

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS GENÉTICOS E OBESIDADE INFANTIL

Renata Machado Pinto, Thais Cidália Vieira, Daniela de Melo e Silva, Aparecido Divino da Cruz
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM GENÉTICA

Introdução

A obesidade é reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como um dos dez principais problemas de saúde nas mais diversas sociedades; sua prevalência tem aumentado em todo o mundo, alcançando proporções epidêmicas em muitos países, inclusive o Brasil. A pesquisa de Orçamentos Familiares (POF 2008-2009) realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística em parceria com o Ministério da Saúde (IBGE 2010), após analisar 188 mil brasileiros revelou dados surpreendentes: 48% das mulheres e 50% dos homens estão acima do peso, sendo que 16,9% das mulheres e 12,5% dos homens estão obesos. Os números das crianças e adolescentes também impressionam: está presente excesso de peso em 21,7% dos meninos e em 19% das meninas, sendo obesos 6% dos meninos e 4% das meninas. Na faixa etária entre 5 e 9 o sobrepeso está presente em 34,8% dos meninos e 32% das meninas, sendo considerados obesos 16,6% do grupo. A obesidade está associada a um maior risco para diversas doenças crônicas, incluindo diabetes, hipertensão, apnéia do sono, asma, doenças cardíacas, acidente vascular cerebral e diversos tipos de câncer. Essas complicações têm ocorrido cada vez mais precocemente, cerca de 60% das crianças obesas entre 5 e 10 anos têm pelo menos um fator de risco para doença cardiovascular e 20% delas têm dois ou mais desses fatores. No Brasil estima-se que sejam gastos um bilhão e 100 milhões de reais a cada ano com internações hospitalares, consultas médicas e remédios para o tratamento do excesso de peso e das doenças ligadas a ele. Durante muitos anos o tecido adiposo foi considerado apenas como local de reserva energética, protetor contra choques e isolante térmico. Na última década esta visão foi radicalmente transformada após a descoberta de inúmeras substâncias secretadas pelos adipócitos, dentre elas hormônios e citocinas com ações na inflamação. Cita-se: TNF- α , IL 6, IL 1 β , IL 1 β RA, IL 8, IL 10, MCP 1, Adiponectina, Leptina, Resistina e Visfatina. Tanto a obesidade quanto a inflamação sistêmica estão associados às desordens metabólicas componentes da Síndrome Metabólica (diabetes mellitus, hipertensão arterial, dislipidemias) que levam a aterosclerose e elevam o risco das doenças cardiovasculares. Em 2004 a obesidade foi caracterizada como estado de inflamação crônica de baixa intensidade. A inflamação subclínica pode ser um mecanismo central que liga a obesidade às suas inúmeras complicações sistêmicas. Parece claro que a obesidade leva à inflamação por estimular a expressão e secreção de adipocinas pró-inflamatórias pelo tecido adiposo, mas a relação inversa, ou seja, inflamação induzindo o aumento do peso tem sido sugerida por alguns autores. Um mecanismo proposto para explicar esse fenômeno seria a indução da obesidade a partir de citocinas pró-inflamatórias participantes da regulação da ingestão alimentar, e por outro lado a hipóxia decorrente da expansão do tecido adiposo levaria a liberação de adipocinas inflamatórias, criando um ciclo vicioso entre inflamação e obesidade. A observação da *Drosophila sp.* pode ser a chave para se entender a conexão entre o sistema imune e o metabólico. A mosca possui uma estrutura chamada corpo gorduroso que é responsável pelo fornecimento de energia e pela defesa contra micro-organismos invasores. Durante a evolução houve uma especialização dos tecidos, com separação do tecido adiposo e imune, porém parece persistir uma espécie de “memória ancestral”. Existe uma grande sobreposição de funções dos macrófagos e adipócitos na obesidade. A expressão de genes nesses dois tipos celulares é muito semelhante, e suas funções também podem se coordenar: no processo da aterosclerose os macrófagos se transformam em células espumosas ao captarem e armazenarem gordura; os pré adipócitos podem ter atividade fagocítica e antimicrobiana. Além das citocinas, outro elo entre os sistemas imune e metabólico é uma família de proteínas de membrana chamada Toll-like receptors (TLRs).

Métodos, procedimentos e materiais

A presente proposta trata-se de um estudo tipo Caso Controle, desenhado para investigar a potencial relação entre a obesidade de início na infância e polimorfismos genéticos. Este é um estudo citogenético-molecular, que será conduzido no LaGene e no Núcleo de Pesquisas Replicon, em conjunto com o Hospital da Criança, UEG. Todos os indivíduos serão avaliados, pessoalmente, pela equipe de pesquisadores. Os pais e/ou responsáveis serão entrevistados e preencherão o termo de consentimento livre e esclarecido para autorizarem o teste genético e o uso dos dados neste estudo. GRUPO AMOSTRAL: Serão incluídas no estudo as crianças com idade superior a 5 anos que procurarem o consultório de endocrinologia pediátrica do Hospital da Criança. As crianças serão divididas em dois grupos: obesos e peso normal. Serão avaliadas no total, 50 crianças de cada grupo, sendo considerados como critérios de exclusão: sobrepeso, doenças crônicas graves, presença de síndromes genéticas, patologias cujo tratamento empregue medicações que sabidamente alterem o peso (glicocorticóides, Hormônio de crescimento, insulina, análogos do GnRH, etc.) As crianças serão submetidas a exame

clínico minucioso. Pais ou responsáveis responderão a questionário sobre o histórico da criança e família. Será feita avaliação bioquímica para determinação do lipidograma, glicemia de jejum e insulina. **CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS E MÉTODOS APLICADOS:** Amostras de sangue periférico heparinizado serão obtidas dos dois grupos, colhidas no Laboratório Nucleo e enviadas ao LaGene. O DNA genômico será isolado da papa leucocitária de sangue venoso periférico usando métodos convencionais para investigar a relação entre o ganho de peso em pacientes e a diversidade genética de múltiplos genes candidatos. Os loci examinados serão TOLL LIKE RECEPTOR 4 (TLR4) - Polimorfismo D299G e T399I (mutantes = 299G e 399I e selvagem = 299D e 399T), TNF alfa - G 238 A (rs 361525), C 857 T (rs 1799724) - proteção níveis colesterol e C 863 A (rs 1800630); Interleucina- 6 - 174 G/C - rs 1524107 C/T, rs 1800795 e rs 10242595 G/A; Adiponectina - SNP +45 ou T/G e + 276 G/T. As metodologias utilizadas para o estudo desses polimorfismos serão PCR-RFLP (Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição) e PCR em tempo real, com a utilização de primers de alta resolução (HRM- do inglês, high resolution melting). **MECANISMOS GERAIS DE EXECUÇÃO:** Todo o projeto será desenvolvido através da parceria do Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular (LaGene) do LACEN/SES/GO, a Universidade Estadual de Goiás e a Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-GO). Este projeto será submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa pelo CONEP/Pataforma Brasil juntamente com o modelo do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O LaGene/Replicon se comprometem a fornecer suas instalações, e disponibilizar os equipamentos e materiais de consumo permanentes necessários para o desenvolvimento do presente estudo. O Hospital da Criança – consultório de Endocrinologia Pediátrica é colaborador da presente proposta por ser voluntário na fonte de doação das amostras biológicas assim como na disponibilização de dados e prontuários dos pacientes pertencentes ao estudo.

Resultados e discussão

Será calculado o ODDS e aplicado o teste do qui-quadrado com nível de significância de $p < 0,05$. A análise de múltiplas variâncias (ANOVA) será realizada com pacotes estatísticos rotineiramente usados em análise de variância. Correções estatísticas serão acrescentadas durante as análises conforme a necessidade. **RESULTADOS ESPERADOS:** Com a obtenção das frequências alélicas e genotípicas observadas para o polimorfismo nos genes candidatos, será possível associar a presença do alelo com o ganho de peso através de análises estatísticas de alta precisão. Posteriormente estes dados poderão ser correlacionados com o grau de resistência insulínica, índice de Massa Corpórea (IMC) e lipidograma dos indivíduos estudados. Uma vez conhecida esta relação, programas intensivos de acompanhamento serão apresentados pela equipe visando proporcionar novos caminhos para o tratamento e prevenção da obesidade em Goiânia. Ainda com base nos dados obtidos, a equipe poderá apresentar projetos e discussões sobre o desenvolvimento de pequenos RNAs como estratégia útil para silenciar especificamente alelos relacionados ao aparecimento da obesidade na infância. Todos estes resultados poderão ser apresentados em congressos nacionais e internacionais que envolvam a temática proposta para possíveis discussões e comparações dos dados obtidos com os de outras regiões. Esta possibilidade de ampla de obtenção de dados sobre predisposição genética e obesidade, permitirá certamente publicações

Conclusão e referências

Apesar da contribuição de fatores genéticos no desenvolvimento do ganho de peso ser amplamente reconhecida, a real contribuição quantitativa dos mesmos em fenótipos relacionados é ainda uma questão complexa que precisa ser esclarecida. Variações comuns da sequência do DNA genômico, denominadas polimorfismos, podem ser responsáveis pelo ganho de peso. A presente proposta abre uma nova linha para a investigação da relação entre a obesidade de início precoce e o processo inflamatório. O reconhecimento de indivíduos predispostos através da determinação de polimorfismos de risco poderá justificar programas intensivos de prevenção através da mudança de estilo de vida. Posteriormente o desenvolvimento de pequenos RNAs pode ser uma estratégia útil para silenciar especificamente alelos relacionados ao aparecimento da obesidade na infância. Vislumbra-se que no futuro as crianças sofrerão intervenções de prevenção e tratamento a partir de seus genomas.

Adams KF, Schatzkin A, Harris TB, ET AL. Overweight, obesity and mortality in a large prospective cohort of persons 50 to 71 years old. *N Engl J Med* 2006; 355(8):763-78. Amemiya, S et al. Metabolic syndrome in youths. *Pediatric Diabetes* 2007; 8:48-54. Andersson CX, Gustafson B, Hammarstedt A, Hedjazifar S, Smith U. Inflamed adipose tissue, insulin resistance and vascular injury. *Diabetes Metab Res Rev* 2008; 24: 595–603. Bays HE, González-Campoy JM, Bray GA, Kitabchi AE, Bergman DA, Schorr AB, Rodbard HW, Henry RR. Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte visceral adiposity. *Expert Rev. Cardiovas. Ther.* 2008; 6(3): 343-368. Bell CG, Walley

AW, and Froguel P (2005). The genetics of human obesity. *Nature Reviews Genetics*. 6: 221-234. Berg AH, Scherer PE. Adipose Tissue, Inflammation, and Cardiovascular Disease. *Circ. Res.* 2005; 96:939-949. Bradfield JP et al. A genome-wide association meta-analysis identifies new childhood obesity loci. *Nature Genetics* 44, 526–531(2012) doi:10.1038/ng.2247 Received 21 October 2011 Accepted 14 March 2012 Published online 08 April 2012. Brasil. Ministério da Saúde (2002) — Área Técnica de Alimentação e Nutrição. Brasília, DF. Carvalho Filho, M. A.; Cintra, D. E.; Ropelle, E. R.; Pauli, J. R. Obesidade e diabetes: da origem ao caos. In: *Obesidade e Diabetes fisiopatologia e sinalização celular*. Ed. Sarvier, 2011. Das UN. Is Obesity an Inflammatory Condition? *Nutrition* 2001;17:953–966. Demerath, EW et al. Genetics and environmental influences on infant weight and weight change: the Fels Longitudinal Study. *Am J Hum Biol* 2007; 19:692-702. Engström G, Hedblad B, Stavenow L, Lind P, Janzon L, Lindgärde F. Inflammation-Sensitive Plasma Proteins Are Associated With Future Weight Gain. *Diabetes* 2003; 52:2097–2101. Fantuzzi G, Mazzone T. Adipose Tissue and Atherosclerosis: Exploring the Connection. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007; 27:996-1003. Ferreira VA & Magalhães R (2006). Obesidade no Brasil: tendências atuais. *Revista Portuguesa de Saúde Pública*. 24 (2):71-81. Greenberg AS, Martin SO, Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and Metabolism. *Am J Clin Nutr* 2006; 83(suppl):461S–5S. Griffiths, LJ et al. Differential parental weight and height contributions to offspring birthweight and weight gain in infancy. *Int J Epidemiol* 2007; 36: 104-107. Hainer V, Zamrazilová H, Spálová J, Hainerová I, Kunešová M, Aldhoon B and Bendlová B (2008) Role of Hereditary Factors in Weight Loss and Its Maintenance. *Physiol. Res.* 57 (Suppl. 1): S1-S15. Hajer GR, Van Haften TW, Visseren FLJ. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *European Heart Journal* 2008; 1-13. Halper, A. Editorial: A Epidemia de Obesidade. *Arq Bras Endocrinol Metab* vol.43 no.3 São Paulo June 1999. Hermsdorff HHM, Monteiro JBR. Gordura Visceral, Subcutânea ou Intramuscular: Onde Está o Problema? *Arq Bras Endocrinol Metab* 2004; 48(6):803-811. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Pesquisa de Orçamento Familiar (POF) 2008-2009 – Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil. 2010. Jaeger JP, Mattevi VS, Callegari-Jacques SM and Hutz MH (2008) . Cannabinoid type-1 receptor gene polymorphisms are associated with central obesity in a Southern Brazilian population. *Disease Markers*. 25: 67-74. Lau DCW, Dhillon B, Yan H, Szmítko PE, Verma S. Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288:2031.

Palavras-chave: Obesidade, Polimorfismos Genéticos

Contato: drarenatamachado@gmail.com