de pobres em gordura com base em suas características diferentes de condutância e reactância (Chumlea, 1994).

Neste estudo, foi realizada a impedância bioelétrica em 38 crianças (24 do sexo masculino e 14 do sexo feminino) e os valores foram transformados em percentís e comparados com a tabela de referência publicada por Mc Carthy et al., em 2006. Todos os pacientes menos um encontraram-se acima do percentil 95 em relação aos valores da tabela de percentís de gordura corporal de acordo com sexo e idade publicada por Mc Carthy et al., em 2006. Esses resultados mostram que a obesidade grave medida pelos índices antropométricos como peso, escore z de IMC e índice de obesidade de Newen-Goldstein ocorreu à custa de aumento da porcentagem de gordura corporal.

Dois outros estudos semelhantes em população pediátrica publicaram seus resultados da porcentagem de gordura corporal expressos em valores de média e desvio padrão. Esses valores não são comparáveis com os valores deste estudo porque a porcentagem de gordura corporal varia com o sexo e com a idade. Além, disto, a amostra pequena que teve a bioimpedância avaliada neste estudo não permitiu a separação por genótipos. Mesmo assim, este exame é de extrema relevância para se mostrar o aumento de tecido gorduroso e diminuição de tecido muscular evidenciado nos estudos em camundongos com deleção do gene do *MC3R* (Butler, 2000; Chen, 2000).

5.5 Efeitos cardiometabólicos

Pouco se sabe sobre a prevalência de obesidade e síndrome metabólica infantis devido ao limitado número de estudos, as várias definições utilizadas e os grupos de diferentes idades estudados, que fazem com que as comparações se tornem difíceis, e não exista um consenso sobre qual definição usar (Kelishadi, 2007). A prevalência de síndrome metabólica na população pediátrica pode variar de 6 a 39% dependendo da definição utilizada (Reinehr, 2007). Sendo assim, neste estudo optou-se por avaliar separadamente os fatores de risco como glicemia, insulinemia, e lipidemia dos indivíduos obesos com e sem o polimorfismo c.17C>A do gene do *MC3R*.

5.6 Insulina

Este estudo mostrou, pelo critério da I Diretriz de prevenção de aterosclerose na infância e na adolescência, a prevalência de insulina plasmática de jejum alta em 16,1% no grupo de crianças e adolescentes obesos. Sabe-se que a insulina varia com a idade, estadiamento puberal e sofre influência da obesidade. Por esta razão, foram testados os dados com outro critério que levava em conta a puberdade (Viner, 2005). O critério de Viner estabelece para os pré-púberes (< 10 anos) insulina < 16µl/mL, para os púberes (entre 10 e 13 anos) insulina < 30 µl/mL, e para os pós-púberes (> 13 anos), insulina < 20 µl/mL. Por este critério, 17,9% das crianças e adolescentes obesos apresentaram insulina plasmática de jejum alterada. Estudos de associação dos polimorfismos c.17C>A e c.241G>A com níveis plasmáticos de insulina são discordantes, alguns mostrando aumento da sua secreção (Hani, 2001; Feng, 2005) e outros não (Lee, 2000; Rutanen, 2007).

A tabela 24 mostra uma comparação entre as dosagens de insulina deste estudo com as de outro estudo que também encontrou aumento dos níveis plasmáticos de insulina.

Tabela 24 – Comparação da distribuição dos valores médios de insulina segundo os genótipos para o polimorfismo c.17C>A entre dois estudos.

n = 56		Genótipo		
	Genótipo	CC	CA	AA
Presente estudo	Média de Insulina (µIU/ml)	13,11(n=34)	12,55 (n=20)	14,5 (n=2)
Feng, 2005	Média de Insulina (µIU/ml)	13,3 (n=202)	16,0 (n=124)	24,7 (n=29)

Estudos de associação entre os polimorfismos c.17C>A e c.241G>A e insulina plasmática de jejum relatam que existe um *quantitative trait locus* (QTL) próximo à região do locus do *MC3R*, e que os portadores duplo homozigotos desses polimorfismos possuem glicemia e insulina plasmática de jejum discretamente mais alta e níveis de insulina com o teste de tolerância à glicose oral no jejum e aos 30 minutos significativamente mais altos comparados com os não portadores. O autor relata que isto sugere a existência de diferença entre os portadores e não portadores em relação à função de secreção da insulina. (Hani, 2001; Feng, 2005).

Também em camundongos existe divergência, com relatos de camundongos com níveis séricos de insulina de jejum que não são significativamente diferentes entre camundongos com genótipo normal e homozigotos para a deleção do *mc3r* (Butler, 2000) e camundongos machos apresentando aos 6 meses, níveis significativamente maiores de insulina plasmática (Chen, 2000).

A insulina é uma molécula de sinalização importante no sistema nervoso central (SNC), e ela forma uma rede complexa com o sistema melanocortina (Schwartz, 1992). A insulina aumenta a atividade do sistema melanocortina no SNC que parece inibir o apetite em ratos (Benoit, 2002). Portanto, é possível que o sistema melanocortina tenha uma alça de feedback negativo para inibir a secreção de insulina e que a disfunção do MC3R poderia aumentar os níveis de insulina.

A resistência à insulina, condição na qual ocorre o aumento da insulina plasmática de jejum pode ser definida como uma resposta diminuída às ações biológicas da insulina. A obesidade, principalmente a obesidade abdominal e a resistência insulínica estão diretamente relacionadas clinicamente e epidemiologicamente com o desenvolvimento da síndrome metabólica e dos fatores de risco cardiovascular em crianças. Um estudo longitudinal construído com dois censos transversais mostrou que níveis persistentemente altos de insulina de jejum com início na infância e persistentes após oito anos levou a um perfil cardiometabólico indesejável e clinicamente relevante na idade de adulto jovem (Bao, 1996).

No desenvolvimento normal da puberdade, pode ocorrer um estado transitório de resistência insulínica. Estudos com clamp euglicêmico de insulina mostraram que a resistência insulínica aumenta durante o início da puberdade, faz um pico no meio da puberdade, e retorna aos níveis próximos dos pré-púberes no final da puberdade (Moran, 1999). O aumento do hormônio de crescimento, hormônios sexuais, e níveis de fator de crescimento insulina-like-I (IGF-I) que ocorrem durante a puberdade podem ser a causa dessa forma de resistência insulínica (Moran, 2002).

Em adultos, a resistência à insulina tem sido associada à obesidade, intolerância à glicose ou diabetes, hipertensão, dislipidemia e doença cardiovascular. Embora a relação entre essas condições seja complexa, a resistência à insulina pode ser o fator iniciante (Reaven, 1998). Vários mecanismos poderiam explicar como a obesidade, especialmente a adiposidade visceral leva à resistência insulínica e contribui para a doença cardiovascular. Por exemplo, ácidos graxos livres liberados dos depósitos de gordura, especialmente gordura visceral, podem bloquear as vias de sinalização da insulina, interrompendo sua ação e secreção (Zierath, 1998). Além do mais, quantidades aumentadas de ácidos graxos livres na circulação portal podem prejudicar a ação e o metabolismo da insulina e aumentar a gliconeogênese no fígado (Ferrannini, 1986). Além disso, adipocinas como TNF- α , adiponectina, resistina e leptina, sintetizadas e secretadas pelos adipócitos têm sido associadas à resistência insulínica associada à obesidade (Mohamed-Ali, 1998; Shuldiner, 2001; Yamauchi, 2001).

Portanto, apesar de a hiperinsulinemia encontrada nos indivíduos deste estudo não ser bem explicada pela presença dos polimorfismos encontrados pelas divergências entre os estudos em camundongos e também em humanos, ela poderia ser explicada pelos mecanismos envolvidos na patogênese da resistência insulínica na presença da obesidade.

5.7 Lipídeos

A análise do perfil lipídico mostrou alteração do colesterol total, dos triglicerídeos, do HDL-C e do LDL-C em 37,3%, 20,9%, 77,6% e 23,9% das crianças e adolescentes do grupo de obesos respectivamente, e quando comparados com a presença ou ausência do polimorfismo, não houve diferença significativa. Um único estudo semelhante em população pediátrica também não encontrou diferença no perfil lipídico de pacientes portadores do polimorfismo c.17C>A mesmo quando separado por genótipos (Feng, 2005).

É descrito que ratos alimentados com uma dieta rica em gordura aumentam a oxidação lipídica corporal total no músculo esquelético por meio da capacidade mitocondrial aumentada de usar lipídeos como combustível metabólico (Iossa, 2002). Camundongos obesos cujo gene do *mc3r* foi deletado apresentam redução da taxa de oxidação de lipídeos, e os potenciais mecanismos que explicam isso incluem a ação do MC3R sobre a regulação simpática da oxidação dos ácidos graxos em tecidos periféricos como o fígado e o músculo (Butler, 2000; Chen, 2000).

A maior capacidade oxidativa de lipídeos do organismo se concentra no fígado e nos músculos, e o melhor índice de avaliação dessa atividade metabólica é a aferição do consumo de oxigênio total (Iossa, 2002). Em humanos, isso já foi demonstrado no estudo de Rutanen e colaboradores, em um grupo de 216 adultos, onde foram identificados 33 heterozigotos e 5 homozigotos para os polimorfismos c.17C>A e c.241G>A. Foi demonstrado que houve associação entre os polimorfismos e glicose, lipídeos e metabolismo energético através do clamp euglicêmico e hiperinsulinêmico e calorimetria indireta. Os resultados mostraram que os portadores dos alelos c.17C>A e c.241G>A tiveram taxas de oxidação de lipídeos significativamente inferiores e maiores taxas de oxidação da glicose em jejum do que indivíduos com os genótipos Lis/Lis6 e Ile/Ile81.

A insulina, além de ser responsável pela diminuição da produção hepática e pela captação periférica da glicose, ela age também no metabolismo lipídico. A resistência insulínica no fígado e no tecido adiposo leva à exportação de ácidos graxos para a circulação

que leva à síntese “de novo” dos triacilglicerídeos e dislipidemia comumente associada à obesidade (Kim, 2003). Isto poderia explicar a dislipidemia apresentada pelos indivíduos obesos deste estudo.

Todos os indivíduos deste estudo apresentaram obesidade grave de início precoce, e não se pode descartar que mesmo que 38,8% da amostra sejam portadores dos polimorfismos c.17C>A e c.241G>A, a principal causa da falha do sistema é uma imensa “mutação ambiental” do estilo de vida contemporâneo. Aumentar a ingestão alimentar sem compensar com atividade física pode induzir a um *feed-back* confundidor para o cérebro.

5.8 Análise molecular – estudos funcionais

Em uma amostra relativamente modesta de crianças obesas, foram encontrados três polimorfismos já descritos.

Quanto às suas propriedades, o polimorfismo c.17C>A troca uma treonina do grupo polar sem carga por uma lisina com carga positiva. O polimorfismo c.241G> troca uma valina por uma isoleucina, ambos pertencentes ao mesmo grupo não polar alifático, e têm cadeias laterais que diferem por apenas um grupo metil e portanto, parece improvável que ele apresente conseqüências funcionais. O polimorfismo c.769C>A no códon 257 troca uma arginina com carga positiva por uma serina do grupo polar sem carga.

Estudos semelhantes de associação dos polimorfismos c.17C>A e c.241G>A com a obesidade são divergentes, alguns mostrando associação e outros não. Os estudos de ligação *in vitro*, mostraram que estes polimorfismos c.17C>A e c.241G>A quando associados tiveram diminuição de 60% da capacidade de ligação com o análogo do agonista, diminuição da produção de AMPc, e diminuição da produção da proteína do receptor (Feng, 2005). A terceira variante comum encontrada, 1:c.769C>A não foi estudada nos controles, porém em um outro estudo (Calton, 2009), não houve associação com obesidade (p 0,070); e no estudo funcional ele apresentou prejuízo da função. A autora também não o incluiu nas análises.

Alguns polimorfismos na região promotora do gene do *MC3R* já foram estudados em uma população adulta da Finlândia, sendo que dois deles apresentaram associação com menores taxas de oxidação de glicose e lípidos. Um deles, o c.-401G>A (rs6014649), foi encontrado em desequilíbrio de ligação ($r^2 > 0,8$) com os polimorfismos c.17C>A e c.241G>A (Rutanen, 2007). Outro polimorfismo na região promotora, o -239 poderia afetar o

GATA *box*, entretanto, ele localiza-se muito distante para ser um local de ligação do fator de transcrição funcional, e o autor refere que estudos funcionais são necessários para avaliar o seu significado. Ele também é relativamente raro e estudos com maiores amostras seriam necessários para se avaliar sua ligação com a obesidade (Li, 2000).

Seis variantes raras já foram descritas no gene do *MC3R*: p.Ala70Tre, p.Met134Ile, p.Ile183Asn, p.Ala293Tre, p.Ile335Ser e p.X361Ser. Todas elas com redução da sinalização, com exceção das duas últimas que não tiveram perda de função.

A variante p.Ile335Ser foi destituída de ligação e sinalização devido à retenção intracelular que é o defeito mais comum de mutações espontâneas em GPCRs que causam doenças humanas, e a retenção celular é o defeito mais comum em mutações espontâneas do *MC4R* associadas à obesidade (Tao, 2007).

As variantes p.Ala 293Tre e p.X361 não causaram maiores defeitos na expressão da superfície celular, sítio de ligação e sinalização. A variante p.X361S aboliu o códon de finalização e permitiu a adição de sete aminoácidos extra no terminal C intracelular do receptor.

Na variante p.Ile183Asn a isoleucina está localizada na segunda alça intracitoplasmática, e é um resíduo altamente conservado, presente no *MC3R* de outras espécies, do *teleost fish* aos mamíferos. A asparagina é hidrofílica bem como a isoleucina, e esta mutação pode causar redução da função com interação anormal da proteína G. O autor relatou diminuição parcial da produção de AMPc, com expressão normal na superfície celular e afinidade de ligação do ligante normal (Lee, 2007).

A variante p.Ala70Tre afeta o domínio extracelular dentro de uma região crítica para a atividade de ligação. Em outras espécies, a alanina hidrofóbica é substituída por outro resíduo, a glicina hidrofóbica, então é possível que a substituição pela treonina que é hidrofílica resulte em uma significativa mudança na conformação do receptor (Lee, 2007).

A mutação p.Met134Ile: está localizada no segundo domínio transmembrana, e a metionina é conservada no frango, camundongo e no rato.

Todas essas variantes raras com exceção da p.Arg257Ser foram associadas à obesidade.

Estudos de mutagênese mostraram que a alteração de alguns aminoácidos é importante para a ligação e ativação do receptor. Na figura 7, os polimorfismos e as mutações descritos na literatura que levaram à substituição de aminoácidos no receptor 3 da melanocortina mais os aminoácidos relatados como importantes para a ligação e ativação do receptor (Wang, Fan, Tao, 2008) estão plotados na estrutura bidimensional do *MC3R*. O que se pode observar é que em relação ao estudo de Wang, Fan e Tao (2008), nenhuma mutação e/ou polimorfismo,

inclusive do presente estudo, ocorreu em aminoácidos citados por esses autores como importante para a ligação/ativação do receptor 3 da melanocortina.

A mutação Ile335Ser (nº 5 na figura 7) foi a que teve maior prejuízo funcional, levando à diminuição de ligação e sinalização por retenção intracelular e a autora (Mencarelli et al., 2008) relata que a portadora era uma mulher de 56 anos com IMC de 39 kg/m² que tinha hipotireoidismo e tireoidite auto-imune tratada com sucesso com terapia de substituição. Seu ganho de peso precedeu ao desenvolvimento do hipotireoidismo e não foi afetado pela terapia de substituição.

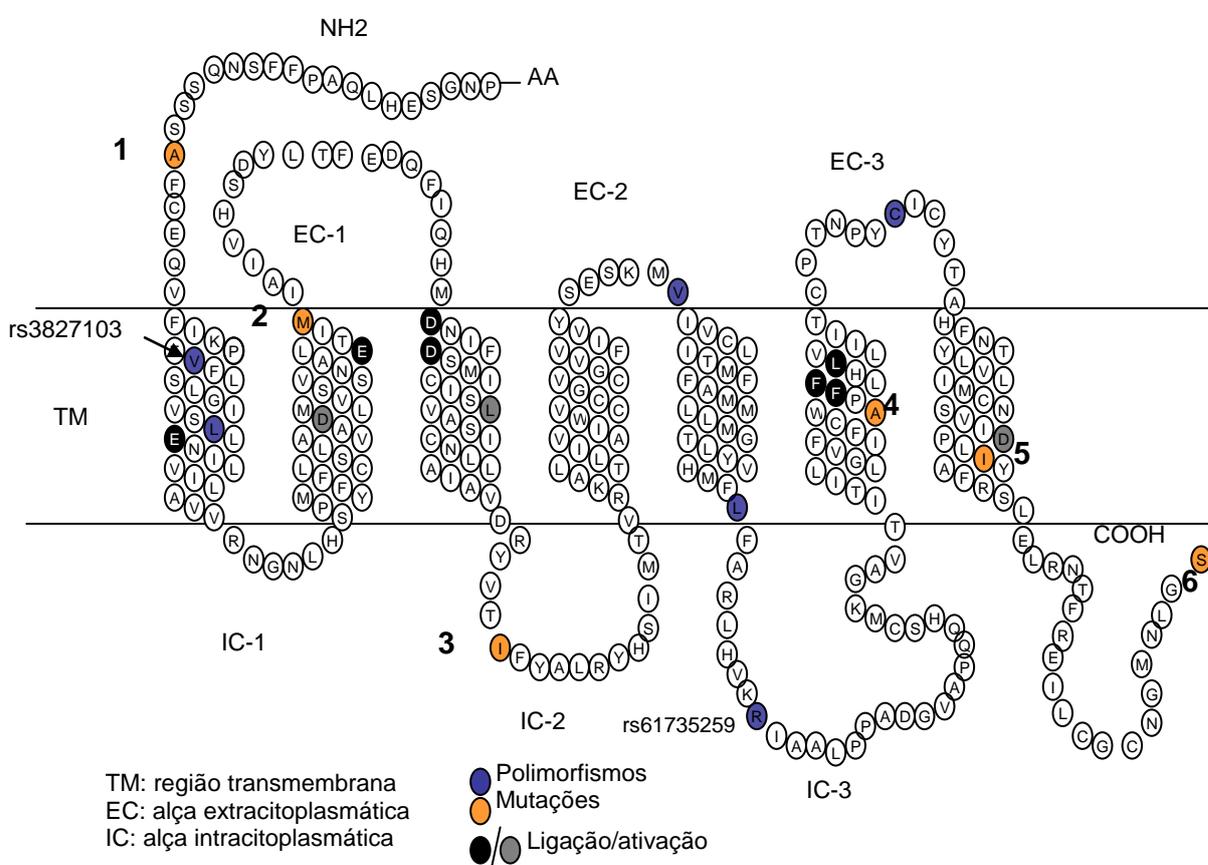


Figura 7 – Localização das mutações e polimorfismos descritos no gene do *MC3R* em relação ao estudo dos aminoácidos importantes para a ligação/ativação do receptor. Os números em negrito correspondem às seguintes mutações descritas na literatura:

1. **Ala70Tre** Diminuiu a produção de AMPc, porém, não alterou a ligação com o agonista.
2. **Met134Ile** Não afetou a ligação com o agonista.
3. **Ile183Asn** Diminuiu a produção de AMPc, não afetou a expressão na superfície e ligação ao agonista, porém, obteve severo prejuízo na sinalização, com interação anormal da proteína G.
4. **Ala293Tre** Não causou maiores defeitos na expressão da superfície celular, ligação e sinalização.
5. **Ile335Ser** Resultou em total destituição da ligação e sinalização devido à retenção intracelular.
6. **X361Ser** Não causou maiores defeitos na expressão da superfície celular, ligação e sinalização.

Duas mutações no gene do *MC3R* Ile183Asn e Ile335Ser causaram defeitos importantes na sinalização do receptor. Os estudos aqui relatados que não encontraram mutações no gene do *MC3R* associadas à obesidade foram na maioria feitos em caucasianos.

Em estudos em camundongos com deleção do *MC3R* a ativação do receptor pelo α e γ -msh leva por meio de mecanismos ainda não completamente elucidados, a um maior depósito de gordura corporal (Chen, 2000; Butler, 2000). Foi demonstrado por Feng (2005), que a ocorrência dos polimorfismos, c.17C>A e c.241G>A, causa a inativação parcial do receptor e está associada com obesidade em americanos africanos, sugerindo interação genótipo e raça.

O presente estudo fornece evidências de que, em uma população bastante miscigenada, composta por 36% de mulatos e 6% de negros, não há associação dos polimorfismos c.17C>A e c.241G>A com a obesidade grave de início precoce.

6. Conclusão

O presente estudo não confirma a associação dos polimorfismos c.17C>A e c.241G>A com a obesidade nesta amostra de 67 crianças com obesidade de início precoce, porém, isto não exclui o envolvimento do gene do *MC3R* na patogênese da obesidade. Não se pode excluir outras formas de obesidade monogênica, e isso talvez fosse um ponto interessante de pesquisa.

Embora a obesidade ambiental não tenha sido objeto deste estudo, dada a frequência rara da obesidade genética, é evidente que neste grupo o excesso de ingestão e a falta de exercícios físicos devem estar contribuindo enormemente para a condição patológica destas crianças que precocemente apresentam fatores importantes de risco cardiovascular.

7. Referências

ABRANTES, M. M.; LAMOUNIER, J. A.; COLOSIMO, E. A. Overweight and obesity prevalence among children and adolescents from Northeast and Southeast regions of Brazil. **J Pediatr.**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 4, p. 335-340, 2002.

ALBERTI, K. G.; ZIMMET, P. Z. AND SHAW, J. IDF EPIDEMIOLOGY TASK FORCE CONSENSUS GROUP. The metabolic syndrome: a new worldwide definition. **Lancet**, London, v. 366, p. 1059 – 1062, 2005.

ATABEK, M. E. & PIRGON, O. Assessment of insulin sensitivity from measurements in fasting state and during na oral glucose tolerance test in obese children. **J. Pediatr. Endocrinol. Metab.** London, v. 20, p. 187 – 195, 2007.

BAO, W.; SRINIVASAN, S. R.; BERENSON, G. S. Persistent elevation of plasma insulin levels is associated with increased cardiovascular risk in children and young adults: the Bogalusa Heart Study. **Circulation**, Dallas, v. 93, p. 54–59, 1996.

BENOIT, S. C.; AIR, E. L.; COOLEN, L. M.; STRAUSS, R.; JACKMAN, A.; CLEGG, D. J. SEELEY, R. J.; AND WOODS, S. C. The Catabolic Action of Insulin in the Brain Is Mediated by Melanocortins. **J. Neurosci.**, Baltimore, v. 22, n. 20, p. 9048 – 9052, 2002.

BILLINGTON, C. J.; BRIGGS, J. E.; GRACE, M. and LEVINE, A. S. Effects of intracerebroventricular injection of neuropeptide Y on energy metabolism. **Am. J. Physiol.** Bethesda, v. 260, p. R321-R327, 1991.

BORON, W.F. and BOULPAEP, E.L. **Medical Physiology – A Cellular and Molecular Approach**. Philadelphia: Saunders-Elsevier, 2009. Capítulo 3, p.48-74.

BRANSON, R.; POTOZNA, N.; KRAL, J. G.; LENTES, K. U.; HOECHE, M. R.; HORBER, F. F. Binge eating as a major phenotype of melanocortin-4 receptor gene mutations. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 348, p. 1096-1103, 2003.

BUTLER, A. A.; KESTERSON, R. A.; KHONG, K., CULLEN, M. J.; PELLEYMOUNTER, M. A.; DEKONING, J.; BAETSCHER, M.; CONE, R. D. A unique metabolic syndrome causes obesity in the melanocortin-3 receptor-deficient mouse. **Endocrinology**, Chevy Chase, v. 141, p. 3518-3521, 2000.

CAI, M.; STANKOVA, M.; POND, S. J. K.; MAYOROV, A. V.; PERRY, J. W.; YAMAMURA, H. I.; TRIVEDI, D.; HRUBY, V. J. Real time differentiation of G-protein coupled receptor (GPCR) agonist and antagonist by two photon fluorescence laser microscopy. **J. Am. Chem. Soc.**, Washington DC, v. 26, p. 7160-7161, 2004.

CALTON, M. A.; ERSOY, B. E.; ZHANG, S.; KANE, J. P.; MALLOY, M. J.; PULLINGER, C. R.; BROMBERG, Y.; PENNACCHIO, L. A.; DENT, R.; MCPHERSON, R.; AHITUV, N. AND VAISSE, C. Association of functionally significant Melanocortin-4 but not

melanocortin-3 receptor mutations with severe adult obesity in a large North American case-control study. **Hum. Mol. Genet.**, Oxford, v. 18, n. 6, p. 1140 – 1147.

CHALLIS, B. G.; PRITCHARD, L. E.; CREEMERS, J. W.; DELPLANQUE, J.; KEOGH, J. M.; LUAN, J.; WAREHAM, N. J.; YEO, G. S.; BHATTACHARYYA, S.; FROGUEL, P.; WHITE, A.; FAROOQI, I. S.; O'RAHILLY, S. A missense mutation disrupting a dibasic prohormone processing site in pro-opiomelanocortin (POMC) increases susceptibility to early-onset obesity through a novel molecular mechanism. **Hum. Mol. Genet.**, Oxford, v. 11, p. 1997-2004, 2002.

CHEN, A. S.; MARSH, D. J.; TRUMBAUER, M. E.; FRAZIER, E. G.; GUAN, X. M.; YU, H.; ROSENBLUM, C. I.; VONGS, A.; FENG, Y.; CAO, L.; METZGER, J. M.; STRACK, A. M.; CAMACHO, R. E.; MELLIN, T. N.; NUNES, C. N.; MIN, W.; FISHER, J.; GOPAL-TRUTER, S.; MACINTYRE, D. E.; CHEN, Y. & VAN DER PLOEG, L. H. T. Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass. **Nat. Genet.**, New York, v. 26, p. 97-102, 2000.

CLEMENT, K.; VAISSE, C.; LAHLOU, N.; CABROL, S.; PELLOUX, V.; CASSUTO, D.; GOURMELEN, M.; DINA, C.; CHAMBAZ, J.; LACORTE, J-M.; BASDEVANT, A.; BOUGNÈRES, P.; LEBOUÇ, Y.; FROGUEL, P.; GUY-GRAND, B. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. **Nature**, London, v. 392, p. 398-401, 1998.

COLE, T. J.; FREEMAN, J. V. AND PREECE, M. A. Body mass index reference curves for the UK, 1990. **Arch. Dis. Child**, London, v. 73, p. 25 – 29, 1995.

COLE, T.J.; FAITH, M.S.; PIETROBELLI, A. AND HEO, M. What is the best measure of adiposity change in growing children: BMI, BMI %, BMI z-score or BMI centile? **Eur. J. Clin. Nutr.**, London, v. 59, p. 419-425, 2005.

COLUCCI, A.C.; PHILIPPI, S.T.; SLATER, B.; Desenvolvimento de um questionário de frequência alimentar para avaliação do consumo alimentar de crianças de 2 a 5 anos de idade. **Rev. Bras. Epidemiol.**, São Paulo, v. 7, n. 4, 393-401, 2004.

DONOHOU, P. A.; TAO, Y. X.; COLLINS, M.; YEO, G. S. H.; O'RAHILLY, S.; SEGALOFF, D. L. Deletion of codons 88–92 of the melanocortin-4 receptor gene: a novel deleterious mutation in an obese female. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Chevy Chase, v. 88, p. 5841-5845, 2003.

DAMIANI, D.; ABREU, M.R.N. Obesidade. In: Setian N. **Endocrinologia pediátrica: aspectos físicos e metabólicos do recém-nascido ao adolescente**. Sarvier, São Paulo, p. 463 – 473, 1989.

DE ONIS, M.; ONYANGO, A. W.; BORGHI, E.; SIYAM, A. AND NISHIDA, C. & SIEKMANN, J. Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. **Bull. World Health Organ.**, Geneva v. 85, p. 660 – 667, 2007.

DUBERN, B.; CLEMENT, K.; PELLOUX, V.; FROGUEL, P.; GIRARDET, J. P.; GUY-GRAND, B.; TOUNIAN, P. Mutational analysis of melanocortin-4 receptor, agouti-related protein, and α -melanocyte-stimulating hormone genes in severely obese children. **J. Pediatr.**, St. Louis, v. 139, p. 204-209, 2001.

FAROOQI, I. S.; O'RAHILLY, S. Recent advances in the genetics of severe childhood obesity. **Arch. Dis. Child.**, London, v. 83, p. 31-34, 2000.

FAROOQI, I. S.; O'RAHILLY, S. Genetics of obesity in humans. **Endocr. Rev.**, Baltimore, v. 26, n. 7, p. 710-718, 2006.

FAROOQI, I. S.; MATERESSE, G.; LORD, G. M.; KEOGH, J. M.; LAWRENCE, E.; AGWU, C.; SANNA, V.; JEBB, S. A.; PERNA, F.; FONTANA, S.; LECHLER, R. I.; DEPAOLI, A. M.; O' RAHILLY, S. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. **J. Clin. Invest.**, Ann Arbor, v. 110, p. 1093-1103, 2002.

FAROOQI, I. S.; YEO, G. S.; KEOGH, J. M.; AMINIAN, S.; JEBB, S. A.; BUTTLER, G.; CHEETHAM, T.; O'RAHILLY, S. Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with melanocortin 4 receptor deficiency. **J. Clin. Invest.**, Ann Arbor, v. 106, p. 271-279, 2000.

FAROOQI, I. S.; KEOGH, J. M.; YEO, G. S.; LANK, E. J.; CHEETHAM, T.; O'RAHILLY, S. Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 348, p. 1085-1095, 2003.

FENG, N.; YOUNG, S. F.; AGUILLERA, G.; PURICELLI, E.; ADLER-WAILES, D. C.; SEBRING, N. G.; YANOVSKI, J. A. Co-occurrence of two partially inactivating polymorphisms of MC3R is associated with pediatric-onset obesity. **Diabetes**, Alexandria, v. 54, p. 2663-2667, 2005.

FERRANNINI, E.; BARRETT, E. J.; BEVILACQUA, S. AND DEFRONZO, R. A. Effect of fatty acids on glucose production and utilization in man. **J. Clin. Invest.**, Ann Arbor, v. 72, p. 1737–1747, 1983.

FREEDMAN, D. S.; SERDULA, M. K.; SRINIVASAN, S. R. AND BERENSON, G. S. Relation of circumferences and skinfold thicknesses to lipid and insulin concentrations in children and adolescents: the Bogalusa Heart Study. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.69, p. 308 – 317, 1999.

GANTZ, I.; KONDA, Y.; TASHIRO, T.; SHIMOTO, Y.; MIWA, H.; MUNZERT, G.; WATSON, S. J.; DEL VALLE, J.; YAMADA, T. Molecular cloning of a novel melanocortin receptor. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 268, n. 11, p. 8246-8250, 1993a.

GANTZ, I.; MIWALL, H.; KONDAL, Y.; SHIMOTOG, Y.; TASHIROLL, T.; WATSON, S. J.; DEL VALLE, J.; YAMADA, T. Molecular cloning, expression, and gene localization of a fourth melanocortin receptor. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 268, p. 15174-15179, 1993b.

GETTING, S. J.; GIBBS, L.; CLARK, A. J. L.; FLOWER, R. J.; PERRETTI, M. POMC gene derived peptides activate melanocortin type 3 receptor on murine macrophages suppress cytokine release and inhibit neutrophil migration in acute experimental inflammation. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 162, p. 7446-7453, 1999.

GETTING, S. J.; Allcock, G. H.; FLOWER, R. J.; PERRETTI, M. Natural and synthetic agonists of the melanocortin receptor type 3 possess anti-inflammatory properties. **J. Leukoc. Biol.**, New York, v. 69, p. 98-104, 2001.

GETTING, S. J.; CHRISTIAN, H. C.; FLOWER, R. J.; PERRETTI, M. Activation of melanocortin type 3 receptor as a molecular mechanism for adrenocorticotrophic hormone efficacy in gouty arthritis. **Arthritis Rheum.**, New York, v. 46, p. 2765-2775, 2002.

GETTING, S. J.; CHRISTIAN, H. C.; LAM, C. W.; GAVINS, F. N.; FLOWER, J. B.; SCHIÖTH, H. B.; PERRETTI, M. Redundancy of a functional melanocortin I receptor in the anti-inflammatory actions of melanocortin peptides, studies in the recessive yellow (c/c) mouse suggest an important role for melanocortin 3 receptor. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 170, n. 6, p. 3323-3330, 2003.

GETTING, S. J.; DI FILIPPO, C.; CHRISTIAN, H. C.; LAM, C. W.; ROSSI, F.; D'AMICO, M.; PERRETTI, M. MC-3 receptor and the inflammatory mechanisms activated in acute myocardial infarcto. **J. Leukocyte Biol.**, New York, v. 76, p. 845-53, 2004.

GIBSON, W. T.; FAROOQI, I. S.; MOREAU, M.; DEPAOLI, A. M.; LAWRENCE, E.; O'RHAILLY, S.; TRUSSELL, R. A. Congenital leptin deficiency due to homozygoziy for the $\Delta 133G$ mutation: report of an other case and evaluation of response to four years of leptin therapy. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 89, n. 10, p. 4821-4826, 2004. Disponível em: <<http://jcem.endojournals.org/cgi/content/full/89/10/4821>>. Acesso em: 19 de junho de 2008.

GOTODA, T.; SCOTT, J.; AITMAN, T. J. Molecular screening of the human melanocortin 4-receptor gene: identification of a missense variant showing no association with obesity, plasma glucose or insulin. **Diabetologia**, Berlin, v. 40, p. 976-979, 1997.

GU, W.; TU, Z.; KLEYN, P. W.; KISSEBACH, A.; DUPRAT, L.; LEE, J.; CHIN, W.; MARUTI, S.; DENG, N.; FISHER, S. L.; FRANCO, L. S.; BURN, P.; YAGALOFF, K. A.; NATHAN, J.; HEYMSFIELD, S.; ALBU, J.; PI-SUNYER, F. X.; ALLISON, D. B.

Identification and functional analysis of novel human melanocortin-4 receptor variants. **Diabetes**, Alexandria, v. 48, p. 635-639, 1999.

GUARINI, S.; SCHIÖTH, H. B.; MIONI, C.; CAINAZZO, M.; FERRAZZA, G.; GIULIANI, D.; WIKBERG, J. E.; BERTOLINI, A.; BAZZANI, C. MC(3) receptors are involved in the protective effect of melanocortins in myocardial ischemia/reperfusion-induced arrhythmias. *Naunyn Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.*, Berlin, v. 366, p. 177-182, 2002.

HANI, E. H.; DUPONT, S.; DURAND, E.; DINA, C.; GALLINA, S.; GANTZ, I.; FROGUEL, P. Naturally occurring mutations in the melanocortin receptor 3 gene are not associated with type 2 diabetes mellitus in French Caucasians. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Chevy Chase, v. 86, p. 2895-2898, 2001.

HEYWARD V. H.; STOLARCZYK L. M. Avaliação da composição corporal aplicada. São Paulo: **Manole**. Barueri, SP, 2000.

HINNEY, A.; SCHMIDT, A.; NOTTEBON, K.; HEIBULT, O.; BECKER, I.; ZIEGLER, A.; GERBER, G.; SINA, M.; GÖRG, T.; MAYER, H.; SIEGFRIED, W.; FICHTER, M.; REMSCHMIDT, H.; HEBEBRAND, J. Several mutations in the melanocortin-4 receptor gene including a nonsense and a frameshift mutation associated with dominantly inherited obesity in humans **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Chevy Chase, v. 84, p. 1483-1486, 1999.

HINNEY, A.; HOHMANN, S.; GELLER, F.; VOGEL, C.; HESS, C.; WERMTER, A. K.; BROKAMP, B.; GOLDSCHMIDT, H.; SIEGFRIED, W.; REMSCHMIDT, H.; SCHAFER, H.; GUDERMANN, T.; HEBEBRAND, J. Melanocortin-4 receptor gene: case-control study and transmission disequilibrium test confirm that functionally relevant mutations are compatible with a major gene effect for extreme obesity. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Chevy Chase, v. 88, p. 4259-4267, 2003.

HO, G.; MACKENZIE, R. G. Functional characterization of mutations in melanocortin-4 receptor associated with human obesity. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 274, p. 35816-35822, 1999.

HOUTKOOOPER, L. B.; GOING, S. B.; LOHMAN, T. G.; ROCHE, A. F.; VAN LOAN, M. Bioelectrical impedance estimation of fat-free body mass in children and youth: a cross-validation study. **J. Appl. Physiol.**, Washington, 72(1):366-73, 1992.

HRUBY, V. J.; CAI, M.; CAIN, J. P.; MAYOROV, A.V.; DEDEK, M. M.; TRIVEDI, D. Design, synthesis and biological evaluation of ligands selective for the melanocortin-3 receptor. **Curr. Top. Med. Chem.**, Hilversum, v. 7, n. 11, p. 1107-1119, 2007.

IOSSA, S.; MOLLICA, M. P.; LIONETTI, L.; CRESCENZO, R.; BOTTA, M. ANDLIVERINI, G. Skeletal muscle oxidative capacity in rats fed high-fat diet. **Int. J. Obes.**, London, v. 26, p. 65 – 72, 2002.

JACOBSEN, P.; UKKOLA, O.; RANKINEN, T.; SNYDER, E. E.; LEON, A. S.; RAO, D. C.; SKINNER, J. S.; WILMORE, J. H.; LÖNN, L.; COWAN, JR, G. S.; SJÖSTRÖM, L.; BOUCHARD, C. Melanocortin 4 receptor sequence variations are seldom a cause of human obesity: the Swedish Obese Subjects, the Heritage Family Study, and a Memphis cohort. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Chevy Chase, v. 87, p. 4442-4446, 2002.

KELISHADI, R. Childhood Overweight, Obesity, and the Metabolic Syndrome in Developing Countries. **Epidemiol. Rev.**, Baltimore, v. 29, p. 62 – 76, 2007

KIM, S. P.; ELLMERER, M.; VAN CITTERS, G. W.; AND BERGMAN, R. N. Primacy of hepatic insulin resistance in the development of the metabolic syndrome induced by an isocaloric moderate-fat diet in the dog. **Diabetes**. New York, v. 52, p. 2453–2460, 2003.

KIM, C. S.; LEE, S. H.; KIM, R. Y.; KIM, B. J.; LI, S. Z.; LEE, I. H.; LEE, E. J.; LIM, S-K.; BAE, Y-S.; LEE, W.; BAIK, J-H. Identification of domains directing specificity of coupling to G-proteins for the melanocortin MC3 and MC4 receptors. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 277, n. 35, p. 31310-31317, 2002.

KLISH, W. J. Childhood obesity. **Pediatr Rev**, Evanston, III, v. 19, p. 312 – 315, 1998.

KOBAYASHI, H.; OGAWA, Y.; SHINTANI, M.; EBIHARA, K.; SHIMODAHIRA, M.; IWAKURA, T.; HINU, M.; ISHIHARA, T.; IKEKUBO, K.; KURAHACHI, H.; NAKAO, K. A novel homozygous missense mutation of melanocortin-4 receptor (MC4R) in a Japanese woman with severe obesity. **Diabetes**, Alexandria, v. 51, p. 243-246, 2002.

KRUDE, H.; BIEBERMANN, H.; LUCK, W.; HORN, R.; BRABANT, G.; GRÜTERS, A. Severe early onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. **Nat. Genet.**, New York, v. 19, p. 155-157, 1998.

KUCZMARSKI, R. J.; OGDEN, C. L.; GRUMMER-STRAWN, L. M.; FLEGAL, K. M.; GUO, S. S.; WEI, R.; MEI, Z.; CURTIN, L. R.; ROCHE, A. F.; JOHNSON, C. L. CDC growth charts: United States. **Adv. Data.**, Rockville, n. 314, p. 1-27, 2000.

LARSEN, L. H.; ECHWALD, S. M.; SORENSEN, T. I. A.; ANDERSEN, T.; WULLF, B. S.; PEDERSEN, O. Prevalence of mutations and functional analyses of melanocortin 4 receptor variants identified among 750 men with juvenile-onset obesity. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Chevy Chase, v. 90, p. 219-224, 2005.

LEE, Y. S.; POH, L. K. S.; KEK, B. L. K.; LOKE, K. Y. Novel melanocortin 4 receptor gene mutations in severely obese children. **Clin. Endocrinol.** (Oxf) ., Oxford, v. 68, n. 4, p. 529-535, 2008.

LEE, Y. S.; POH, L. K. S.; KEK, B. L. K.; LOKE, K. Y. The role of melanocortin 3 receptor gene in childhood obesity. **Diabetes.**, Alexandria, v. 56, p. 2622-2630, 2007.

LEE, Y. S.; POH, L. K. S.; LOKE, K.Y. A novel melanocortin3 receptor gene(MC3R) mutation associated with severe obesity. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Chevy Chase, v. 87, n. 3, p. 1423-1426, 2002.

LI, W. D.; JOO, E. J.; FURLONG, E. B.; GALVIN, M.; ABEL, K.; BELL, C. J.; PRICE, R. A. Melanocortin 3 receptor (MC3R) gene variants in extremely obese women. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, London, v. 24, p. 206-210, 2000.

LOHMAN, TG; ROCHE, AF & MARTORELL, R. **Anthropometric Standardization Reference Manual.** Human Kinetics. Champaign, IL., 1988.

LOHSE, M. J.; BENOVIC, J. L.; CODINA, J.; CARON, M. G.; LEFKOWITZ, R. J. β -arrestin, a protein that regulates β -adrenergic receptor function. **Science**, Washington, v. 248, p. 1547-1550, 1990.

LUBRANO-BERTHELIER, C.; DURAND, E.; DUBERN, B.; SHAPIRO, A.; DAZIN, P.; WEILL, J.; FERRON, C.; FROGUEL, P.; VAISSE, C. Intracellular retention is a common characteristic of childhood obesity-associated MC4R mutations. **Hum. Mol. Genet.**, Oxford, v. 12, p. 145-153, 2003.

LUQUET, S. AND MAGNAN, C. The central nervous system at the core of the regulation of energy homeostasis. **Front. Biosci.**, Tampa, v.1, p. 448 – 465, 2009.

MADEIRA, I. R.; CARVALNO, C. N. M.; GAZOLLA, F. M.; MATOS, H. J.; BORGES, M. A. E BORDALLO, M. A. N. Ponto de Corte do Índice *Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance* (HOMA-IR) Avaliado pela Curva *Receiver Operating Characteristic* (ROC) na Detecção de Síndrome Metabólica em Crianças Pré-Púberes com Excesso de Peso. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** Rio de Janeiro, v. 52, n. 9, p. 1466 – 1473, 2008.

MAFFEIS, C.; PIETROBELLI, A.; GREZZANI, A.; PROVERA, S. AND TATO, L. Waist Circumference and Cardiovascular Risk Factors in Prepubertal Children. **Obes. Res.**, Baton Rouge, v. 9, n. 3, p. 179 – 187, 2001.

MARCONDES, E.; MACHADO, D. V. M.. SETIAN, N.; CARRAZA, F. R. Crescimento e desenvolvimento. In: Marcondes E. **Pediatria básica.** Sarvier, São Paulo, 8ª edição, p. 35 – 63, 1991.

MARTI, A.; CORBALAN, M. S.; FORGA, L.; MARTINEZ, J.A.; HINNEY, A.; HEBERBRAND, J. A novel nonsense mutation in the melanocortin-4 receptor associated

with obesity in a Spanish population. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, London, v. 27, p. 385-388, 2003.

MCCARTHY, H. D.; COLE, T. J.; FRY, T.; JEBB, S. A. PRENTICE, A. M. Body fat reference curves for children. **Int. J. Obes.**, London, n. 30, p. 598-602, 2006.

MCDOWELL, M. A.; FRYAR, C. D.; HIRSCH, R.; OGDEN, C. L.; Anthropometric reference data for children and adults: U. S. population, 1999-2002. **Adv.Data.**, Hyattsville, n. 361, p. 1-32, 2005.

MENCARELLI, M.; WALKER, G. E.; MAESTRINI, S.; ALBERTI, L.; VERTI, B.; BRUNANI, A.; PETRONI, M. L.; TAGLIAFERRI, M.; LIUZZI, A.; DI BLASIO, A. M. Sporadic mutations in the melanocortin receptor 3 in morbid obese individuals. **Eur. J. Hum. Gen.**, London, v. 16, p. 581-586, 2008.

MERGEN, M.; MERGEN, H.; OZATA, M.; ONER, R.; ONER, C. A novel melanocortin 4 receptor (MC4R) gene mutation associated with morbid obesity. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Chevy Chase, v. 86, p. 3448-3451, 2001.

MIRAGLIA, D. G.; CIRILLO, G.; NIGRO, V.; SANTORO, N.; D'URSO, L.; RAIMONDO, P.; COZZOLINO, D.; SCAFATO, D.; PERRONE, L. Low frequency of melanocortin-4 receptor (MC4R) mutations in a Mediterranean population with early-onset obesity. **Int. J. Obes.**, London, v. 26, p. 647-665, 2002.

MOHAMED-ALI, V.; PINKNEY, J. H. AND COPPACK, S. W. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.** Hampshire, v. 22 p. 1145-1158, 1998

MONTAGUE, C. T.; FAROOQI, I. S.; WHITEHEAD, J. P.; SOOS, M. A.; RAU, H.; WAREHAM, N. J.; SEWTER, C. P.; DIGBY, J. E.; MOHAMMED, S. N.; HURST, J. A.; CHEETHAM, C. H.; EARLEY, A. R.; BARNETT, A. H.; PRINS, J. B.; O'RAHILLY, S. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. **Nature**, London, v. 387, p. 903-908, 1997.

MONTANI, J. P.; ANTIC, V.; YANG, Z.; DULLOO, A. Pathways from obesity to hypertension: from the perspective of a vicious triangle. **Int. J. Obes.**, London, v. 26, n. 2, p. 528-538, 2002.

MORAN, A.; JACOBS, D. R. JR.; STEINBERGER, J.; HONG, C. P.; PRINEAS, R.; LUEPKER, R. AND SINAIKO, A. R. Insulin resistance during puberty: results from clamp studies in 357 children. **Diabetes**, New York, v. 48, p. 2039-2044, 1999.

MORAN, A.; JACOBS, D. R. JR.; STEINBERGER, J.; COHEN, P.; HONG, C. P.; PRINEAS, R. AND SINAIKO, A. R. Association between the insulin resistance of puberty and the insulin-like growth factor-1/growth hormone axis. **J. Clin. Endocrinol. Metab., Springfield**, v. 87, p. 4817–4820, 2002.

MORENO, L. A.; FLETA, J.; MUR, L.; RODRIQUEZ, G.; SARRIA, A.; BUENO, M. Waist circumference values in Spanish children: gender related differences. **Eur. J. Clin. Nutr.**, London, v. 53, p. 429 – 433, 1999.

MOUNTJOY, K. G.; MORTRUD, M. T.; LOW, M. J.; SIMERLY, R. B.; CONE, R. D. Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. **Mol. Endocrinol.**, Baltimore, v. 8, p. 1298-1308, 1994.

MUST, A.; DALLAL, G. E. AND DIETZ, W.H. Reference data for obesity: 85th and 95th percentiles of body mass index (wt/ht²) and triceps skinfold thickness. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v. 53, p. 839 – 846, 1991.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Hormonal regulation and integration of mammalian metabolism. In: Lehninger – Principles of Biochemistry. **W. H. Freeman and Company**. New York, c. 23, p. 901 – 944, 2010.

NOGUEIRAS, R.; WIEDMER, P.; PEREZ-TILVE, D.; VEYRAT-DUREBEX, C.; KEOGH, J.M.; SUTTON, G. M.; PFLUGER, P. T.; CASTANEDA, T. R.; NESCHEN, S.; HOFMANN, S. M.; HOWLES, P. N.; MORGAN, D. A.; BENOIT, S. C.; SZANTO, I.; SCHROTT, B.; SCHÜRMAN, A.; JOOST, H-G.; HAMMOND, C.; HUI, D. Y.; WOODS, S. C.; RAHMOUNI, K.; BUTLER, A. A.; FAROOQI, I. S.; O'RAHILLY, S.; ROHNER-JEANRENAUD, F., AND TSCHÖP, M. H. The central melanocortin system directly controls peripheral lipid metabolism. **J. Clin. Invest.**, Ann Arbor, v. 117, n. 11, p. 3475-3488, 2007.

POWER, C.; LAKE, J. K. AND COLE, T. J. Measurement and long-term health risks of child and adolescent fatness. **Int. J. Obes.**, London, v. 21. p. 507 – 526, 1997.

REAVEN GM. Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes**, New York, v. 37, p. 1595–1607, 1998.

REINEHR, T.; SOUSA, G.; TOSCHKE, A. M. AND ANDLER, W. Comparison of metabolic syndrome prevalence using eight different definitions: a critical approach. **Arch. Dis. Child**. London, v. 92, p. 1067 – 1072, 2007.

ROLLAND-CACHERA, M. F.; DEHEEGER, M.; GUILLOUD-BATAILLE, M.; AVONS, P.; PATOIS, E.; SEMPÉ, M. Tracking the development of adiposity from one month of age to adulthood. **Ann. Hum. Biol.**, London, v. 14, n. 3, p. 219-229, 1987.

RUTANEN, J.; PIHLAJAMÄKI, J.; VÄNTTINEN, M.; SALMENNEMI, U.; RUOTSALAINEN, E.; KUULASMAA, T.; KAINULAINEN, S AND LAAKSO, M. Single nucleotide polymorphisms of the melanocortin-3 receptor gene are associated with substrate oxidation and first-phase insulin secretion in offspring of type 2 Diabetic subjects. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** Chevy Chase, v. 92. n° 3, p. 1112 – 1117, 2007.

SANTINI, F.; MAFFEI, M.; CECCARINI, G.; PELOSINI, C.; SCARTABELLI, G.; ROSELLINI, V.; CHIPELLINI, C.; MARSILI, A.; LISI, S.; TONACCHERA, M.; AGRETTI, P.; CHIOVATO, L.; MAMMOLI, C.; VITTI, P.; PINCHERA, A. Genetic screening for melanocortin-4 receptor mutations in a cohort of Italian obese patients: description and functional characterization of a novel mutation. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Chevy Chase, v. 89, p. 904-908, 2004.

SCHALIN, C.; VALLI-JAAKOTA, K.; OKSANEN, L.; MARTELIN, E.; LAITINEN, K.; KRUSIUS, T.; MUSTAJOKI, P.; HEIKINHEIMO, M.; KONTULA, K. Melanocortin-3 receptor gene variants in morbid obesity. **Int J Obes Relat Metab Disord**, London, v. 27, p. 70-74, 2003

SCHWARTZ, M. W.; FIGLEWICZ, D. P.; BASKIN, D. G.; WOODS, S. C. AND PORTE JR., D. Insulin in the Brain: A Hormonal Regulator of Energy Balance. **Endocr. Rev.**, Baltimore, v. 13, n. 3, p. 387 – 414, 1992.

SCHWARTZ, M. W.; WOODS, S. C.; PORTE JR., D.; SEELEY, R. J.; BASKIN, D. G. Central nervous system control of food intake. **Nature**, London, v. 44, p. 661-671, 2000.

SHULDINER, A. R.; YANG, R. AND GONG, D-W. Resistin, obesity, and insulin resistance: the emerging role of the adipocyte as an endocrine organ. **N. Engl. J. Med.**, Boston v. 345: p. 1345–1346, 2001.

SINA, M.; HINNEY, A.; ZIEGLER, A.; NEUPERT, T.; MAYER, H.; SIEGFRIED, W.; BLUM, W. F.; REMSCHMIDT, H.; HEBEBRAND, J. Phenotypes in three pedigrees with autosomal dominant obesity caused by haploinsufficiency mutations in the melanocortin-4 receptor gene. **Am. J. Hum. Genet.**, Chicago, v. 65, p. 1501-1507, 1999.

SOAR, C.; VASCONCELOS, F. A. G. E ASSIS, M. A. A. A relação cintura quadril e o perímetro da cintura associados ao índice de massa corporal em estudo com escolares. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 6, p. 1609 – 1616, 2004.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. I Diretriz de prevenção da aterosclerose na infância e na adolescência. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo, v. 85, S p.2 – 36, 2005.

STANLEY, B. G.; KYRKOULI, S. E.; LAMPERT, S. & LEIBOWITZ, S.F. Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. **Peptides**, New York, v. 7, p. 1189-1192, 1986.

SUNDARAMURTHY, D.; CAMPBELL, D. A.; LEEK, J. P. MARKHAM, A. F.; PIERI, L. F. Assignment of the melanocortin-4 receptor (MC4R) gene to human chromosome band 18q22 by in situ hybridization and radiation hybrid mapping. **Cytogenet. Cell. Genet.**, Basel, v. 82, p. 97-98, 1998.

TAO, YA-XIONG. Functional characterization of novel melanocortin-3 receptor mutations identified from obese subjects. **Biochim. Biophys. Acta**, available on www.sciencedirect.com p. 1167 – 1174, 2007.

TAYLOR, S. W.; JONES, I. E.; WILLIAMS, S. M. AND GOULDING, A. Evaluation of waist circumference, waist-to-hip ratio, and the conicity index as screening tools for high trunk fat mass, as measured by dual-energy X-ray absorptiometry, in children aged 3–19 y. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v. 72, p. 490 – 495, 2000.

TSAO, P. I.; VON ZASTROW, M. Diversity and specificity in the regulated endocytic membrane trafficking of G-protein-coupled receptors. **Pharmacol. Ther.**, Oxford, v. 89, p. 139-147, 2001.

VAISSE, C.; CLEMENT, K.; GUY-GRAND, B.; FROGUEL, P. A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity [letter]. **Nat. Genet.**, New York, v. 20, p. 113-114, 1998.

VAISSE, C.; CLEMENT, K.; DURAND, E.; HERCBERG, S.; GUY-GRAND, B.; FROGUEL, P. Melanocortin-4 receptor mutations are a frequent and heterogeneous cause of morbid obesity. **J. Clin. Invest.**, Ann Arbor, v. 106, p. 253-262, 2000.

VALLI-JAAKOLA, K.; LIPSANEN-NYMAN, M.; OKSANEN, L.; HOLLENBERG, A. N.; KONTULA, K.; BJORBAEK, C.; SCHALIN-JANTTI, C. Identification and characterization of melanocortin-4 receptor gene mutations in morbidly obese Finnish children and adults. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Chevy Chase, v. 89, p. 940-945, 2004.

WANG, S.-X.; FAN, Z.-C. AND TAO, Y.-X. Functions of Acidic Transmembrane Residues in Human Melanocortin-3 Receptor Binding and Activation. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v. 76, n° 4, p. 520 – 530, 2008.

WEISS, R; DZIURA, J; BURGERT, T. S.; TAMBORLANE, W. V.; TAKSALI, S. E.; YECKEL, C. W.; ALLEN, K.; LOPES, M.; SAVOYE, M.; MORRISON, J.; SHERWIN, R. S. AND CAPRIO, S. Obesity and the metabolic syndrome in children and adolescents. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 350, n. 3, p. 2362 – 2374, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. **World Health Organ. Tech. Rep. Ser.**, Geneva: 894, 2000.

YAMAUCHI, T.; KAMON, J.; WAKI, H.; TERAUCHI, Y.; KUBOTA, N.; HARA, K.; MORI, Y.; IDE, T.; MURAKAMI, K.; TSUBOYAMA-KASAOKA, N.; EZAKI, O.; AKANUMA, Y.; GAVRILOVA, O.; VINSON, C.; REITMAN, M. L.; KAGECHIKA, H.; SHUDO, K.; YODA, M.; NAKANO, Y.; TOBE, K.; NAGAI, R.; KIMURA, S.; TOMITA, M.; FROGUEL, P. AND KADOWAKI, T. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. **Nat. Med.**, New York, v. 7, p. 941–946, 2001.

YEO, G. S.; FAROOQI, I. S.; AMINIAN, S.; HALSALL, D. J.; STANHOPE, R. G.; O'RAHILLY, S. A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity [letter]. **Nat. Genet.**, New York, v. 20, p. 111-112, 1998.

YIANNAKOURIS, N.; MELISTAS, L.; KONTOGIANNI, M.; HEIST, K.; MANTZOROS, C. S. The Val81 missense mutation of the melanocortin 3 receptor gene, but not the 1908c/T nucleotide polymorphism in lamin A/C gene, is associated with hyperleptinemia and hyperinsulinemia in obese Greek Caucasians. **J. Endocrinol. Invest.** Milano, v. 27, p. 714-720, 2004.

ZHANG, J.; BARAK, L. S.; WINKLER, K. E.; CARON, M. G.; FERGUSON, S. S. G. A central role for β -arrestins and clathrin-coated vesicle-mediated endocytosis in β 2-adrenergic receptor resensitization. Differential regulation of receptor resensitization in two distinct cell types. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 272, p. 27005-27014, 1997.

ZIERATH, J. R.; LIVINGSTON, J. N.; THORNE, A.; BOLINDER, J.; REYNISDOTTIR, S.; LÖNNQVIST, F. AND ARNER, P. Regional difference in insulin inhibition of non-esterified fatty acid release from human adipocytes: relation to insulin receptor phosphorylation and intracellular signaling through the insulin receptor substrate-1 pathway. **Diabetologia**, Berlin, v. 41, p.1343–1354, 1998.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)