

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

RENATO MARANO ROCHA

INVESTIGAÇÃO DO POLIMORFISMO PRO12ALA NO GENE DO RECEPTOR
ATIVADO POR PROLIFERADOR DE PEROXISSOMO-GAMA (PPAR γ) EM
PACIENTES COM SÍNDROME METABÓLICA

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: Profa. Dra. Monalisa Ferreira Azevedo

Brasília
2014

RENATO MARANO ROCHA

INVESTIGAÇÃO DO POLIMORFISMO PRO12ALA NO GENE DO RECEPTOR
ATIVADO POR PROLIFERADOR DE PEROXISSOMO-GAMA (PPAR γ) EM
PACIENTES COM SÍNDROME METABÓLICA

Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do título de Mestre em Ciências
da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 08 de agosto de 2014

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Monalisa Ferreira Azevedo - (presidente)
Faculdade de Ciências da Saúde, UnB

Prof. Dr. José Eduardo Trevizoli
Universidade Católica de Brasília

Prof. Dr. Luiz Augusto Casulari Roxo da Motta
Faculdade de Ciências da Saúde, UnB

*A Deus, criador dos céus e da terra, toda honra,
glória e poder!*

AGRADECIMENTOS

Mais uma etapa vencida na minha trajetória e no meu projeto de vida. Não poderia finalizar esse trabalho sem me reportar a pessoas especiais com os meus sinceros agradecimentos.

A Deus, meu Senhor e Salvador, obrigado por tudo o que tem me dado na minha existência. Agradeço por ser o autor da minha vida e socorro presente na hora da angústia. Sou grato por ter dado a minha família, amigos, saúde, mas também força para superar as dificuldades, inclusive a deste mestrado.

Aos meus pais, Ivan e Sandra, pelo amor, incentivo e apoio incondicional. Obrigado por todos os momentos dedicados a mim, pelas palavras, pelos conselhos, pela honestidade, pelo afeto, pela amizade. Todo o dia esforço-me em cumprir mandamento divino de honrá-los.

Dudu e Dani, meus queridos irmãos, a vida sem vocês não teria graça. Bruno e Gabriel, meus primos irmãos, mesmo morando longe vocês sempre estão no meu coração.

Aos demais membros da minha pequena, mas preciosa família, atualmente composta pela minha amada avó Marlene e pelos meus tios Jorge e Giani, declaro que vocês são tesouros de Deus e é muito bom saber que vocês estão ao meu lado sempre, seja nos momentos bons ou ruins. Obrigado pela confiança e admiração. É com vocês que posso contar para compartilhar as minhas alegrias, mas também as angústias.

Vó Maria, sua morte recente muito me abalou. Pensei em desistir. Mas juntei forças para honrar tudo o que você me ajudou a conquistar. Aos meus avós Joaquim, Carlos e aos meus tios Dêda e Daniel, saudades sem fim. Vocês fazem muita falta no meu dia a dia.

Aos meus amigos fieis, que nos momentos da minha ausência, dedicados a este estudo, entenderam que o futuro é feito a partir da constante dedicação realizada no presente! Faço um aparte especial para Érica Caldas, amiga que conheci durante a pesquisa e que foi primordial para que hoje eu pudesse apresentar a minha defesa e os meus resultados.

Agradeço à querida professora Monalisa pelo convite de fazer esta pós-graduação. Lembro-me perfeitamente do dia pelo qual permitiu que eu entrasse no universo acadêmico tão distante para mim. Obrigado pelas orientações acadêmicas,

pelas conversas, pelos conselhos, pelo crescimento intelectual, profissional e pessoal, pela confiança e pelo carinho. Espero que não tenha se cansado de mim e que este seja só mais um de nossos trabalhos. Quem sabe o doutorado? E sempre bom sonhar...

Ao professor Gustavo Barra, obrigado pela paciência, compreensão e pela pronta resposta em todas as dúvidas pelas quais tivesse. Suas sugestões e a sua supervisão nos processos laboratoriais foram fundamentais trabalho de bancada.

A professora Angélica Amato, minha sincera gratidão pela sua amabilidade e também por ter disponibilizado o espaço do Laboratório de Farmacologia Molecular da Faculdade de Ciências da Saúde, bem como todo o material necessário para este estudo.

A todos, que contribuíram para que pudesse subir mais esse degrau, não consigo parar de agradecer. Acredito que este não seja o fim. Conto com vocês nas próximas jornadas. Ate breve!

RESUMO

Introdução: A síndrome metabólica (SMet) é doença multifatorial, resultante da complexa interação entre fatores fisiológicos, comportamentais, culturais e genéticos que aumentam o risco de desenvolvimento de doenças crônicas, como *diabetes mellitus* tipo 2, hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia, e conseqüentemente, aumento do risco cardiovascular e de morte prematura. Apesar do amplo conhecimento de que a adiposidade e resistência insulínica exercem papel relevante no desenvolvimento desta síndrome, os fatores genéticos envolvidos ainda não estão esclarecidos na sua totalidade. Os receptores ativados por proliferador de peroxissomo gama (PPAR γ) desempenham papel importante na adipogênese e no metabolismo de lipídeos e hidratos de carbono. Sua variabilidade genética, em particular, o polimorfismo *rs1801282* (Pro12Ala), é investigado como possível marcador genético preditivo para a esteatose hepática, *diabetes mellitus* e outras condições. No entanto, os estudos que abordam essa questão no contexto da SMet são escassos na literatura. **Objetivo:** Este estudo destinou-se a determinar as frequências genotípicas e alélicas de *rs1801282* em 179 controles e em 154 pacientes com SMet que vivem em Brasília, Brasil e também examinar a associação com variáveis antropométricas, bioquímicas e hemodinâmicas neste último grupo. **Metodologia:** DNA foi extraído pelo método de Chelex-100 e as determinações dos genótipos foram realizadas por meio da reação em cadeia da polimerase alelo específico. **Resultados:** A distribuição de frequência do genótipo no grupo SMet não foi estatisticamente diferente da frequência nos controles. Na SMet, a frequência do genótipo foi 0,869 para o CC, e 0,131 para CG, enquanto as frequências alélicas foram 0,948 para C e 0,052 para o alelo G. No grupo controle, as frequências genotípicas e alélicas foram 0,882 para CC, 0,117 para CG; e 0,941 para C e 0,059

para G, respectivamente. O genótipo GG não foi encontrado em quaisquer dos dois grupos. As distribuições genotípicas e as frequências alélicas estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Nenhum marcador pôde ser detectado a partir da análise das variáveis antropométricas, bioquímicas e hemodinâmicas no grupo SMet.

Conclusão: Nossos dados sugerem que esse polimorfismo não está correlacionado com predisposição à SMet. Este resultado, obtido em uma pequena amostra da população de Brasília, está em consonância com os achados anteriores relatados na literatura sobre a prevalência deste polimorfismo no PPAR γ em populações de diferentes origens étnicas.

Palavras-chave: Polimorfismo; gene do receptor ativado por proliferador de peroxissomo gama 2; *diabetes mellitus* tipo 2; síndrome metabólica; obesidade

ABSTRACT

Introduction: The metabolic syndrome (MetS) is a multifactorial disorder which results from the complex interaction between physiological, behavioral, cultural and genetic factors that increase the risk of developing chronic diseases such as hypertension, type 2 *diabetes mellitus*, dyslipidemia, and consequently, increased cardiovascular risk and early deaths. Despite current knowledge that adiposity and insulin resistance play a relevant role in the development of this syndrome, the genetic factors involved are still unclear in their entirety. Peroxisome proliferator activated receptor-gamma (PPAR γ) plays an important role in lipid homeostasis, adipogenesis and insulin resistance, which implicates a possible role for *PPAR γ* gene in predisposition to MetS. Indeed, variability in this gene, in particular, the rs1801282 (Pro12Ala) polymorphism, has been investigated as a possible predictive genetic marker for hepatic steatosis, *diabetes mellitus* and other conditions. However, studies addressing this issue in the context of MetS are scarce in the literature.

Objective: This study aimed to determine the genotypic and allelic frequencies of the rs1801282 polymorphism in 179 controls and 154 patients with MetS from Brasilia, Brazil, and also to examine the correlation of the genotype with anthropometric, biochemical and hemodynamic variables, in the last group. **Methods:** DNA was extracted by the Chelex-100 method (121), and rs1801282 genotype assignments were conducted by allele-specific polymerase chain reaction. **Results:** The genotype frequency distribution in MetS group was not statistically different from the frequency in controls. In MetS, genotype frequency was 0,869 for the CC and 0,103 for CG, whereas allelic frequencies were 0,948 for C and 0,052 for G allele. In the control group, genotypic and allelic frequencies were 0,882 for CC, 0,117 for CG; and 0,941 for C and 0,059 for G, respectively. The GG genotype was not found in any of the

two groups. Allelic and genotypic frequencies for this polymorphism were in Hardy-Weinberg equilibrium. No marker could be detected from the analysis of anthropometric, biochemical and hemodynamic variables in the MetS group.

Conclusions: Our data suggest that this polymorphism is not correlated with predisposition to MetS. This result, obtained in a small sample of the population of Brasilia, is in line with previous findings reported in the literature of the prevalence of this polymorphism in *PPAR γ* in populations of diverse ethnic backgrounds.

KEYWORDS: Polymorphism; peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 gene; type 2 *diabetes mellitus*; metabolic syndrome; obesity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Imagem esquemática das condições implicadas na fisiopatologia da síndrome metabólica e suas potenciais interações.

Figura 2 - Estrutura esquemática dos domínios funcionais de receptores nucleares.

Figura 3 - Panorâmica tridimensional das estruturas intactas do heterodímero PPAR γ -RXR α .

Figura 4 - Regulação positiva da transcrição gênica, ou transativação dependente do ligante e mecanismos de regulação negativa da expressão gênica pelos PPARs.

Figura 5 – Estratégia para genotipagem do polimorfismo Pro12Ala e validação dos resultados utilizando diferentes conjuntos de primers alelos-específicos.

Figura 6: Determinação genotípica de um indivíduo heterozigoto CG.

Figura 7: “Curva de “melting” na determinação genotípica de um indivíduo heterozigoto CG.

Figura 8: Determinação genotípica de um indivíduo heterozigoto CG.

Figura 9: “Curva de “melting” na determinação genotípica de um indivíduo heterozigoto CG.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação da síndrome metabólica em adultos de acordo com os critérios da OMS, EGIR, NCEP/ATP- III, AACE e IDF

Tabela 2 - Critérios para o diagnóstico clínico da síndrome metabólica segundo o Joint Interim Statement

Tabela 3 – Índice de Massa Corporal (IMC) e Classificação Obesidade (kg/m²) conforme OMS.

Tabela 4 - Iniciadores utilizados para genotipagem do polimorfismo Pro12Ala.

Tabela 5 - Configuração das reações de PCR utilizadas para genotipar o polimorfismo Pro12Ala e para validar o resultado obtido.

Tabela 6 - Características básicas antropométricas, bioquímicas e hemodinâmicas dos pacientes com síndrome metabólica.

Tabela 7 - Distribuição dos alelos e genótipos do polimorfismo Pro12Ala do gene PPAR γ em pacientes com síndrome metabólica e controles.

Tabela 8 - Comparação de dados bioquímicos, antropométricos e hemodinâmicos dos indivíduos com síndrome metabólica entre os diferentes grupos de genótipos polimorfismo Pro12Ala de PPAR γ .

Tabela 9 - Associação dos genótipos de PPAR γ e a frequência de componentes individuais da síndrome metabólica.

Tabela 10 - Variáveis antropométricas, hemodinâmicas e metabólicas, de acordo com os genótipos do gene PPAR γ em todos os pacientes com síndrome metabólica e subgrupos com diabetes, hipertensão e obesidade.

LISTA DE SIGLAS

Ang II – Angiotensinogênio II

CA - Circunferência da cintura

CC – Indivíduo ou grupo de indivíduos que apresenta duas citosinas no locus do PPAR γ 2.

CG – Indivíduo ou grupo de indivíduos que apresenta uma citosina e uma guanina no locus do PPAR γ 2.

DP – Desvio-padrão

ECA – Enzima conversora de angiotensina

GCL – Glicocorticoides

GG – Indivíduo ou grupo de indivíduos que apresenta duas guaninas no locus do PPAR γ 2.

HDL- c – Lipoproteína de alta densidade

HOMA-IR – Índice de homeostase de RI.

IL-6 – Interleucina 6

IMC – Índice de Massa Corporal

LDL- c – Lipoproteína de baixa densidade

P – Valor da comparação entre grupos, valor para significância estatística

PAD - Pressão arterial diastólica

PAS – Pressão arterial sistólica

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PPAR - Receptores ativados por proliferação de peroxissomos

PPAR α - Receptores ativadores da proliferação de peroxissomos alfa

PPAR β - Receptores ativadores da proliferação de peroxissomos beta

PPAR γ - Receptores ativadores da proliferação de peroxissomos gama

PPRE- Elementos responsivos do PPAR

RCQ – Relação cintura - quadril

RXR – Receptor de ácido retinóico

SNP – Polimorfismo de um único nucleotídeo

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TGL – Triglicerídeos

TNF α - Fator de Necrose Tumoral alfa

“O Altíssimo deu-lhes a ciência da medicina para ser honrado em suas maravilhas”

Eclesiastes, 38:6

SUMÁRIO

1	REVISÃO DA LITERATURA.....	18
1.1	SÍNDROME METABÓLICA.....	18
1.1.1	Definição.....	18
1.1.2	Critérios diagnósticos.....	19
1.1.3	Prevalência.....	22
1.1.4	Patogênese.....	23
1.1.4.1	Obesidade.....	24
1.1.4.1.1	Tecido Adiposo.....	25
1.1.4.1.2	Tecido Adiposo Disfuncional.....	27
1.1.4.2	Resistência Insulínica.....	29
1.1.4.3	Estresse Crônico: Disregulação do Eixo Hipotálamo – Hipofisário e Sistema Nervoso Autônomo.....	30
1.1.4.4	Estresse Celular Oxidativo: Sistema Renina – Angiotensina – Aldosterona.....	32
1.2	RECEPTOR ATIVADO POR PROLIFERADOR DE PEROXISSOMO.....	33
1.2.1	Estrutura.....	34
1.2.2	Mecanismo de Ação.....	35
1.2.3	Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissomo Gama (PPAR γ).....	37
1.3	POLIMORFISMOS.....	39
1.3.1	Polimorfismo Pro12Ala do Gene do Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissomo Gama.....	40
1.3.1.1	Polimorfismo Pro12Ala do Gene do Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissomo Gama na Obesidade.....	41
1.3.1.2	Polimorfismo Pro12Ala do Gene do Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissomo Gama na Resistência Insulínica e <i>Diabetes Mellitus</i> tipo 2.....	42
1.3.1.3	Polimorfismo Pro12Ala do Gene do Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissomo Gama e Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica.....	44
1.3.1.4	Polimorfismo Pro12Ala do Gene do Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissomo Gama e Dislipidemias.....	46
2	OBJETIVOS.....	48
3	PACIENTES E MÉTODOS.....	49
3.1	COLETA DE DADOS.....	49
3.2	POPULAÇÃO E AMOSTRA DO ESTUDO.....	49
3.3	PERÍODO E LOCAL DE COLETA DOS DADOS DO ESTUDO.....	49
3.4	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	50
3.5	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	50
3.6	VARIÁVEIS DO ESTUDO.....	50
3.6.1	Variável Dependente.....	50
3.6.1.1	Polimorfismo Pro12Ala do Gene do Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissomo Gama.....	50
3.6.2	Variáveis Independentes.....	51
3.6.2.1	Variáveis de Identificação.....	51
3.6.2.1.1	Idade.....	51

3.6.2.1.2	Sexo.....	51
3.6.2.2	Variáveis Antropométricas	51
3.6.2.2.1	Peso.....	51
3.6.2.2.2	Estatura.....	52
3.6.2.2.3	Perímetros.....	52
3.6.2.3	Variáveis Bioquímicas	53
3.6.2.2.2	Variável Hemodinâmica.....	53
3.7	EXTRAÇÃO DE DNA.....	54
3.8	GENOTIPAGEM POR PCR QUANTITATIVO.....	55
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	59
3.10	ASPECTOS ÉTICOS.....	60
4	RESULTADOS.....	61
5	DISCUSSÃO.....	66
6	CONCLUSÃO	69
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
ANEXO I	QUESTIONÁRIO.....	82
ANEXO I	APROVAÇÃO EM COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA EM SERES HUMANOS DA FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA.....	84
ANEXO I	APROVAÇÃO EM COMITÊ DE ÉTICA DA FUNDAÇÃO HEMOCENTRO - SECRETARIA DE SAÚDE DO DISTRITO FEDERAL.....	87
ANEXO I	ARTIGO SUBMETIDO.....	90
ANEXO I	COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO.....	108

PREFÁCIO

Ao longo das últimas décadas, os novos hábitos de vida relacionados aos avanços tecnológicos têm levado à diminuição da prática de atividades físicas comuns, o que, aliado a mudanças comportamentais e dietéticas, tem contribuído para uma desregulação do balanço energético e das vias metabólicas essenciais para o organismo humano. As alterações resultantes desse processo estão inseridas no contexto da chamada síndrome metabólica.

Esta síndrome é caracterizada como doença multifatorial e de complexa interação entre fatores fisiológicos, comportamentais, culturais e genéticos, que aumentam o risco de desenvolvimento de doenças crônicas como hipertensão arterial sistêmica, *diabetes mellitus* tipo 2, dislipidemia e, conseqüentemente, aumento do risco cardiovascular e de óbitos precoces (1).

Obesidade e *diabetes mellitus* têm sua prevalência em constante aumento não só no Brasil, mas em todo o mundo (2). Constituem graves problemas de saúde pública em consequência dos gastos crescentes não só para tratamento, mas também por suas sequelas e incapacidade laborativa.

Apesar dos conhecimentos atuais de que a adiposidade corporal e resistência insulínica têm papel relevante no desenvolvimento da síndrome metabólica, eles sozinhos não são suficientes para o surgimento da síndrome. Tanto é verdade que nem todos os indivíduos com obesidade e resistência à insulina desenvolvem síndrome metabólica. Nesse contexto, torna-se importante a investigação de fatores genéticos que possam estar envolvidos devido aos diferentes componentes e mecanismos patogênicos. Em parte, até o momento, os mecanismos genéticos ainda não foram esclarecidos em sua totalidade.

Nesta conjuntura, surgem os receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPARs), grupo de proteínas receptoras nucleares que funcionam como fatores de transcrição na regulação e expressão de genes que controlam a regulação do diversos processos metabólicos e celulares.

O PPAR gama (PPAR γ), subtipo dos PPARs, apesar de ser expresso em vários órgãos e tecidos, tem sua maior expressão no tecido adiposo, e está envolvido na adipogênese e lipogênese, além de ter impacto como um fator de transcrição de sensibilização à insulina, já que a deleção específica de PPAR γ em tecido adiposo e músculo provoca resistência insulínica. Outrossim, PPAR γ é

identificado como alvo de ação das tiazolidinedionas (ou glitazonas), drogas utilizadas para tratamento das alterações metabólicas dos carboidratos, por melhorar a ação da insulina.

Posto isso, são diversas as pesquisas genéticas que envolvem o estudo dos polimorfismos do gene PPAR γ , em especial do *rs1801282* (Pro12Ala), na suscetibilidade ao desenvolvimento da síndrome metabólica, em populações variadas.

Contudo, estes estudos têm proposto conclusões diversas. Alguns afirmam que a presença do polimorfismo conferiria um efeito protetor (3), outros indicam que seria um fator de maior susceptibilidade (4, 5), e existem ainda aqueles que assinalam como indiferentes (6-8).

Conhecer as bases genéticas da síndrome metabólica pode ser uma ferramenta para o desenvolvimento de alvos terapêuticos no tratamento dessa condição clínica tão relevante para a saúde na atualidade. O presente estudo tem como finalidade descrever a prevalência do polimorfismo Pro12Ala do gene PPAR γ em indivíduos sadios e em portadores de síndrome metabólica residentes em Brasília. Dessa forma, pretende-se contribuir para melhor esclarecimento do verdadeiro papel desse polimorfismo na gênese da síndrome, em especial na população brasileira, que não foi investigada nesse contexto, pelo menos para o nosso conhecimento.

1 INTRODUÇÃO

1.1 SÍNDROME METABÓLICA

1.1.1 Definição

A síndrome metabólica (SMet), tal qual conhecemos hoje, é caracterizada pela associação de alterações metabólicas interconectadas, que aumentam o risco de doenças cardiovasculares e de *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2) (1).

Em princípio, os componentes da SMet eram descritos e estudados de forma separada, apesar das suspeitas de que houvesse associação entre eles. Em 1988, Reaven propôs um modelo fisiopatológico (Síndrome X) associado ao risco de desenvolvimento de doença aterosclerótica que unificava as anormalidades do metabolismo da glicose, dos lipídeos e a hipertensão arterial sistêmica (HAS) com a resistência à insulina (RI), sendo esta o principal mecanismo para o desenvolvimento da então chamada síndrome X (9). A inclusão da obesidade no mecanismo patogênico da síndrome só foi reconhecida em período posterior (10), assim como a denominação passou a ser síndrome metabólica.

As características clínicas e bioquímicas da SMet, além das previamente citadas, incluem também a dislipidemia aterogênica: triglicerídeos (TGL) aumentados, diminuição da lipoproteína de alta densidade (HDL-c), o aumento da lipoproteína de baixa densidade (LDL-c), (HAS), elevação de marcadores pró-inflamatórios e pró-trombóticos, bem como aumento de marcadores antifibrinolíticos (11). Também está associada a uma variedade de outras condições como a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), síndrome de apneia obstrutiva do sono, síndrome dos ovários policísticos e de cálculos biliares de colesterol (12).

1.1.2 Critérios Diagnósticos

Mesmo existindo um conceito complexo pré-estabelecido, não existe um método claramente consolidado ou um padrão ouro para o diagnóstico da SMet em adultos, acarretando, por muitas vezes, confusão e ausência de comparabilidade entre estudos.

Em virtude de sua relevância clínica e com o objetivo de identificar indivíduos que pudessem ser beneficiados por medidas preventivas e propedêuticas ao longo das últimas décadas, várias organizações e entidades científicas como a Organização Mundial de Saúde (OMS), o *European Group for de Study of Insulin Resistance* (EGIR), a *International Diabetes Federation* (IDF), o *National Cholesterol Education Program Third Adult Treatment Panel* (NCEP-ATPIII), a *American Association of Clinical Endocrinologists* (AACE), enfrentaram o desafio de criar definição com componentes, métodos e pontos de corte que deveriam ser utilizados em cada uma das anormalidades para análise da SMet.

Em 1998, a OMS foi a primeira entidade a propor achados clínicos e laboratoriais para a definição da SMet. Apesar de sua pouca aplicabilidade clínica, a RI foi considerada como componente essencial para determinação do diagnóstico, mediante o clamp euglicêmico hiperinsulinêmico (ponto de corte é o primeiro quartil da população em estudo) associada a, no mínimo, dois outros fatores de risco adicionais: obesidade, dislipidemia, HAS e microalbuminúria (13). Em 1999, houve revisão dessa definição em virtude dos novos critérios diagnósticos de HAS que foram adotados pela OMS.

Nesse mesmo ano, o EGIR modificou os critérios estabelecidos pela OMS. Contudo, assegurou a RI como pré-requisito absoluto pela dosagem da insulinemia de jejum (ponto de corte é o quarto percentil da população em estudo) associado a mais dois critérios adicionais previamente descritos. Neste consenso, o critério para obesidade era dado pela circunferência abdominal (CA), de forma contrária ao da OMS, que estabelecia a relação abdome/quadril (RCQ) ou utilização do IMC. A microalbuminúria foi excluída nesta classificação (14).

Diferentemente destas duas publicações, o NCEP/ATP-III, em 2001, desenvolveu uma definição sindrômica que não exigia a comprovação de RI, facilitando sua utilização na prática clínica. Neste molde, para o diagnóstico da

SMet, deveria ser levada em consideração a presença de 3 ou mais dos seguintes fatores de risco: hipertrigliceridemia, HDL- c baixo, HAS, hiperglicemia de jejum e obesidade abdominal (15). Em 2005, essa definição foi revisada para adotar novos parâmetros para a hiperglicemia como glicemia de jejum ≥ 100 mg/dl.

Dois anos depois, a AACE retomou a RI como o fator principal da síndrome. Esse grupo reinstituía a importância das variáveis laboratoriais, além da HAS e obesidade, sem estabelecer quantidade de fatores presentes para o diagnóstico. Os pacientes diabéticos foram novamente excluídos assim como havia sido feito pelo EGIR. A essa avaliação foram somadas a presença de síndrome de ovários policísticos, hiperuricemia, história familiar de DM2 ou cardiopatia (16).

Em 2005, a IDF, diante das evidências da relação entre obesidade e aumento do risco cardiovascular, propôs uma nova definição de SMet valorizando a obesidade abdominal, através da CA, adaptada ao perfil antropométrico das populações dos diferentes continentes, como fator imprescindível para a análise associada a dois outros fatores do NCEP/ATP-III (17, 18).

Diante destes conflitos diagnósticos, deu-se origem a um consenso, o *Joint Interim Statement* - (JIS), em 2009, com o aval de várias sociedades, para a definição global da SMet, onde se decidiu pela não obrigatoriedade de qualquer componente, e sim, a presença de pelo menos três componentes alterados de um total de cinco, mais a medida da circunferência abdominal de acordo com as diferentes etnias (19).

As tabelas a seguir permitem a comparação dos critérios publicados em cada uma destas instituições:

Tabela 1 - Classificação da síndrome metabólica em adultos de acordo com os critérios da OMS, EGIR, NCEP/ATP- III, AACE e IDF

Critérios/ componente	OMS (1999) modificada	EGIR 1999	NCEP - ATP III 2005	AACE 2003	IDF 2005
Exigido	Resistência à insulina: DM2, TDG, GJA Glicemia de jejum >110 HOMA no topo do percentil 25	Resistência insulínica ou hiperinsulinemia de jejum no topo do percentil 25		Alto risco de resistência insulínica ou IMC > 25 ou CA ≥ 102 cm (homens) ou ≥ 88 cm (mulheres)	Obesidade central definida por etnia (se IMC ≥ 30 Kg/m ² assume-se a obesidade central e CC não precisa ser medida) *
Número de anormalidades	≥ 2 de	≥ 2 de	≥ 3 de	≥ 2 de	≥ 2 de
Metabolismo glicêmico		Glicose de jejum ≥110 mg/dl	Glicemia de jejum ≥100 mg/dl	110 -125 mg/dl	Glicemia de jejum ≥100 mg/dl ou diagnóstico prévio de DM2
Definição de adiposidade	RCQ > 0,9 em homens e > 0,85 em mulheres e/ou IMC > 30 kg/m ²	CA ≥ 94 (homens) ou ≥ 80 cm (mulheres)	CA ≥ 102 cm (homens) ou ≥ 88 cm (mulheres)		Definida por etnia *
Coolesterol HDL- c (mg/dl)	< 35 (homens) ou < 39 (mulheres)	< 40 ou tratamento de dislipidemia	< 40 (homens) < 50 (mulheres)	< 40 (homens) ou < 50 (mulheres) I	< 40 (homens) < 50 (mulheres) ou uso de drogas para essa anormalidade lipídica
Triglicerídeos	TGL ≥150 mg/dl	TGL ≥180 mg/dl	TGL ≥150 mg/dl	TGL ≥150 mg/d	TGL ≥150 mg/dl ou uso de drogas para essa anormalidade lipídica
Hipertensão arterial (mmHg)	PA ≥140/ 90 mmHg ou em tratamento	PA ≥140/ 90 mmHg ou em tratamento anti-hipertensivo	PA ≥ 130/85 mmHg	PA ≥ 130/85 mmHg	PA ≥ 140/90 mmHg ou em tratamento anti-hipertensivo ou diagnóstico prévio de HAS
Microalbuminúria	≥ 20g/min ou				
Albumina / Creatinina	≥ 30 mg/g				

Legenda - OMS: Organização Mundial da Saúde, EGIR: Group for the Study of Insulin Resistance, NCEP - ATP III: National Cholesterol Education Program - Adult Treatment Panel III, AACE: American Association of Clinical Endocrinologists, IDF: International Diabetes Federation.

TDG: tolerância diminuída à glicose, GJA: glicemia de jejum alterada, DM: diabetes mellitus, CA: circunferência abdominal, HDL-c: lipoproteína de alta densidade, IMC: índice de massa corpórea, PA: pressão arterial, TGL: triglicerídeos, HOMA: homeostasis model assessment.

*Europeus: ≥ 94 cm para homens e ≥ 80 cm para mulheres. Americanos: ≥ 102 cm para homens e ≥ 88 cm para mulheres. Sul-asiáticos: 90 cm para homens e ≥ 80 cm para mulheres. Chineses: ≥ 90 cm para homens e ≥ 80 cm para mulheres. Japoneses: ≥ 90 cm para Homens e ≥ 80 cm para mulheres. Sul-americanos e centro-americanos: usar ponto de corte para sul-asiáticos. Africanos: usar ponto de corte dos europeus ate que dados específicos estejam disponíveis; População mediterrânea e árabe: usar ponto de corte dos europeus ate que dados específicos estejam disponíveis.

Tabela 2 - Critérios para o diagnóstico clínico da síndrome metabólica segundo o Joint Interim Statement

Medida	Pontos de corte categóricos
Aumento da CA	*Definições específicas para população - país
TGL elevados (tratamento específico é um indicador alternativo)	≥150 mg/dL
HDL – c diminuído (tratamento específico é um indicador alternativo)	<40 mg/dL em homens; <50 mg/dL em mulheres.
Pressão arterial elevada (tratamento específico é um indicador alternativo)	PAS ≥130 and/or PAD ≥85 mm Hg
Glicemia de jejum elevada (tratamento específico é um indicador alternativo)	≥100 mg/dL

Legenda: CA: circunferência abdominal; TGL: triglicerídeos; HDL-c: lipoproteína de alta densidade; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica, IDF: International Diabetes Federation; AHA/ NHLBI: National Heart, Lung and Blood Institute / American Heart Association.

** Recomenda-se que os pontos de corte da IDF sejam utilizados para não europeus e os pontos de corte da IDF ou da AHA / NHLBI utilizados para pessoas de origem europeia até que mais dados estão disponíveis (CA ≥94 cm em homens e ≥80 cm em mulheres).*

A maioria dos pacientes com diabetes mellitus tipo 2 terão a síndrome metabólica pelos critérios propostos.

Fonte:

1.1.3 Prevalência

A SMet está aumentando em prevalência em todo o mundo. Entretanto, este dado é variável nos diferentes estudos desenvolvidos, em razão das diferenças na composição das populações estudadas (sexo, idade, raça e etnia) e nos critérios diagnósticos utilizados baseados nas diferentes instituições de saúde (20).

De acordo com os dados do National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES 1999 - 2010), nos Estados Unidos da América, a prevalência da SMet estimada em adultos diminuiu de 25,5% em 1999/2000 para 22,9% em 2009/2010

(21). Contudo, apresenta taxas mais elevadas entre os grupos étnicos / raciais minoritários (22).

Calcula-se que aproximadamente um quarto da população adulta europeia seja acometida pela SMet. Também pode ser considerada uma epidemia emergente nos países asiáticos, incluindo a Índia, China, Japão e Coreia (1).

Estudo realizado em populações de países latino-americanos observou uma prevalência geral de 24,9 com intervalo variável entre 18,8 e 43,3% (23). No Brasil, análise sistemática recente estabeleceu uma prevalência geral em torno de 29,6%, variando de 14,9% em uma área rural e 65,3% em uma população indígena (24).

1.1.4 Patogênese

Os mecanismos fisiopatológicos para o desenvolvimento da SMet ainda não foram elucidados completamente, e sabe-se que são multifatoriais.

No foco central das pesquisas etiopatogênicas estão a RI e obesidade. Todavia, a relação causal entre o excesso de adiposidade visceral e RI, ainda não está esclarecida, pois existem questionamentos sobre quem seria causa, ou consequência, das anormalidades que compõem os efeitos inflamatórios e pró-trombóticos relacionados à síndrome (25). Fatores genéticos, ambientais, desregulação do Sistema Hipotálamo-Hipofisário-Adrenal (HHA) e do Sistema Nervoso Autônomo (SNA), exacerbação das atividades do Sistema Renina-Angiotensina- Aldosterona (SRAA) e aumento no estresse oxidativo celular também podem ser envolvidos na patogênese (11).

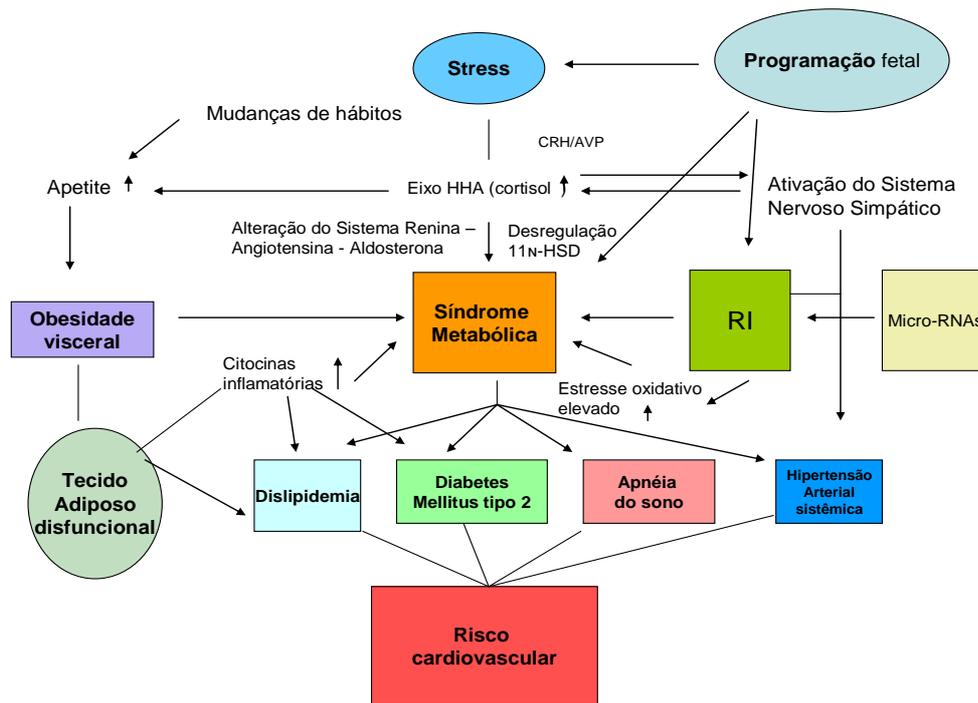


Figura: Imagem esquemática das condições implicadas na fisiopatologia da síndrome metabólica e suas potenciais interações.

CRH/AVP: Hormônio corticotrófico / Vasopressina
(Adaptado. Kassi et al, 2011)

1.1.4.1 Obesidade

A obesidade é uma doença crônica e multifatorial que se desenvolve pela interação entre genótipo e ambiente. Neste sentido, existe a integração de fatores sociais, comportamentais, culturais, econômicos e genéticos (26).

A definição mais comumente aceita é a adotada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) que a caracterizou como um estado de acúmulo excessivo de reservas lipídicas, ocasionado por uma desregulação no balanço energético e que tem por base o Índice de Massa Corpórea (IMC), calculado por meio da divisão do peso (em Kg) pela altura² (em m²) (27).

Apesar de apresentar limitações, como o fato de não distinguir variáveis (sexo, idade, etnia e distribuição da gordura corporal), o IMC é considerado método simples e facilmente utilizável para classificação da obesidade e seus riscos de

comorbidades com gravidade crescente. A obesidade em adultos foi definida como IMC maior ou igual a 30 (27).

Tabela 3 - Índice de massa corporal (IMC) (kg/m²) e classificação da obesidade

IMC	Classificação
<18.5	Muito magro
18.5 a 24.9	Normal
25.0 a 29.9	Sobrepeso
30.0 a 34.9	Obeso grau I
35.0 a 39.9	Obeso grau II
>40	Obeso grau III

Fonte: OMS – Organização Mundial de Saúde.

A obesidade ocasiona distúrbios múltiplos no tecido adiposo (TA). Provoca alterações na sua distribuição, na atividade endócrina (autócrina, parácrina e sistêmica), no armazenamento de lipídeos, e na composição das populações de células imunitárias nele residentes (28).

Dessa forma, o TA está interligado com o aumento do risco de várias comorbidades como RI, DM2, DHGNA, HAS, dislipidemia, aterosclerose, doença cardíaca, acidente vascular cerebral e morte precoce (29).

1.1.4.1.1 *Tecido Adiposo*

O TA é o principal reservatório energético do organismo. Contém matriz de tecido conjuntivo, tecido nervoso, células vasculares, células imunitárias e os adipócitos (30). Estes são células especializadas no armazenamento de lipídios no citoplasma na forma de triacilglicerol (TAG), sem que haja danos para a sua integridade funcional. Os adipócitos possuem todo o aparato necessário (enzimas e proteínas reguladoras) para síntese de ácidos graxos (AG) (lipogênese), estoque de TAG em períodos de oferta energética abundante e mobilização por lipólise quando há déficit calórico (31).

Inicialmente negligenciado por ser considerado um reservatório passivo para o armazenamento de energia, o tecido adiposo (TA) não é mais detentor desta visão tradicional (32). Além da função primária de armazenar nutrientes, atualmente, o TA deve ser caracterizado como um autêntico e dinâmico órgão metabólico, imunológico e com vasto potencial inflamatório (33). Igualmente, participa do controle da homeostase, PA e atua em outros órgãos à distância como ossos, tireoide e órgãos reprodutores (34).

O TA é um órgão heterogêneo. Sua capacidade de armazenamento lipídico assim como a sua função endócrina depende de sua localização e da morfologia do adipócito (35).

Existe sob duas formas gerais: branco (TAB) e marrom (TAM). Ambos com diferenças morfológicas, histológicas e com funções distintas. O primeiro, mais comum em adultos, contém adipócitos caracterizados por uma única e grande gota lipídica e que serve principalmente para o armazenamento de energia. O segundo é multilocular, contém menos lipídios, é particularmente rico em mitocôndrias, e por isso, especializado em dissipar a energia química sob a forma de calor agindo contra a hipotermia e contra a obesidade. Todavia, em seres humanos adultos a gordura marrom é muito escassa e, provavelmente, não funcional (36).

Estudos radiológicos demonstraram que o TAB pode ser dividido em duas categorias com diversos depósitos no organismo: subcutâneo (TAS) e visceral (TAV). Aquela é representado principalmente pelos depósitos abaixo da pele nas regiões abdominal, glútea e femoral enquanto o segundo encontra-se depositado próximo ou mesmo no interior das vísceras da cavidade abdominal, caracterizados como gorduras mesentérica, omental e retroperitoneal (37).

O TA de indivíduos saudáveis libera adipocitocinas moduladoras do processo inflamatório, como o fator de crescimento transformador beta (TGF- β), interleucinas 4, 10 e 13 (IL-4 , IL-10 , IL-13), antagonista de receptor de IL-1 (IL-1RA), apelina e adiponectina (38).

A alteração na expressão ou na atividade de adiponectina pode ser um fator no desenvolvimento da Síndrome Metabólica. A adiponectina é expressa e segregada pelos adipócitos em níveis elevados e tem funções na homeostase de glicose e de lipídeos. A adiponectina tem sido fortemente correlacionada com o aumento do risco cardiometabólico, já que a diminuição de suas concentrações está

associadas a aumento do IMC, RI, dislipidemia, HAS, disfunção endotelial e aumento dos níveis de proteína C reativa e fibrinogênio (39).

1.1.4.1.2 *Tecido Adiposo Disfuncional*

O excesso de acúmulo intra-abdominal do TAV, frequentemente denominado de obesidade visceral, representa o aspecto principal da síndrome metabólica (1).

O tamanho dos adipócitos é um determinante crítico da função do TA, independentemente dos níveis relacionados à obesidade. O TA pode se expandir pelo aumento do volume dos adipócitos preexistentes (hipertrofia adiposa), pela geração de novos pequenos adipócitos (hiperplasia), ou por ambos os meios. Indivíduos obesos com um pequeno número de grandes adipócitos ocasionados pela hipertrofia adiposa são mais intolerantes à glicose e têm mais hiperinsulinemia que os que possuem o mesmo grau de obesidade, porém com predomínio de células de gordura pequenas (40).

A liberação de AG circulantes não esterificados pelo TAV pode ser ocasionada pela hipertrofia dos adipócitos viscerais, aumento da resposta lipolítica e inibição da ação da insulina (41).

Em indivíduos magros, a principal fonte de AG circulantes não esterificados provém do TA subcutâneo o qual contribui com mais de 85 % da liberação sistêmica dos mesmos. O restante se origina da lipólise do TAV (42). Contudo, em indivíduos obesos temos uma inversão neste papel. O aumento da massa de gordura visceral no TAV, que tem a sua drenagem dirigida basicamente para o sistema venoso portal, pode contribuir com cerca de 50 % da liberação de AG culminando em alterações hepáticas (43).

A hipertrofia dos adipócitos tem um papel de destaque no desenvolvimento de um ambiente de inflamação crônica de baixo grau, causada não apenas por secreção de adipocinas pelos adipócitos ou pré adipócitos, mas também por migração de macrófagos que invadem o TA, contribuindo para um perfil de maior risco cardiometabólico em indivíduos com obesidade visceral (44).

O TA disfuncional, em indivíduos obesos, secreta principalmente citocinas pró-inflamatórias de grande importância como o fator de necrose tumoral α (TNF α),

interleucina 6 (IL-6), leptina, visfatina, resistina, angiotensina II (Ang II) e inibidor do ativador do plasminogênio 1 (PAI-1) (38).

A leptina tem sua secreção regulada de forma proporcional ao tamanho das reservas de tecido adiposo. Receptores de leptina estão localizados principalmente no hipotálamo e no tronco cerebral onde os sinais recebidos por estes controlam a saciedade, o gasto de energia e função neuroendócrina. A maioria dos indivíduos com sobrepeso e obesidade tem níveis elevados de leptina devido resistência com consequente inadequação da supressão do apetite (39, 45).

A IL-6 tem a sua expressão e concentração positivamente correlacionada com a obesidade, intolerância à glicose e RI. Concentrações plasmáticas de IL-6 preveem o desenvolvimento de DM2. Ela diminui a sinalização da insulina nos tecidos periféricos através da diminuição da expressão de sinalização nos componentes dos receptores de insulina (39, 45). A IL-6 foi revelada como um fator importante para o estado inflamatório crônico e resistência hepática à insulina na obesidade (32, 39).

TNF α , que apresenta as mesmas associações patológicas do IL-6, também tem sido implicado no desenvolvimento da obesidade e RI. Níveis elevados prejudicam a sinalização da insulina, aumentando os níveis de AG não esterificados no soro (32, 39).

O PAI-1 é uma proteína reguladora na cascata da coagulação, e níveis elevados dele são encontrados em obesos. É um conhecido fator de risco para a trombose, uma vez que diminui a geração de plasmina e, assim, diminui a fibrinólise. Altos níveis de PAI-1, juntamente com o aumento induzido pela obesidade de fatores de coagulação e ativação plaquetária criam um estado de hipercoagulabilidade, aterogênese e aumento do risco cardiovascular. PAI-1 também tem sido implicado na acumulação de gordura visceral (32).

Assim como o TNF α e a IL-6, a resistina é uma proteína com propriedades pró-inflamatórias secretada por monócitos e adipócitos. Apesar de expressa e secretada em indivíduos magros, seus níveis estão comumente mais elevados na obesidade (39).

1.1.4.2 Resistência Insulínica

A insulina é um potente hormônio anabólico que exerce função primordial no metabolismo da glicose. Mas também tem efeitos sobre o metabolismo de lipídeos, de proteínas, transporte de aminoácidos, atua na proliferação e diferenciação celular e síntese de óxido nítrico (46).

A RI geralmente é causada por um defeito nos órgãos-alvo ou tecidos de atuação deste hormônio resultando em hiperinsulinemia compensatória para manutenção das ações biológicas da mesma (47). Alterações em pré-receptores, receptores e pós-receptores nos tecidos alvo são os possíveis mecanismos relacionados à RI (46).

A via que envolve a fosforilação do substrato receptor da insulina (IRS) 1 e 2 e ativação da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3) é a via essencial para os efeitos metabólicos da insulina. Disfunção sistêmica nesta via, definidora da RI, provoca defeitos tanto na captação de glicose quanto na vasodilatação dependente do endotélio (46).

Em condições normais, a ligação da insulina com seu receptor, é ponto crítico para a captação de glicose nos tecidos-alvos a ela dependentes, como o músculo esquelético, coração e TA. Ademais, nas células endoteliais, ocorre estímulo para produção de óxido nítrico, que tem efeito vasodilatador e antiaterogênico, e diminuição da expressão de moléculas de adesão, protegendo-as da interação excessiva com monócitos circulantes (46).

Uma segunda via é a que envolve a ativação de proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK). Esta via não transmite a ação metabólica da insulina, mas contribui para os seus efeitos proliferativos, potencializando a migração celular e as respostas pró-inflamatórias e pró-trombóticas. Esta via não é atingida na existência de RI. Entretanto, é ativada pela hiperinsulinemia compensatória. Excesso na estimulação desta via parece ser a origem de mecanismos pró-aterogênicos (46).

Evidências mostram que a obesidade visceral está associada com um estado de RI, e que isto aumenta o risco de desenvolvimento de DM2. *Tchernof et al* apontam três cenários para explicar como o excesso de adiposidade visceral pode ser ligada a complicações metabólicas relacionadas à glicose (48).

O primeiro modelo incide sobre o perfil metabólico peculiar entre adipócitos viscerais contra os subcutâneos. Os primeiros hiperlipolíticos e resistentes ao efeito

antilipolítico da insulina levariam à exposição excessiva de AG não esterificados para o fígado com prejuízos para o metabolismo do mesmo. Com isso haveria uma superprodução de lipoproteínas contendo apolipoproteína B, aumento da produção de glicose hepática, e redução na degradação hepática de insulina com exacerbação da hiperinsulinemia sistêmica (48).

Outra possibilidade estaria relacionada ao perfil inflamatório de TA visceral hipertrofiado, já exemplificado em tópico anterior, no qual seria infiltrado por macrófagos inflamatórios, e estes contribuiriam para a geração de um perfil global pró-inflamatório, exacerbando ainda mais a RI (48).

Por fim, estes autores sugerem que o excesso de adiposidade visceral pode ser uma consequência da incapacidade relativa do TA subcutâneo em atuar como um grande tampão metabólico, protegendo outros órgãos contra a deposição de gordura ectópica, não só no fígado, o coração e o músculo esquelético, mas também em outros órgãos, potencialmente importantes, tais como o rim e o pâncreas (48).

1.1.4.3 Estresse Crônico: Disregulação do Eixo Hipotálamo – Hipofisário e Sistema Nervoso Autônomo

Os glicocorticoides (GC) são hormônios esteroides secretados pelo córtex da glândula adrenal, sob a regulação do eixo HAA, que exercem um papel crucial na homeostase energética e na resposta ao estresse (49). Os efeitos dos GC ocorrem através da ligação desses hormônios a receptores nucleares, amplamente distribuídos nos diversos órgãos e tecidos e incluem, além da modulação do crescimento e desenvolvimento celular, a regulação da PA e do balanço hídrico, e o controle da função imunológica e do metabolismo celular (50).

Em curto prazo, os GC exercem efeito catabólico, aumentando a disponibilidade de substratos para a oxidação mitocondrial (glicose, AG e aminoácidos). Esses efeitos agudos dos GC são essenciais para as respostas adaptativas do organismo (51). Cronicamente, no entanto, o excesso de GC circulantes resulta em efeitos deletérios. A Síndrome de Cushing, estado clínico resultante da hipercortisolemia crônica, está associada à morbimortalidade elevada,

em consequência do desenvolvimento de obesidade, osteoporose, HAS, hiperglicemia, dislipidemia e deficiência na resposta imunológica a infecções (52).

O efeito deletério da hipercortisolemia sobre o metabolismo glicídico e lipídico, associado à HAS, RI e hipercoagulabilidade determinam o elevado risco cardiovascular desses pacientes (52). No hipercortisolismo, as alterações no metabolismo lipídico decorrem da combinação entre os efeitos diretos e a contribuição da chamada síndrome metabólica (53). Observa-se aumento dos níveis séricos de VLDL- c e LDL- c, com conseqüente elevação dos TGL e do colesterol total circulantes. Essas alterações são revertidas ou melhoradas com a correção do hipercortisolismo (53). Entretanto, os dados da literatura são conflitantes em relação às possíveis alterações nos níveis séricos de HDL-c. Alguns estudos mostram redução do HDL- c nesses pacientes, similar ao observado na síndrome metabólica (53), porém numa série de 49 pacientes com hipercortisolismo, os níveis de HDL- c circulantes não estavam reduzidos (54).

Estudos indicam que a enzima 11 β -hidroxisteróide desidrogenase tipo 1 (11 β HSD1) seja a responsável pela conversão de cortisona em cortisol e tenha sua atividade mais acentuada no TAV (55).

Os efeitos dos GC sobre o metabolismo lipídico no TA são controversos, e podem envolver tanto lipogênese quanto lipólise. Esses hormônios induzem lipólise nos estoques de gordura periférico enquanto, paralelamente, promovem a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos na gordura central abdominal. Recentemente, foi demonstrado em ratos que a indução de lipólise, mediada pela lipoproteína lipase, com liberação de AG e glicerol para a circulação, é mediada pela via de sinalização do AMP cíclico/proteína quinase A (56). Em adipócitos humanos, após estímulo com dexametasona (um glicocorticoide sintético), observou-se uma maior ativação da lipoproteína lipase no TA omental de mulheres, em comparação com o de homens, sugerindo diferenças entre os sexos na resposta tecidual ao estímulo por GCL (57).

Os efeitos diretos do hipercortisolismo sobre o metabolismo dos AG sobre o fígado ainda são pouco conhecidos. No excesso crônico de GC circulantes, a atividade e expressão aumentadas das lipases lipoproteicas, aliada a um efeito permissivo sobre a mobilização de lipídeos por ação das catecolaminas e ao aumento da atividade adipogênica na gordura visceral, predispõem a uma maior liberação de AG livres na circulação porta. Acredita-se que, no fígado, esse maior

aporte de AG livres estimularia a gliconeogênese e induziria a RI, por alteração na sinalização da insulina. O aumento dos estoques de TGL, relacionado a uma maior liberação de VLDL-c, aliado à inibição da oxidação de AG livres e ao aumento da atividade da enzima proteíno-quinase ativada por AMP, pode predispor ao surgimento da DHGNA (51, 58).

1.1.4.4 Estresse Celular Oxidativo: Sistema Renina – Angiotensina – Aldosterona

O SRAA, responsável pela modulação do equilíbrio hidroeletrolítico, volemia e regulação da PA, é um sistema neuroendócrino complexo formado por substâncias semelhantes a hormônios que são liberados pelos rins e glândulas adrenais. Os principais elementos da cascata englobam a renina, o angiotensinogênio, a angiotensina I (Ang I), a enzima conversora de angiotensina (ECA) e a Ang II (59, 60).

A substância mais potente deste sistema é a Ang II, cujos efeitos vasoconstrictores se dão pela ligação da mesma aos receptores tipo I (AT1-R), elevando a PA além de aumentar a secreção de aldosterona que contribuiu com a manutenção da homeostase volêmica pela regulação de reabsorção de água e sódio (60).

Aumento da produção de espécies reativas de oxigênio em vários tecidos, incluindo o músculo esquelético e tecidos cardiovasculares, tem sido associada com a ativação do SRAA. Quando ativado de forma crônica e desregulado este sistema induz perpetuação de uma cascata pró-inflamatória, pró-trombótica e aterogênica, que está na base da lesão de vários órgãos-alvo (coração, cérebro, rim, endotélio) (61).

A Ang II é capaz de interferir com toda a sinalização intracelular dos receptores de insulina das células do músculo esquelético, ao impedir a deslocação dos receptores de glicose, por meio de indução de oxidação da NADPH, constituindo, portanto, uma das bases fisiopatológicas da RI (62).

1.2 RECEPTORES ATIVADOS POR PROLIFERADORES DE PEROXISSOMO (PPARs)

A existência de receptores ativados por proliferadores de peroxissomo (PPARs) foi constatada, inicialmente, em 1990, por Isseman e Green, quando descreveram a primeira clonagem de um subtipo denominado PPAR α , em pesquisa que tinha como alvo compostos xenobióticos que induziam a proliferação de peroxissomos hepáticos em roedores (63).

Os PPARs são fatores de transcrição nucleares ativados por ligantes e pertencentes à superfamília de receptores hormonais nucleares, como aqueles para os hormônios tireoidianos, retinoides, esteroides e vitamina D (64).

A família dos PPARs compreende três isoformas: PPAR α , PPAR β/δ e PPAR γ . Diferem uns dos outros em termos de suas distribuições de tecido, especificidades com ligante e funções fisiológicas. Cada um deles suprime ou ativa genes diferentes apenas com sobreposição parcial em sua atividade (65).

PPAR α tem a sua expressão mais abundante em tecidos caracterizados por uma elevada taxa de oxidação de AG, tais como o fígado, coração e músculo esquelético (66). Também é detectado nos rins, adrenal, TA, células endoteliais, musculares lisas e macrófagos (67).

PPAR β/δ é encontrado nos tecidos previamente descritos, bem como em rins, TA, cérebro, cólon e tecido vascular (68).

O PPAR γ é altamente expresso no TA (69), mas também pode ser encontrado em músculo esquelético, fígado, células β pancreáticas, coração, cólon, placenta, tecido vascular e em sistemas imunitários (70).

As vias reguladoras dos PPARs desempenham um papel crítico na regulação de diversos processos biológicos, já que modulam a expressão de uma variedade de genes-alvo envolvidos em diversos processos metabólicos e celulares: adipogênese e lipogênese, sensibilidade à insulina, balanço energético, processos inflamatórios, angiogênese e aterosclerose (12). Portanto, têm sido relacionados como elos na gênese de doenças crônicas e alvos de medicamentos no tratamento da obesidade, hiperlipidemia, DM2 e doenças cardiovasculares (71).

1.2.1 Estrutura

Como os demais receptores nucleares, todas as três isoformas de PPARs têm uma organização estrutural comum composta por cinco ou seis regiões estruturais dentre as quais quatro domínios funcionais: a região amino-terminal (domínio A/B ou domínio de transativação independente de ligante), a região de ligação ao DNA (DBD ou domínio C), a região de dobradiça (hinge, ou domínio D), a região carboxi-terminal (domínio de ligação ao ligante (LBD) ou domínio E) e, em alguns receptores nucleares, o domínio F, variável e com função ainda não estabelecida (72).

O domínio A/B contém a função de ativação (AF) -1 que é um alvo de fosforilação por quinases. O domínio C promove a ligação do receptor a uma sequência de DNA nos elementos responsivos dos PPARs (PPREs). A região de dobradiça ou domínio D atua como um local de encaixe para cofatores. O domínio E é responsável pela especificidade do ligante (71).

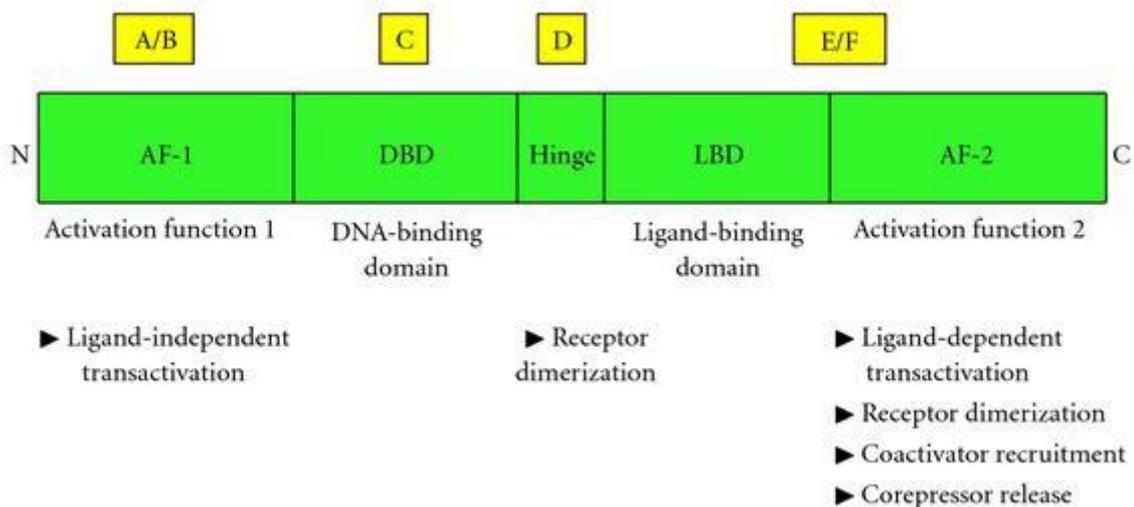


Figura 2 - Estrutura esquemática dos domínios funcionais de receptores nucleares. Os domínios de ativação AF-1 e AF-2 estão localizadas nas regiões N-terminal e C-terminal, respectivamente. O domínio C é um domínio de ligação ao DNA altamente conservado. O domínio D é uma região altamente flexível. Domínio E é responsável pela ligação ao ligante e conversão dos receptores nucleares em suas formas ativas que se ligam ao DNA. (MICHUNG YOON, 2010).

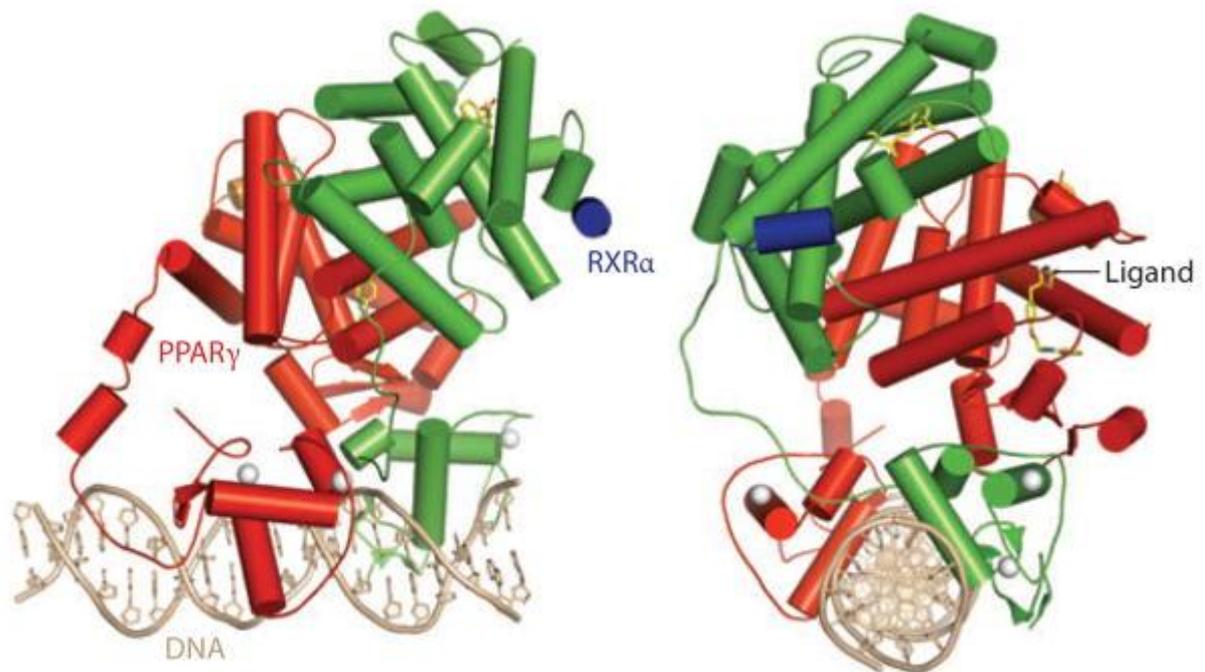


Figura 3 - Panorâmica tridimensional das estruturas intactas do heterodímero PPAR γ -RXR α . O PPAR está em vermelho, RXR α em azul, o DNA em cobre, coativadores em azul e laranja, e os ligantes em amarelo (HUANG et al, 2010).

1.2.2 Mecanismo de Ação

Os efeitos regulatórios dos PPARs na transcrição gênica podem ocorrer por três mecanismos diferentes: transativação dependente do ligante (modelo tradicional), repressão independente do ligante e transrepressão dependente do ligante (73, 74).

Sem a presença de ligantes e associados conjuntamente a proteínas correpressoras como as desacetilases de histona (HDAC), mediadores de silenciamento de RXR e TR ((SMRT) e de correpressores de receptores nucleares (NCoR)), ocorre o que se chama de repressão basal. Tais proteínas mantêm a cromatina em forma enovelada original, impedindo o recrutamento da maquinaria de transcrição. Entretanto, uma vez ativados por ligantes, sejam endógenos ou sintéticos, ocorre desagregação dos correpressores e associação com coativadores como a acetilase de histonas, ocasionando novas mudanças de conformação da cromatina e início da transcrição gênica (75, 76).

Na via de transativação, a transcrição gênica ocorre quando os PPARs se acoplam a um fator proteico adicional, denominado receptor do ácido 9-cis retinóico (RXR), culminando na formação de um heterodímero. Este novo complexo fará a ligação em sequências específicas do DNA localizadas nas regiões promotoras ou reguladoras dos genes alvos, conhecidas como elementos responsivos ao PPAR (PPREs), alterando a dinâmica de coativadores / corepressores que modulam a maquinaria de transcrição (regulação positiva ou a regulação negativa) de RNAs genes-alvo (75, 76).

Este processo também pode ser afetado pela via de transrepressão. Os PPAR, neste exemplo, podem reprimir a transcrição gênica ao interferirem com o fator nuclear Kappa-B (NF-Kb) e proteína ativadora (AP-1), provavelmente por meio de interações proteína-proteína que dão lugar à formação de complexos inativos. Esta atividade repressora constituiu um dos mecanismos pelos quais os PPAR exercem seus efeitos anti-inflamatórios (73, 74). Na repressão independente do ligante, o complexo PPAR-RXR, ao ligar-se com o elemento responsivo em seus referidos genes-alvo, recruta complexos corepressores mediando a repressão ativa de genes (73, 74).

Vários compostos naturais têm se mostrado capazes de ativar estes receptores, incluindo uma variedade de AG poli-insaturados (ácido linoleico e ácido araquidônico) e eicosanoides (derivados da prostaglandina J2). Atualmente, contudo, ligantes sintéticos (por exemplo, glitazonas e agonistas de tirosina) continuam sendo os mais potentes ativadores conhecidos de PPAR γ (77).

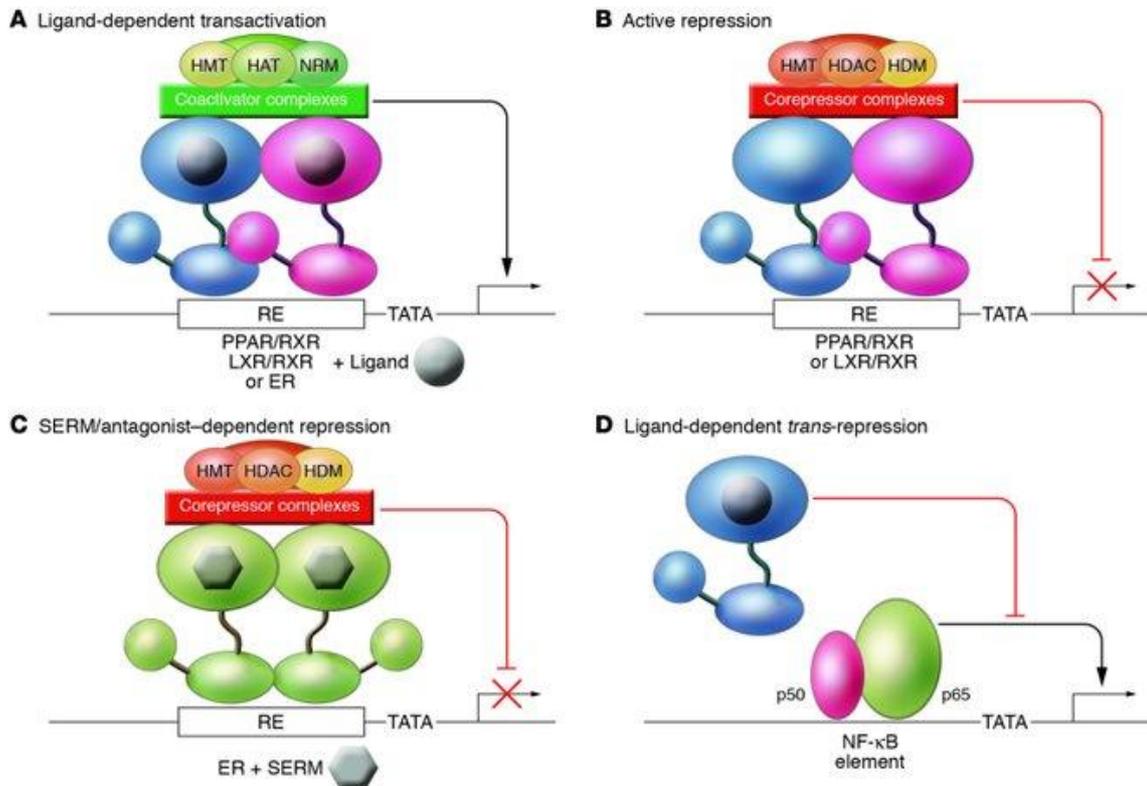


Figura 4 - Regulação positiva da transcrição gênica, ou transativação dependente do ligante e mecanismos de regulação negativa da expressão gênica pelos PPARs. (A) transativação dependente do ligante; (B) repressão ativa; (C) Repressão transcricional ativa na ausência do ligante; (D) Transrepressão dependente ligante (Glass et al, 2006).

1.2.3 Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissomo Gama (PPAR γ)

PPAR γ é expresso em quatro formas isoméricas: PPAR γ 1, γ 2, γ 3 e γ 4. As proteínas produzidas a partir de PPAR γ 1 e γ 3 são idênticas, enquanto que a proteína PPAR γ 2 contém uma região amino-terminal adicional composta de 30 aminoácidos. PPAR γ 1 é expressa no TAM E TAB, mas também pode ser detectada no tecido músculo esquelético, fígado, células pancreáticas β , coração, cólon, placenta e em células do sistema imunológico e vascular. Em condições fisiológicas normais, a expressão da isoforma PPAR γ 2 é abundante e restrita apenas ao TA, podendo ser ectopicamente induzida no fígado e no músculo esquelético em resposta ao excesso de ingestão de calorias ou na obesidade genética. A forma

menos estudada é a da isoforma PPAR γ 4, expressa em macrófagos e também no TA (12, 78).

Desde a sua identificação e caracterização, ocorrida na década de noventa, o PPAR γ , com o passar de anos, emergiu e se consolidou como um importante regulador da adipogênese por desempenhar um papel chave no controle da glicose sistêmica e na homeostase dos lipídeos e na regulação da transcrição de genes envolvidos nesses processos metabólicos (79).

A deleção específica de PPAR γ em TA e músculo provoca RI (IR), demonstrando a sua importância na sensibilidade periférica à insulina. Corrobora com esta afirmação a disponibilidade na literatura de vários estudos realizados em culturas de células e modelos animais (80, 81), mas também o reconhecimento de que o PPAR γ é o alvo molecular de medicamentos sensibilizadores de insulina como as glitazonas (82).

PPAR γ é o principal regulador da adipogênese, e desempenha um papel determinante no processo de armazenamento de lipídeos. PPAR γ e PPAR α desempenham funções opostas na regulação do metabolismo da gordura. Enquanto o PPAR α promove a utilização de gordura o PPAR γ promove o armazenamento pois é expresso em adipócitos, macrófagos e músculos, e nestes sítios regula o desenvolvimento, a homeostase lipídica e o metabolismo da glicose (83).

PPAR γ participa no controle da transcrição de genes que codificam proteínas envolvidas em passos importantes no metabolismo da gordura como captação, síntese e armazenamento de lipídeos como a lipase lipoproteica (LPL), acil-CoA sintetase, proteína transportadora de AG 1 (FATP-1), entre outras (69). Além do que PPAR γ pode atuar na inibição de outros genes, como o que codifica a leptina, um hormônio que inibe a ingestão de alimentos e estimula o gasto energético por meio da ativação da lipólise e oxidação de AG (84).

Sabe-se que as alterações na função do TA em indivíduos obesos provocam RI além de propiciarem outros fatores que caracterizam a síndrome metabólica (85). Os efeitos diretos da ativação do PPAR γ no metabolismo lipídico do TA, além de melhorar a atividade endócrina deste, estão relacionados com benefícios secundários na melhora a RI em músculo e fígado (85).

São vários os possíveis mecanismos subjacentes à atividade de sensibilização à insulina pelo PPAR γ (78). Por serem altamente expressos no TA, a

ativação do PPAR γ , altera a morfologia dos adipócitos, bem como a distribuição gordurosa. Eles atuam no remodelamento do TA estimulando a diferenciação de adipócitos pequenos, que apresentam maior sensibilidade à insulina, por meio da apoptose dos adipócitos maiores, que são os principais responsáveis pela liberação de AG livres, secreção de TNF α e IL-6 (86).

Consequentemente, a diminuição da oferta de AG livres resultará em uma redistribuição do depósito corporal de TGL a partir do músculo, que passa a ser direcionado para o TA, com diminuição da gordura visceral e aumento da gordura celular subcutânea o que minimiza a inibição da utilização da glicose mediada pelo AG em células musculares (86).

A ativação do PPAR γ proporciona, ainda, a indução da expressão de adiponectina, uma molécula com efeito anti-inflamatório e de sensibilização à insulina nos adipócitos (10). Em contrapartida, o PPAR γ ativado ocasiona a diminuição do TNF α que é um indutor do aumento da lipólise. Dessa forma não haverá prejuízo da secreção de insulina, já que se tem diminuição da lipotoxicidade, bem como da liberação de AG livres (12).

A SMet está associada à estimulação do SRAA e com seus potenciais riscos cardiovasculares e renais. Uma vez que PPAR γ está relacionado com a expressão de genes de moléculas deste sistema, a ativação de seus ligantes modula os efeitos sistêmicos e parácrinos do SRAA. Posto isso, a ativação do PPAR γ possivelmente promove redução da PA, conjuntamente com efeitos vasoprotetores, anti-inflamatórios e antitrombóticos. Ligantes de PPAR γ atuam no controle da transcrição da renina (no bloqueio da ação de Ang II por repressão transcricional do gene AT-R1 nas células do tecido vascular), do gene da ECA e ainda reduzem níveis de aldosterona (87).

1.3 POLIMORFISMOS

Polimorfismos de nucleotídeo simples ou polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) são variações genômicas, que ocorrem em uma frequência alélica mínima de 1% em uma determinada população. São resultantes de mutações pontuais que

correspondem a posição onde existiu uma alternância na sequência dos nucleotídeos, de forma que apenas uma base nitrogenada tenha sido alterada (adenina (A), timina (T), citosina (C) ou guanina (G)). Estas substituições ocorrem frequentemente entre bases nitrogenadas de mesma característica estrutural, ou seja, troca entre duas purinas (A/G ou G/A) ou duas piridiminas (C/T ou T/C) (88). Os SNPs constituem a maioria das variações genômicas humanas e aparecem, em média, uma vez a cada 1000 a 1200 pares de bases, ao longo do genoma humano (89).

Os SNPs podem existir em regiões codificadoras e não codificadoras do genoma, sendo que naquelas, as modificações estruturais de um aminoácido podem acarretar mudanças estruturais e funcionais das proteínas envolvidas, aumentando ou diminuindo sua atividade, ou ainda não tendo efeito funcional (88).

1.3.1 Polimorfismo Pro12Ala do Gene do Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissomo Gama

Desde que foi identificado o polimorfismo Pro12Ala do gene PPAR γ (uma mutação caracterizada pela substituição de uma prolina por uma alanina no códon 12 do éxon B do gene PPAR γ 2, devido troca de uma citosina por uma guanina) (90), e que *Deeb et al.* relataram que a proteína resultante deste polimorfismo, *in vitro*, possui afinidade 50% menor que as suas variantes, tanto na transativação dependente quanto independente de ligante (91), muitos foram os estudos moleculares, bioquímicos e epidemiológicos realizados para avaliar e identificar a influência deste em condições metabólicas das mais diversas etnias.

Devido ao seu alto impacto como um fator de transcrição de sensibilização à insulina envolvido na adipogênese e lipogênese, a ocorrência de polimorfismos em um único nucleotídeo (SNP) no gene PPAR γ tem sido recentemente reportada em vários trabalhos que avaliaram indivíduos com RI, DM2, obesidade, arteriosclerose e HAS e outros parâmetros relacionados à SMet (12).

1.3.1.1 Polimorfismo Pro12Ala do Gene do receptor Ativado por Proliferador de Peroxissomo Gama na Obesidade

Os dados referentes ao Pro12Ala na literatura são descritos de forma controversa em relação à obesidade.

Mirzaei e colaboradores avaliaram o DNA genômico de 312 indivíduos iranianos obesos e DM2, subdivididos em quatro grupos (não obesos com DM2, obesos sem DM2, obesos com DM2 e controles não obesos e não diabéticos) com o objetivo de estudar a associação com Pro12Ala. Descreveram que a frequência do alelo Ala em indivíduos obesos foi significativamente diferente entre indivíduos do grupo controle. Observaram que os portadores do alelo Ala tiveram um maior IMC, quando comparado aos com o alelo comum dominante Pro. Com estes resultados associaram este polimorfismo à obesidade já que a presença do alelo Ala poderia prever o aumento do IMC (92).

Após análise de 387 pacientes obesos e 288 controles, Ben Ali e outros concluíram que o Pro12Ala estaria associado à obesidade em homens não diabéticos de origem tunisiana. Neste estudo não foi demonstrada diferença significativa nas frequências de genótipos do Pro12Ala entre controles e obesos. Contudo, a análise por gênero revelou que os homens obesos apresentavam frequência significativamente maior de genótipos Pro12Ala quando comparados com os controles. Portadores do alelo Ala, quando comparados com os homozigotos do alelo Pro, exibiram um risco significativamente maior de obesidade, maior IMC e níveis elevados de leptina no plasma (93).

Em um estudo multicêntrico espanhol, com participação de 464 adultos (45,3% homens e 54,7 % mulheres), escolhidos aleatoriamente na faixa etária entre 35 e 64 anos, Sanches e colaboradores constataram que a frequência do alelo Ala foi maior em homens obesos, além do que, tinham um IMC maior que os não portadores do alelo. Revelaram que as mulheres, portadoras do alelo Ala eram mais sensíveis à insulina e tinham perfil lipídico melhor do que os indivíduos, homens ou mulheres com o genótipo Pro12Pro. Estes autores discutiram sobre estes achados com o argumento de que as mulheres têm uma distribuição diferente de gordura e

que a expressão do gene PPAR γ 2 aumentada no TA subcutâneo seria o possível fator para explicação das diferenças encontradas (3).

Diferentemente, Milewicz e outros evidenciaram que Pro12Ala não parece estar associado com IMC tampouco com outros componentes da SMet (composição corporal, perfil lipídico, glicose e os níveis de insulina), em 387 mulheres polonesas, obesas, na pós-menopausa e 288 controles. Entretanto, estes autores observaram que mulheres com o alelo Ala estavam predispostas a um perfil lipídico menos favorável do que o restante desta população (94).

Trabalho realizado em crianças e adultos, caucasianos franceses e obesos com DM2, demonstrou em um dos seus objetivos que Pro12Ala não estava associado com a obesidade infantil ou adulta nesta população .

1.3.1.2 Polimorfismo Pro12Ala do Gene do Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissomo Gama na Resistência Insulínica e *Diabetes Mellitus* tipo 2

A presença do Pro12Ala, em relação aos distúrbios metabólicos dos hidratos de carbono (efeito protetor ou risco de desenvolvimento de RI ou DM2), demonstrou análises heterogêneas em estudos diversos com diferentes populações.

Em uma população russa, composta por 588 pacientes com DM2 e 597 controles normoglicêmicos, Chistiakov e colaboradores evidenciaram que os portadores do alelo Pro e indivíduos homozigotos Pro12Pro apresentavam aumento significativo sobre o risco de desenvolver DM2. Os indivíduos com genótipo Pro12Pro demonstraram pontuação significativamente maior no HOMA-IR, aumento dos níveis de insulina de jejum nos controles não diabéticos e TGL séricos elevados em pacientes DM2 (95).

Meta-análise com 41 estudos selecionados, subdivididos por etnia e status acima do peso, Huguenin e outros constataram que o Pro12Ala é um dos fatores relacionados à sensibilidade à insulina ao apontarem um efeito significativo do alelo Ala com menores níveis de insulina sérica, menor chance de desenvolvimento de DM2 em caucasianos e maior sensibilidade à insulina em indivíduos com excesso de peso (96).

Namvaran e outros decidiram investigar se variantes genéticas relacionadas ao Pro12Ala afetariam a resposta da pioglitazona (derivado TZD) sobre sensibilidade à insulina, obesidade e diabetes. Foram investigados 101 iranianos com DM2 e 128 controle sem doença. Verificaram que a pioglitazona reduziu significativamente o risco de DM2 nos portadores da variante Pro12Ala. A resposta terapêutica ao tratamento foi melhor entre pacientes diabéticos com o genótipo Pro12Ala do que naqueles com o genótipo Pro12Pro, embora as diferenças entre os grupos não atingissem significância estatística (97).

Estudo coreano investigou a relação Pro12Ala com diabetes e obesidade em 229 pacientes coreanos, sendo 111 deles obesos, divididos em três grupos (tolerância normal à glicose, intolerância à glicose e *diabetes mellitus*). Não foi encontrada associação do polimorfismo com essas comorbidades tampouco que a frequência do genótipo Pro12Ala tenha sido diferentes entre os grupos (98).

Bhatt e colaboradores observaram a partir da análise de índices antropométricos e parâmetros bioquímicos que o genótipo Ala12Ala, estava associada à obesidade e IR em 495 índios asiáticos residentes no norte da Índia (99).

Análise de indivíduos japoneses, 2201 com DM2 e 1212 controles euglicêmicos, verificou que a frequência do alelo Ala foi significativamente menor no grupo DM2 do que no grupo controle sugerindo, portanto, que variante Pro12Ala estaria associado com um risco reduzido para o desenvolvimento de diabetes. Apesar disso, seus autores observaram que indivíduos diabéticos com este genótipo exibiam uma concentração sérica significativamente maior de colesterol total, capacidade reduzida para a secreção de insulina, além de possuírem níveis mais elevados de hemoglobina glicosilada sugerindo maior gravidade nos DM2 portadores desta variante (100).

Estudo polonês, não conseguiu reproduzir os relatos de outros trabalhos anteriores de que o alelo Pro12Ala conferisse risco aumentado para o desenvolvimento de DM2 (101).

Em duas meta-análises restritas a participantes chineses com DM2 os autores não constataram evidências de que a variante do gene Pro12Ala fosse um fator associado à susceptibilidade para DM2 nesta população (102, 103).

1.3.1.3 Polimorfismo Pro12Ala do Gene do Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissomo Gama e Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) abrange um amplo espectro de condições clínico-patológicas do fígado, associadas com a deposição de lipídeos em hepatócitos. Pode variar da esteatose hepática (infiltração gordurosa em > 5% dos hepatócitos), que aparentemente é uma condição benigna, a esteato-hepatite não alcoólica (NASH) a qual pode evoluir para cirrose, insuficiência hepática e carcinoma hepatocelular (104). É fortemente associada à obesidade, dislipidemia e RI e é atualmente considerada como o componente hepático da SMet (105).

DHGNA é a doença hepática mais comum em todo o mundo. A sua prevalência varia, dependendo da população do estudo e quais foram os critérios utilizados para o diagnóstico. Na população em geral é superior a 15%, mas é muito maior naqueles com sobrepeso, obesos, e em indivíduos com DM2, bem como diabéticos tipo 1 (106).

A definição de DHGNA exige que haja evidências de esteatose hepática por exame de imagem ou por estudo histopatológico e que não existam outras causas para acúmulo secundário de gordura no fígado como o consumo elevado de álcool, uso de medicações esteatogênicas, doenças hereditárias ou outras causas coexistentes de doença hepática crônica (107).

A fisiopatologia da esteatose hepática é multifatorial, entretanto ainda não foi completamente esclarecida. Dentre os principais mecanismos propostos pode-se considerar a RI, disfunção mitocondrial, aumento dos AG livres liberados do TA para o fígado e lipotoxicidade hepática estimulando necroinflamação crônica e resposta fibrogênica (104).

A deposição hepática de gordura é resultante de um desequilíbrio entre o acúmulo e a remoção de triglicérides e representa, inicialmente, um mecanismo de proteção aos hepatócitos contra a toxicidade resultante de um fluxo aumentado de AG livres no fígado. Diversas linhas de evidência apoiam a hipótese de que a maior parte dos AG livres acumulados como TGL derivam do aumento da lipólise periférica relacionada com a RI no TA, seguida por um aumento da lipogênese e hiperinsulinemia induzida pela dieta (83).

Na verdade, o principal fator de risco para DHGNA é representado por RI relacionada à obesidade central da SMet. Esteatose per se pode, então, precipitar RI hepática contribuindo para distúrbios metabólicos e danos cardiovasculares. Diminuição da capacidade de secretar lipoproteínas e diminuição da β -oxidação, devido ao dano mitocondrial (em especial na presença de NASH), podem também desempenhar um papel na acumulação de gordura hepática (83).

Embora os fatores de risco para DHGNA estejam bem estabelecidos, existem evidências emergentes de numerosos modificadores genéticos na patogênese desta doença. Estudos recentes demonstram que os PPAR, parecem desempenhar um papel chave na fisiopatologia da DHGNA (105). No entanto, o papel do Pro12Ala na ocorrência e progressão de doenças do fígado gorduroso ainda não está definido (108).

Estudos de genotipagem em humanos têm demonstrado a presença de variantes no gene PPAR γ 2 em indivíduos com DHGNA. A variante Pro12Ala foi encontrada numa maior frequência em indivíduos com DHGNA do que na população geral em indianos, chineses e grupos norte-americanos, mas não em grupos alemães e italianos (109, 110).

Dongiovanni e colaboradores, em um estudo italiano, investigaram os efeitos do Pro12Ala e PPAR Leu162Val quanto a RI e dislipidemia e seus potenciais danos hepáticos, em 202 pacientes com DHGNA e 346 controles. Não conseguiram correlacionar que o Pro12Ala estivesse associado com as patologias alvo da pesquisa tampouco de que estivesse associada com a gravidade da DHGNA (111).

Comparando a ocorrência do Pro12Ala em pacientes com DHGNA e doença hepática gordurosa alcoólica, Rey e colaboradores observaram que os pacientes do primeiro grupo apresentavam uma alta incidência da variante Pro12Ala não associada com a progressão das alterações hepáticas. Contudo, observou-se um risco significativamente maior no desenvolvimento de alterações inflamatórias hepáticas nos pacientes com Pro12Ala no grupo de pacientes de etiologia alcoólica (108).

Uma pesquisa de caso controle em chineses identificou que pacientes tabagistas com polimorfismo no alelo Ala, em especial os homozigotos, têm maior potencial no desenvolvimento DHGNA por provável agravamento do estresse oxidativo. Outro estudo de caso controle com parâmetros clínicos e bioquímicos, em

índios do Norte da Índia, evidenciou que aqueles que possuíam o alelo Ala estavam mais predispostos ao desenvolvimento da DHGNA (109)

Contudo, meta-análise de sete estudos, publicada em 2013, demonstrou que as variantes do Pro12Ala não estão associadas com o risco de DHGNA devido a uma taxa alta de heterogeneidade em termos de idade, gênero e etnia. Igualmente, outra meta-análise recente, agora avaliando a análise estratificada por etnia, também não indicou haver associação significativa Pro12Ala e o risco de DHGNA (112).

Estudo brasileiro analisou os polimorfismos Leu162Val do PPAR α e Pro12Ala de PPAR γ como fatores de risco genéticos para o desenvolvimento e progressão da DHGNA. Indicou não haver associação entre a ocorrência de Pro12Ala com parâmetros clínicos, laboratoriais e histológicas da DHGNA. Contudo, poderia ser um fator resultante em uma maior proteção hepática (113).

1.3.1.4 Polimorfismo Pro12Ala do Gene do Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissomo Gama e Dislipidemia

Oh e colaboradores não encontraram nenhuma associação significativa entre o polimorfismo Pro12Ala e obesidade, hipertensão ou dislipidemia em pacientes coreanos (98).

Estudo chinês com 120 mulheres com síndrome do ovário policístico e 118 controles, observou-se que Pro12Ala pode modular as concentrações séricas dos níveis de TGL em jejum, bem como a deposição de gordura no abdômen, ao observarem que as mulheres portadoras do alelo Ala, apresentaram TGL elevados em jejum e RCQ estatisticamente significativamente mais elevados do que aquelas com o genótipo Pro12Pro (114).

Meta-análise de 74 pesquisas investigou a associação do polimorfismo Pro12Ala com colesterol total, TGL, HDL- c e LDL- c e demonstrou que indivíduos com genótipo Ala12Ala têm menor nível de TGL do que indivíduos caucasianos com genótipo Pro12Pro (115).

A fim de determinar se Pro12Ala contribui para a suscetibilidade à HAS e distúrbios metabólicos lipídicos, Gao e outros, investigaram 482 indivíduos (137 normotensos saudáveis – controles – e 345 indivíduos hipertensos). Concluíram que o alelo Ala está envolvido na susceptibilidade genética à hipertensão e distúrbios lipídicos metabólicas em uma subpopulação do interior da Mongólia (116).

A avaliação de 318 mulheres polonesas na pós-menopausa verificou que as mulheres obesas com pelo menos um alelo Ala (genótipo X / Ala) apresentaram maiores níveis séricos de colesterol total, LDL- c e TGL em comparação com as mulheres com o genótipo Pro12Pro. Este trabalho sugeriu que o genótipo X / Ala parece predispor a um perfil lipídico menos favorável nesta população (94).

Uma análise japonesa com 379 indivíduos investigou a presença de pequenas e densas partículas de lipoproteínas de baixa densidade (sdLDL- c) que têm sido associadas a um risco maior para a doença arterial coronária, com Pro12Ala. Averiguou-se que não houve diferença nos níveis de colesterol total, LDL - c, e HDL - c entre genótipos. Seus autores concluíram que indivíduos com o genótipo X / Ala (Pro/Ala + Ala/Ala) foram positivamente associados com uma zona alargada de sdLDL- c 4-7 e que alelo Ala pode desempenhar um papel na predisposição genética para o aumento destas partículas (117).

2 OBJETIVOS

Objetivo geral

Investigar a possibilidade de correlação entre o polimorfismo Pro12Ala no gene PPAR γ e a ocorrência de SMet, em pacientes acompanhados no Hospital Universitário de Brasília (HUB/UnB).

Objetivos específicos

- ✓ Avaliar as distribuições genotípicas e as frequências alélicas do polimorfismo Pro12Ala no gene PPAR γ em pacientes com SMet do Hospital Universitário de Brasília (HUB/UnB), e em controles da Fundação Hemocentro da Secretaria de Saúde do Distrito Federal (SES/DF), e comparar os resultados entre os dois grupos.
- ✓ Analisar a frequência descritiva e prevalência do polimorfismo genético Pro12Ala em pacientes com SMet, correlacionando dados antropométricos, bioquímicos e análise genotípica dos pacientes envolvidos no estudo.
- ✓ Investigar se os pacientes com SMet, portadores do alelo Pro12Ala, diferem quanto aos parâmetros antropométricos e bioquímicos quando comparados aos pacientes portadores dos alelos Ala/Ala e Pro/Pro de PPAR γ .

3 PACIENTES E MÉTODOS

3.1 COLETA DE DADOS

Os participantes do estudo foram submetidos à entrevista, para preenchimento de questionário que continha perguntas relacionadas aos dados de identificação, parâmetros clínicos e bioquímicos (Anexo I). Posteriormente, realizou-se um exame físico com aferição da pressão arterial, bem como medidas antropométricas (peso, estatura e circunferências da cintura).

Técnicos de enfermagem do HUB foram responsáveis pela coleta das amostras de sangue para dosagem dos parâmetros bioquímicos.

3.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA DO ESTUDO

A amostra foi constituída por 154 pacientes com diagnóstico prévio de SMet em acompanhamento no Ambulatório de Diabetes do Serviço de Endocrinologia do HUB/UnB e por mais 179 indivíduos voluntários e sadios recrutados na Fundação Hemocentro de Brasília (FHB/DF) que consentiram em participar do estudo com a assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da UnB e da Secretaria Estadual de Saúde do Distrito Federal.

3.3 PERÍODO E LOCAL DE COLETA DOS DADOS DO ESTUDO

As coletas de dados e amostras foram realizadas, simultaneamente, no período de março a julho de 2014, no Laboratório de Análises Clínicas do HUB e na FHB/DF.

3.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- 1- Pacientes de ambos os sexos, idade a partir de 45 anos, com diagnóstico de SMet, definido pelos critérios da NCEP/ATP III, com pelo menos três alterações descritas a seguir:
 1. Glicose \geq 100 mg/dL ou em tratamento para hiperglicemia
 2. HDL- c
 - Homens: $<$ 40 mg/dL ou em tratamento para HDL- c baixo
 - Mulheres: $<$ 50 mg/dL ou em tratamento para HDL- c baixo
 3. Triglicérides \geq 150 mg/dL ou em tratamento para triglicérides elevados
 4. Obesidade Circunferência abdominal \geq 102 cm para homens ou \geq 88 cm para mulheres
 5. Hipertensão \geq 130 x 85 mmHg ou em tratamento medicamentoso para HAS

3.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- 1- Pacientes que se recusaram a participar do estudo.
- 2- Pacientes com idade inferior a 45 anos
- 3- Pacientes em uso de medicamentos hiperglicemiantes, como glicocorticoides.

3.6 VARIÁVEIS DO ESTUDO

3.6.1 Variável Dependente

3.6.1.1 Polimorfismo Pro12Ala do Gene do Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissomo Gama

As frequências alélicas e a distribuições dos polimorfismos foram calculados em ambos os grupos SMet e controles.

3.6.2 Variáveis Independentes

3.6.2.1 Variáveis de Identificação

3.6.2.1.1 Idade

Verificada em um documento de identidade com foto. Calculada, em anos completos, no último dia do mês de referência da pesquisa, com base no dia, mês e ano do nascimento da pessoa. Realizada pelo pesquisador e medida uma vez em um único momento.

3.6.2.1.2 Sexo

Registro feito por meio da verificação em um documento de identidade com foto. Distinção biológica que classifica as pessoas em homens e mulheres. Realizado pelo pesquisador e medida uma vez em um único momento.

3.6.2.2 Variáveis Antropométricas

Peso, estatura e circunferência da cintura foram avaliados e identificados no estudo como variáveis quantitativas.

3.6.2.2.1 Peso

Medida da força gravitacional que atua sobre um objeto ou corpo. Os pacientes foram pesados em balanças certificadas e aferidas pelo Inmetro, com

capacidade máxima de 150 kg e intervalos de 100g, após serem orientados a subir na balança, em posição ereta, com roupas leves, posicionados com os dois pés sobre a balança, distribuindo igualmente o seu peso, sobre as duas pernas, descalços e com o olhar no horizonte. A balança foi aferida a cada início de coleta de dados. A medida foi registrada em quilogramas, com duas casas decimais. Foi aferida uma vez em um único momento.

3.6.2.2.2 Estatura

A medição de cada participante foi realizada em estadiômetro da marca Sanny, com precisão de 1 mm, após recomendações de estarem em posição ereta, com braços estendidos ao longo do corpo e olhar fixo em um ponto do horizonte. Com a mão sob o queixo do indivíduo, posicionou-se sua cabeça de forma que a parte inferior da órbita ocular estivesse no mesmo plano do orifício externo do ouvido (plano de Frankfurt). A medida foi registrada em centímetro com uma casa decimal. Medida uma vez em um único momento.

A partir dos dados antropométricos coletados construiu-se o índice de massa corpórea (IMC). Esse é o resultado da divisão do peso em quilogramas pelo quadrado da altura em metros (kg/m^2). Os valores de índice de massa corpórea acima de $25,0 \text{ kg}/\text{m}^2$ caracterizam excesso de peso, de $25,0 \text{ kg}/\text{m}^2$ a $29,9 \text{ kg}/\text{m}^2$ correspondem a sobrepeso e $\text{IMC} \geq 30,0 \text{ kg}/\text{m}^2$ à obesidade.

3.6.2.2.3 Perímetros

Circunferência abdominal (CA) = a medida foi realizada com fita métrica inelástica, com o indivíduo na posição ereta, abdome relaxado e desnudo, com braços estendidos ao longo do corpo, pés juntos e na fase expiratória da respiração. Posicionou-se a fita na menor localização da curvatura entre o último arco costal e a parte superior da crista ilíaca anterossuperior. A medida foi com aproximação de 0,1 cm.

3.6.2.3 Variáveis Bioquímicas

Depois de uma noite de jejum, com no mínimo 12 horas, amostras de sangue foram retiradas para a determinação dos parâmetros laboratoriais considerados para fins do presente projeto: glicemia em jejum, colesterol total e frações e triglicerídeos.

Todas as amostras dos pacientes com SMet foram analisadas por métodos convencionais apenas no Laboratório de Análises Clínicas do HUB.

Os resultados dos exames bioquímicos foram analisados conforme pontos de corte propostos pelos critérios utilizados para classificação da SMet.

Foram descritos como variáveis quantitativas.

3.6.2.4 Variável Hemodinâmica

A medida da pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD) seguiram os procedimentos recomendados pela VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão.

Foi realizada durante a entrevista, por no mínimo duas vezes, em momentos distintos em cada paciente, realizada pelo método indireto com técnica auscultatória com uso de esfigmomanômetro de coluna de mercúrio, marca Tycos devidamente calibrado e certificado pelo INMETRO, e estetoscópio da marca tal.

Todos os indivíduos foram explicados sobre o procedimento, instruídos a não conversar durante a medida e deixados em repouso por pelo menos 5 minutos em ambiente calmo. Ademais, certificou-se que os mesmos não estavam com a bexiga cheia, não haviam praticado exercícios físicos há pelo menos 60 minutos, não tinham ingerido bebidas alcoólicas, café ou alimentos tampouco fumado nos 30 minutos anteriores.

As aferições foram realizadas na posição sentada, com pernas descruzadas, pés apoiados no chão, dorso recostado na cadeira e relaxado. O braço estava na altura do coração (nível do ponto médio do esterno ou 4o espaço intercostal), livre de roupas, apoiado, com a palma da mão voltada para cima e o cotovelo ligeiramente fletido.

Após a localização por palpação da artéria braquial, colocou-se manguito, sem folgas, 2 a 3 cm acima da fossa cubital, centralizando o meio da parte compressiva do manguito sobre a artéria. O nível da pressão sistólica foi estimado pela palpação do pulso radial e inflado rapidamente até ultrapassar 20 a 30 mmHg o nível estimado da pressão sistólica, obtido pela palpação com lenta deflação.

A pressão sistólica foi aquela que se auscultou no momento do primeiro som (fase I de Korotkoff) e a pressão diastólica no desaparecimento dos sons (fase V de Korotkoff) cerca de 20 a 30 mmHg abaixo do último som para confirmar seu desaparecimento com posterior deflação rápida e completa.

Foi considerado hipertenso o indivíduo com PAS igual ou superior a 130 mm Hg e/ou PAD igual ou superior a 85 mm Hg.

3.7 EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA genômico das amostras dos pacientes utilizadas neste estudo foi extraído dos leucócitos de sangue periférico pelo método Chellex (BioRad, Hercules, CA, EUA) (118). Resumidamente, 50 µl de sangue foram misturados a 1 mL de água e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente, resultando em hemólise. Em seguida as células nucleadas foram recuperadas pela centrifugação da mistura por 3 minutos a 8000 x g. Após descarte do sobrenadante, foi adicionado mais 1 mL de água ao precipitado e os passos de incubação, centrifugação e descarte do sobrenadante foram repetidos nas mesmas condições descritas previamente. A seguir, 200 µl de uma suspensão da resina chellex-100 a 5% foram adicionados às amostras e misturados em vórtice por 10 segundos. O lisado celular resultante foi incubado a 56°C por 30 min. e a seguir por 95°C por 8 minutos. As amostras foram então armazenadas a -20C até serem utilizadas nas reações de amplificação do DNA.

3.8 GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO PRO12ALA

A genotipagem do polimorfismo Pro12Ala foi feita com o sistema de amplificação refratária à mutação (ARMS-PCR), conhecida também por PCR alelo-específica. Para este estudo foram desenhados dois conjuntos de primers. O primeiro para genotipagem dos pacientes, e um segundo para validação dos resultados obtidos com o primeiro conjunto (Tabela 4).

Tabela 4 - Iniciadores utilizados para genotipagem do polimorfismo Pro12Ala

Conjunto de primers	Função	Oligos (5´ - 3´)	Sentido
Genotipagem	Alelo-específico (Pro) - 1	5´CTGGGAGATTCTCCTATTGAG <u>C</u> 3´	Foward
	Alelo-específico (Ala) - 1	5´CTGGGAGATTCTCCTATTGAG <u>G</u> 3´	Foward
	Comum - 1	5´CAATAGCCGTATCTGGAAGGAA3´	Reverso
Validação	Alelo-específico (Pro) - 2	5´TATCAGTGAAGGAATCGCTTTCT <u>A</u> G3´	Reverso
	Alelo-específico (Ala) - 2	5´TATCAGTGAAGGAATCGCTTTCT <u>C</u> A3´	Reverso
	Comum - 2	5´TGTGAATTACAGCAAACCCCTAT3´	Foward

Legenda - Nucleotídeo em itálico e sublinhado – base que caracteriza um pareamento errado deliberadamente adicionado na posição 2 a partir da extremidade 3´ do primer para aumentar a especificidade da discriminação alélica. Nucleotídeo em negrito na extremidade 3´ do primer é o que o torna alelo específico e compõem as duas versões do polimorfismo.

A discriminação alélica pela PCR alelo específica baseia-se no fato de que um primer com a sua extremidade 3´ não pareada resulta em não amplificação ou em uma amplificação ineficiente quando comparado a situação onde sua extremidade 3´ está pareada. Assim, são desenhados dois primers alelos-específicos, um para cada variante do polimorfismo. O primeiro nucleotídeo 3´ destes primers coincide com o local da variação no genoma e cada um possui a base complementar a uma das duas versões do polimorfismo. Além disto, ambos contêm outra base diferente da apropriada no segundo nucleotídeo da extremidade 3´, pois o duplo “mismatch” aumenta a capacidade discriminatória da reação.

Cada primer alelo-específico é combinado com um primer oposto comum em duas reações de PCR diferentes, executadas simultaneamente. A eficiência das amplificações em ambas as reações é dependente do genótipo do indivíduo, sendo

assim, é possível determiná-lo. Para maiores informações vide o artigo de Newton e outros (119). A figura 5 apresenta esquematiza a estratégias de amplificação de genotipagem utilizadas neste estudo.

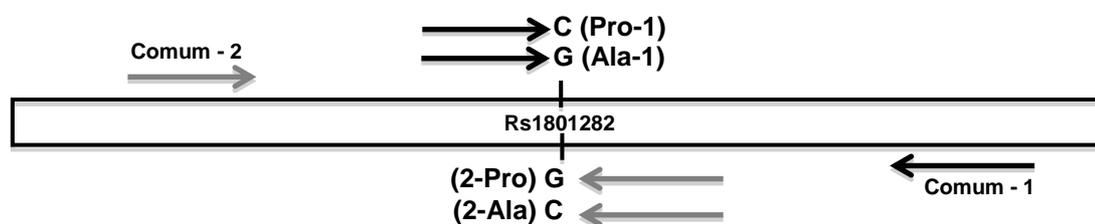


Figura 5 – Estratégia para genotipagem (preto) do polimorfismo Pro12Ala e validação (cinza) dos resultados utilizando diferentes conjuntos de primers alelos-específicos. Como os primers alelos-específicos posicionam-se em fitas opostas do DNA as reações são independentes, portanto o resultado de uma valida o da outra.

Os genótipos dos indivíduos testados foram determinados pela comparação da eficiência das amplificações observadas nas reações A e B, que continham as seguintes combinações de primers [Alelo-específico (Pro) -1 + Comum -1] e [Alelo-específico (Ala) -1 + Comum -1], respectivamente. Cada um dos tubos de reação era composto por: 15 µL da solução Maxima SYBR Green qPCR Master Mix 2X (Fermentas, Glen Burnie, MD, EUA), 100 ng de cada oligonucleotídeo iniciador e 5 µL da solução de DNA extraído em um volume final de 25 µL. O programa da reação no termociclador foi: Ativação da polimerase e desnaturação inicial do DNA a 95°C por 10 minutos, seguida por 40 ciclos compostos pelas etapas de desnaturação a 95°C por 15 segundos, e anelamentos e extensão a 60°C por 60 segundos. A especificidade da reação foi confirmada pela análise da curva de desnaturação, feita pelo aquecimento dos produtos de amplificação de 60°C a 90°C em incrementos de 0,3°C enquanto o decaimento da emissão de fluorescência era detectado. Tanto a amplificação quanto a análise da curva de desnaturação foram feitas no aparelho StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

A validação do resultado obtido foi feita com o segundo conjunto de primers nas mesmas condições descritas anteriormente, excetuando-se a temperatura de anelamento e polimerização que neste caso foi 55°C e as reações de PCR foram denominadas C e D, tais reações continham as seguintes combinações de primers

[Alelo-específico (Pro) - 2 + Comum - 2] e [Alelo-específico (Ala) - 2 + Comum - 2], respectivamente. Os primers de validação genotipam o polimorfismo Pro12Ala em um sentido oposto e utilizando a fita de DNA complementar a utilizada pelo conjunto de primers de genotipagem, ou seja, as reações e os resultados de validação e de genotipagem são independentes. Ademais, os experimentos de validação foram executados em um número menor de pacientes, pois o seu objetivo era apenas validar os resultados da reação de genotipagem. Todos os genótipos disponíveis (Pro/Pro e Pro/Ala) foram incluídos nesta análise.

Tabela 5 - Configuração das reações de PCR utilizadas para genotipar o polimorfismo Pro12Ala e para validar o resultado obtido

Conjunto de primers	Reação de PCR	Combinação de primers
Genotipagem	A	Alelo-específico (Pro) - 1 + Comum - 1
	B	Alelo-específico (Ala) - 1 + Comum - 1
Validação	C	Alelo-específico (Pro) - 2 + Comum - 2
	D	Alelo-específico (Ala) - 2 + Comum - 2

As figuras a seguir exemplificam os resultados encontrados para as reações das determinações genotípicas em indivíduos heterozigotos (CG) e homozigotos (CC) para o polimorfismo Pro12Ala.

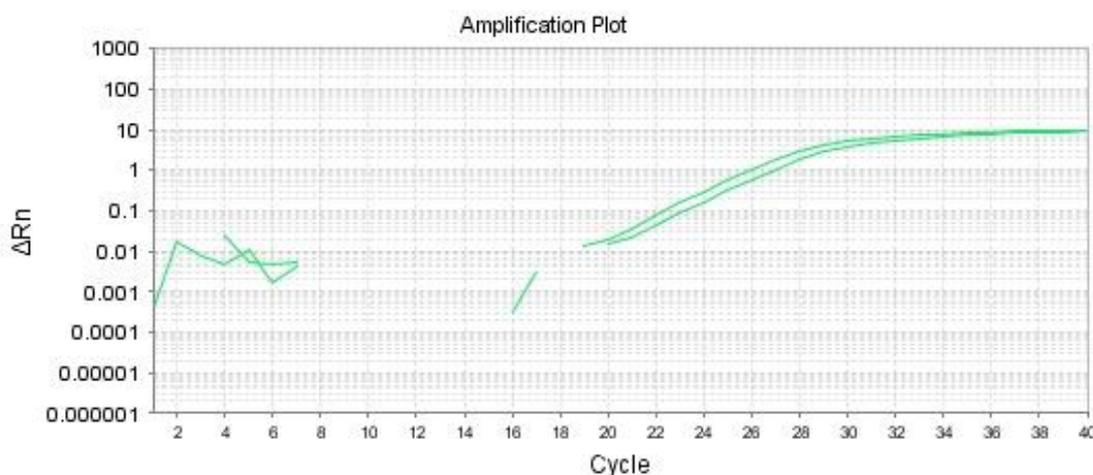
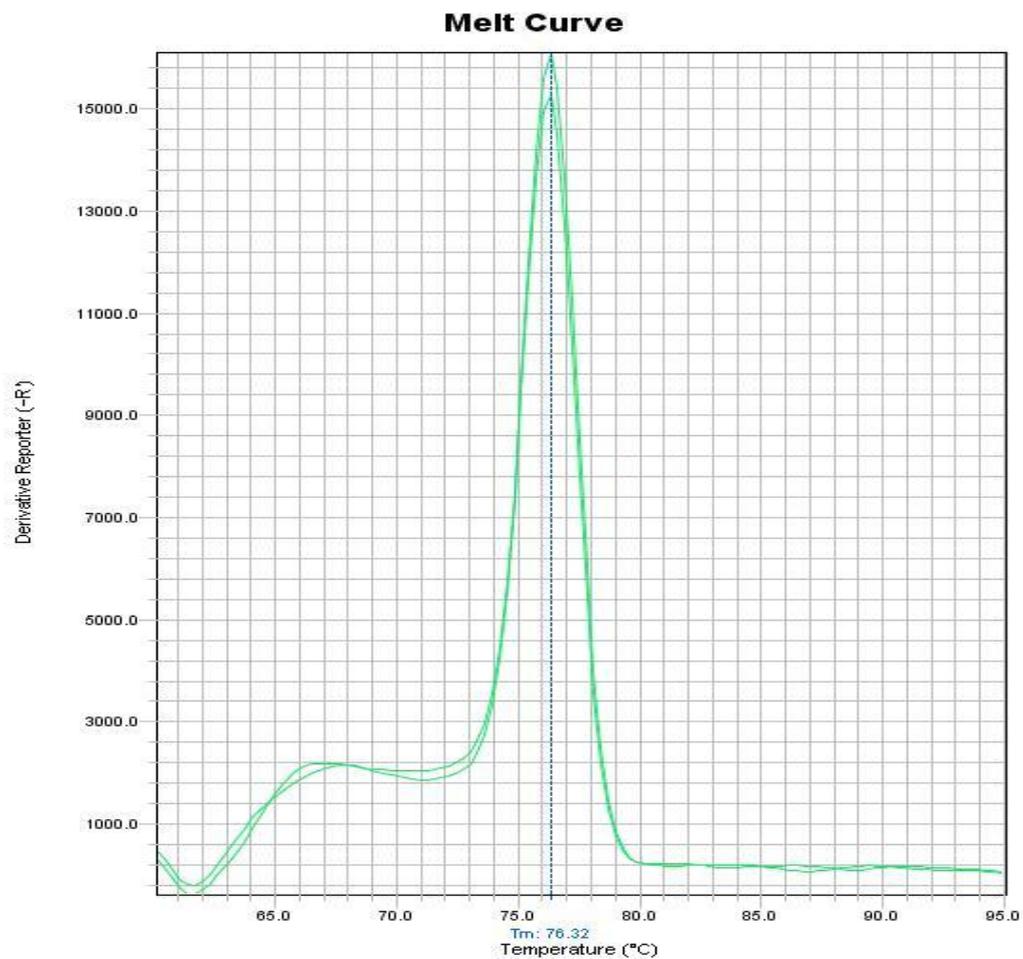


Figura 6: A atribuição do genótipo é baseada na diferença entre o ciclo quantitativo (Cq) das reações específicas em ambos os conjuntos de primers. Neste caso a determinação genotípica é de um indivíduo heterozigoto CG ($-2 < \Delta Cq < 2$).



“Figura 7: A especificidade da amplificação dos produtos específicos foi verificada, em ambos os conjuntos de primers, através da análise da curva de “melting” que deve ser coincidente.

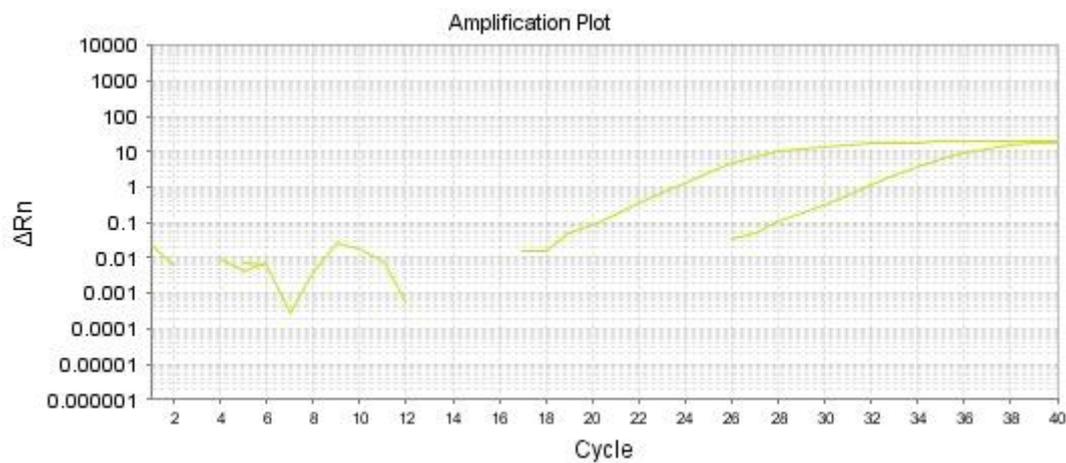
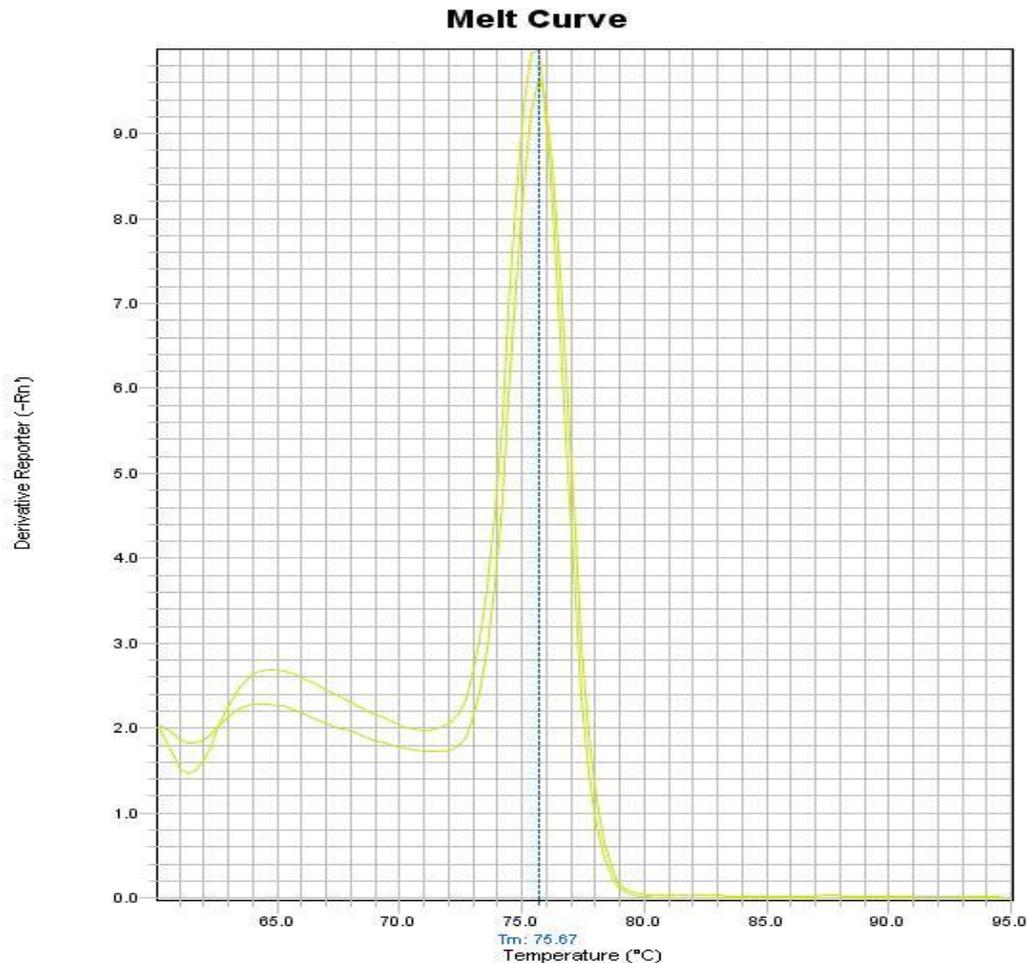


Figura 8: A atribuição do genótipo é baseada na diferença entre o ciclo quantitativo (C_q) das reações específica e tardia em ambos os conjuntos de primers. Neste caso a determinação genotípica é de um indivíduo homozigoto CC ($\Delta C_q > 5$).



“Figura 9: A especificidade da amplificação do produto específico e inespecífico foi verificada, em ambos os conjuntos de primers, através da análise da curva de “melting” que deve ser coincidente.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os dados categóricos foram descritos como média \pm desvio padrão. As variáveis foram analisadas com métodos não paramétricos (teste de Mann Whitney e Fisher). As frequências genótípicas e alélicas foram comparadas entre pacientes e controles. O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado comparando frequências genótípicas esperadas / observadas por χ^2 teste utilizando o programa GenAlex. Intervalo de confiança de 95% (IC 95%). Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando GraphPad Prism versão 6.00 para Windows, GraphPad

Software, San Diego, Califórnia, EUA (www.graphpad.com). Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3.10 ASPECTOS ÉTICOS

A pesquisa encontra-se de acordo com os princípios e fundamentos, da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), relacionados à bioética, autonomia, não maleficência, beneficência, justiça e equidade, dentre outros, ao visar e assegurar os direitos e deveres que dizem respeito aos participantes da pesquisa, à comunidade científica e ao Estado.

Os pacientes convidados e envolvidos no estudo foram informados sobre as finalidades, os objetivos da pesquisa, riscos, benefícios, procedimentos. Foram explicados os direitos relacionados ao anonimato, ao caráter voluntário na participação do trabalho, liberdade de recusa, bem como retirada do seu consentimento no decorrer do trabalho.

A participação no estudo só foi efetivada após a assinatura de duas vias, uma para o voluntário e outra para o pesquisador, do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde (FS) da UnB conforme o parecer consubstanciado n. 539.705 (ANEXO II) e também pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde (Fepecs) – SES- DF n. 484.091(ANEXO III) em coparticipação com outro projeto intitulado “Associação entre o comprimento de Telômeros e a presença de *diabetes mellitus* Tipo 2 em pacientes do Hospital Universitário de Brasília”.

4 RESULTADOS

Um total de 333 indivíduos, 154 com SMet e 179 voluntários, foi avaliado neste estudo. No primeiro grupo, a idade média foi de $57,9 \pm 6,83$ anos e 67,53% dos participantes eram do sexo feminino. No grupo controle, a média de idade foi $46,33 \pm 4,22$ anos, entretanto, a maioria era composta por indivíduos do sexo masculino (67,03%).

A tabela seguinte exhibe as características clínicas e bioquímicas de todos os indivíduos com síndrome metabólica incluídos no estudo.

Tabela 6 - Características básicas antropométricas, bioquímicas e hemodinâmicas dos pacientes com síndrome metabólica

n (154)	Média ± Desvio padrão
Amostra (n)	154
Sexo (M/F)	50/104
Idade (anos)	$57,9 \pm 6,83$
Peso (kg)	$79,87 \pm 16,29$
Altura (cm)	$1,62 \pm 0,09$
Circunferência abdominal	$111,61 \pm 16,24$
Circunferência do quadril	$111,12 \pm 16,75$
PA sistólica (mmHg)	$131,50 \pm 14,76$
PA diastólica (mmHg)	$84,09 \pm 7,97$
IMC (kg/m ²)	$30,73 \pm 6,57$
Glicemia em jejum (mg/dL)	$152,81 \pm 73,66$
Total- C (mg/dL)	$184,89 \pm 39,04$
TGL (mg/dL)	$180,92 \pm 87,91$
HDL- c (mg/dL)	$42,25 \pm 22,39$
LDL- c (mg/dL)	$108,67 \pm 36,20$

Legenda - PA: pressão arterial; IMC: índice de massa corporal; Total-c: colesterol total; TGL: triglicerídeos; HDL-c: lipoproteína de alta densidade; LDL-c: lipoproteína de baixa densidade.

A análise do grupo controle não foi possível uma vez que a maior parte das variáveis contidas neste estudo não foram avaliadas e/ou coletadas por parte da FHB/DF.

As distribuições alélicas e as distribuições genótípicas encontradas nas populações com SMet e controle são apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7 - Distribuição dos alelos e genótipos do polimorfismo Pro12Ala do gene PPAR γ em pacientes com síndrome metabólica e controles

Grupos	Frequências alélicas			Frequências genótípicas		
	n (%)			n (%)		
	C (Pro)	G (Ala)	<i>p</i>	CC (Pro/Pro)	CG (Pro/Ala)	GG (Ala/Ala)
SMet	146 (94,8)	5,2 (8)	P>0,05	138 (89,61%)	16 (10,38%)	0
Controles	168 (94,1)	5,9 (11)	P>0,05	159 (88,82%)	20 (11,17%)	0

As frequências dos alelos C e G foram semelhantes em ambos os grupos. O alelo dominante C (códon CCA = prolina) apresentou-se em mais de 94% dos indivíduos de ambos os grupos, enquanto que a frequência do alelo polimórfico G (códon GCA = alanina) foi 5,2% no grupo com alterações metabólicas e de 5,8% no grupo controle. Desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg não foi visto nem no grupo SMet ($\chi^2 = 0,462$, $df = 1$, $p = 0,49$), nem no grupo controle ($\chi^2 = 0,695$, $df = 1$, $p = 0,404$).

A distribuição genotípica do polimorfismo Pro12Ala de PPAR γ foi de 0,896 para CC (Pro/Pro) e 0,103 para CG (Pro12Ala) nos indivíduos com SMet. Nesta mesma ordem, temos 0,888% e 0,111% nos controles. O genótipo GG (Ala12Ala) não foi encontrado em nenhum indivíduo de toda a amostra.

A tabela 8 evidencia os valores da média e desvio-padrão (DP) para as variáveis: idade, bioquímicas (glicose, colesterol total, HDL, LDL e TGL), antropométricas (IMC, CA) e hemodinâmicas (PAS e PAD) de acordo com o

genótipo para a população com SMet, sendo que não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Tabela 8 - Comparação de dados bioquímicos, antropométricos e hemodinâmicos dos indivíduos com síndrome metabólica entre os diferentes grupos de genótipos polimorfismo Pro12Ala de PPAR γ

Variáveis	Polimorfismo Pro12Ala		p
	Pro12Pro n(138) CC	Pro12Ala n (16) CG	
n = 154			
Sexo (M/F)	46/92	04/12	0,3658
Idade (anos)	57,9 \pm 6,87	58,12 \pm 6,69	0,9238
Glicemia em jejum (mg / dL)	155,91 \pm 76,59	126,31 \pm 30,83	0,1562
Total- C (mg / dL)	183,71 \pm 39,26	188,18 \pm 47,66	0,4851
TGL (mg / dL)	184,22 \pm 90,16	152,87 \pm 60,84	0,2626
HDL-c (mg / dL)	42,45 \pm 23,44	40,56 \pm 9,95	0,4963
LDL-c (mg / dL)	107,49 \pm 35,08	118,18 \pm 44,40	0,3384
IMC (kg/m ²)	30,94 \pm 6,63	28,89 \pm 5,28	0,2780
Circunferência abdominal	111,93 \pm 16,14	108,81 \pm 17,37	0,4368
PA sistólica (mmHg)	131,67 \pm 15,11	130 \pm 11,54	0,8509
PA diastólica (mmHg)	84,13 \pm 8,17	83,75 \pm 6,19	0,7248

Legenda - Total-c: colesterol total; TG: triglicérides; HDL-c: lipoproteína de alta densidade; LDL-c: lipoproteína de baixa densidade; PA: pressão arterial; IMC: índice de massa corporal.

Quando analisamos os resultados obtidos a partir da frequência composta por indivíduos que apresentavam componentes individuais da SMet, fazendo a diferenciação dos valores de HDL e CA para homens e mulheres, não observamos correlações estatisticamente significativas entre as variáveis analisadas e o genótipo. Os dados são apresentados na tabela 9.

Tabela 9 - Associação dos genótipos de PPAR γ e a frequência de componentes individuais da síndrome metabólica

Componentes da SMet	Pro12Pro n(%) CC	Pro12Ala n (%) CG	p
Glicemia de jejum \geq 100 (mg / dL)	133 (96,37%)	14 (87,5%)	0,1562
PA \geq 130/85 mmHg	81 (58,69%)	7 (43,75%)	0,2925
TGL \geq 150 mg / dL)	77 (55,79%)	8 (50%)	0,7919
HDL-c < 40 mg / dL em homens	24 (17,39%)	3 (18,75%)	0,1147
HDL-c < 50 mg / dL em mulheres	77 (55,79%)	8 (50%)	0,2251
CA >_88 cm em mulheres	89 (64,49%)	11 (68,75%)	0,3923
CA > 102 cm em homens	29 (21,01%)	3 (18,75%)	0,6292

Legenda - PA: pressão arterial; CA: circunferência abdominal; TGL: triglicerídeos; HDL-c: lipoproteína de alta densidade.

Na análise da tabela 10, as variáveis contínuas incluídas foram as constantes na definição da SMet de acordo com os critérios do NCEP/ATPIII. A população com SMet foi estratificada em outros três grupos para verificar se os efeitos do polimorfismo estavam associados aos genótipos de indivíduos que apresentavam necessariamente os componentes HAS, DM2 ou obesidade. Em todos os subgrupos observam-se níveis de glicemia e triglicerídeos mais elevados no genótipo Pro12Pro em relação ao Pro12Ala. Contudo, os portadores do alelo Ala não apresentaram significância estatística com níveis de glicemia em jejum, TGL, HDL-c, CA e PA quando comparados com os homozigotos Pro12Pro.

Ressaltamos que os genótipos não foram influenciados na resposta aos eventuais tratamentos.

Tabela 10 - Variáveis antropométricas, hemodinâmicas e metabólicas, de acordo com os genótipos do gene PPAR γ em todos os pacientes com síndrome metabólica e subgrupos com diabetes, hipertensão e obesidade

Componentes da SMet	Todos os indivíduos com SMet			Indivíduos com SMet e hipertensos (PA \geq 130/85 mm hg)			Indivíduos com SMet e diabéticos (Glicemia de jejum \geq 100 mg/dl)			Indivíduos com SMet e obesos (IMC \geq 30 kg/m ²)		
	PRO12PRO (N = 138)	PRO12ALA (N = 16)	p	PRO12PRO (N = 81)	PRO12ALA (N = 7)	p	PRO12PRO (N = 133)	PRO12ALA (N = 14)	p	PRO12PRO (N = 69)	PRO12ALA (N = 7)	p
PA sistólica (mmHg)	131,67 \pm 15,11	130 \pm 11,54	NS	140,72 \pm 12,68	140 \pm 8,16	NS	131,66 \pm 15,28	130,71 \pm 12,06	NS	132,59 \pm 14,36	125,71 \pm 9,75	NS
PA diastólica (mmHg)	84,13 \pm 8,17	83,75 \pm 6,19	NS	87,29 \pm 6,90	90 \pm 0	NS	83,99 \pm 8,25	84,28 \pm 6,46	NS	84,21 \pm 7,16	82,85 \pm 4,87	NS
Glicemia em jejum (mg/dL)	155,91 \pm 76,59	126,31 \pm 30,83	NS	158,02 \pm 87,87	127,85 \pm 29,57	NS	158,35 \pm 76,97	131,64 \pm 29,15	NS	143,17 \pm 49,01	131,71 \pm 40,43	NS
TGL (mg/dL)	184,22 \pm 90,16	152,87 \pm 60,84	NS	191,27 \pm 88,11	174,42 \pm 63,80	NS	185,54 \pm 90,72	163,44 \pm 57,46	NS	177,44 \pm 87,63	139,14 \pm 47,92	NS
HDL-c (mg/dL)	42,45 \pm 23,44	40,56 \pm 9,95	NS	43,20 \pm 28,66	38,71 \pm 8,55	NS	42,66 \pm 23,82	39,28 \pm 10,01	NS	39,73 \pm 11,14	42,14 \pm 7,71	NS
Circunferência abdominal	111,93 \pm 16,14	108,81 \pm 17,37	NS	112,50 \pm 15,53	105,71 \pm 17,19	NS	111,56 \pm 15,61	107,28 \pm 15,10	NS	119,72 \pm 14,56	123,71 \pm 14,04	NS

Legenda - SMet: síndrome metabólica; HDL: lipoproteína de alta densidade; PA: pressão arterial; IMC: índice de massa corporal; TGL: triglicérides; NS: não significante
P-valor e os valores indicados referem-se à análise bruta (ou seja, não ajustada para sexo e idade).

5 DISCUSSÃO

É bem determinado que exista susceptibilidade individual ao desenvolvimento da SMet, apesar da associação e exposição a outros fatores ambientais, comportamentais e culturais.

Por conseguinte, a suscetibilidade genética para SMet é um foco de pesquisa na comunidade científica, já que a identificação de genes e seus polimorfismos genéticos permite melhor discernimento de sua fisiopatologia e possibilita o desenvolvimento de estratégias adequadas de prevenção e terapêutica.

Muitos estudos têm investigado a associação entre Pro12Ala e os vários componentes individuais da SMet. Alguns afirmam que a presença do polimorfismo conferiria um efeito protetor (3), outros indicam que seria um fator de maior susceptibilidade (4, 5), e existem ainda aqueles que assinalam como indiferentes (6-8).

Poucos, porém, têm explorado essa associação com a síndrome metabólica como uma entidade. Nosso estudo é um dos poucos realizados neste sentido, ainda mais, com avaliação de uma subpopulação brasileira. Dentre os existentes podemos citar a pesquisa de *Vieira-Filho et al.* com uma população indígena no Amazonas (120) e de Domenici e colaboradores em pacientes com DHGNA (113).

Polimorfismos genéticos do gene PPAR γ 2 na etiologia dos distúrbios metabólicos, em especial o Pro12Ala, despertam cada vez mais atenção. Isso porque os PPAR γ são fatores de transcrição pertencentes à família de receptores nucleares que regulam a expressão de diversos genes relacionados à adipogênese e lipogênese, sensibilidade à insulina, balanço energético, processos inflamatórios, angiogênese e aterosclerose

Os efeitos metabólicos dessa variação genética (substituição de uma prolina por uma alanina no códon 12 do éxon B do gene PPAR γ 2), sobre o metabolismo humano resultam em pesquisas cujos resultados revelam uma heterogeneidade dos efeitos do polimorfismo Pro12Ala na suscetibilidade de riscos para o desenvolvimentos da SMet.

Conforme dados de publicação recente que comparou o polimorfismo Pro12Ala da população iraniana com a população geral de diversas etnias, a distribuição do polimorfismo Pro12Ala de PPAR γ é muito ampla, variando de 0,063 a

0,956 para o genótipo CC e de 0,015 a 0,300 para o genótipo CG. Para todas as populações e etnias já avaliadas, o alelo GG é o mais raro, variando de 0 a 0,067 (121).

Nesse quesito, nossos dados não são divergentes dos demais estudos. Em nosso estudo, nos indivíduos controles sadios, a distribuição genotípica do polimorfismo Pro12Ala de PPAR γ foi 0,888% para CC (Pro/Pro) e 0,111% para CG (Pro12Ala). Semelhantemente a outras pesquisas, não encontramos o genótipo GG (Ala12Ala) em toda a nossa amostra, corroborando com a descrição de sua raridade. Nossos resultados se aproximam dos dados de outros estudos publicados e que avaliaram populações de: chineses (122), italianos (123), franceses (124), americanos de origem africana (125), indianos (7), escoceses (126), alemães (127), finlandeses (124) e hispânicos (128).

As frequências genotípicas observadas não são diferentes das frequências esperadas, mostrando que este polimorfismo encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg, o que indica que o mesmo apresenta frequências genotípicas inalteradas através das gerações. Ademais, reforça a probabilidade de não ter havido erros importantes na genotipagem, uma técnica, embora altamente eficaz, passível de ocorrência de erros experimentais.

As frequências alélicas observadas neste trabalho foram 0,95 e 0,05 para os alelos C e G em pacientes com SMet e controles. Esses dados encontram-se em conformidade com resultados prévios observados para ambos os grupos (129, 130). Contudo, não dispomos de dados para comparação destes indivíduos com a população brasileira.

De modo semelhante a outros trabalhos da literatura, não foi possível demonstrar nesta pesquisa, nenhuma correlação entre a variante Pro12Ala e o risco de SMet, nem qualquer efeito significativo deste polimorfismo sobre quaisquer variáveis bioquímicas, antropométricas e hemodinâmicas avaliadas, que estão inseridas no contexto da SMet.

Um estudo populacional francês com 1155 indivíduos, incluindo 279 homens e mulheres com SMet, de acordo com os critérios do NCEP / ATP III, concluiu que nenhum dos polimorfismos estudados, incluindo o Pro12Ala, foi relacionado de forma isolada com o risco de desenvolvimento da SMet. (5).

Um pequeno estudo realizado com 253 mulheres coreanas diagnosticadas com SMet (critérios do NCEP / ATP III) não observou associação desta síndrome

com os genótipos analisados. Verificou-se não haver diferenças entre IMC, PA, glicemia de jejum, insulina de jejum e HOMA nos portadores Ala quando comparados com os não portadores (7).

Com o objetivo de investigar a associação com a SMet dos polimorfismos C1431T e Pro12Ala, bem como seus haplótipos e diplótipos em população iraniana com 340 indivíduos (175 pacientes com SMet e 165 controles normais), Rooki et al. observaram haver diferença significativa nas frequências dos genótipos C1431T entre indivíduos com SMet e controles. Todavia, nenhuma associação foi encontrada com o Pro12A (131).

Li et al. investigaram os polimorfismos C1431T e Pro12Ala em 423 chineses com SMet e concluíram que o Pro12Ala não se encontrava associado à síndrome diferentemente do C1431T (132). Outro estudo chinês, com 792 pacientes da cidade de Pequim, analisou as correlações entre os genótipos C161T e Pro12Ala com RI e SMet. Seus autores mostraram que ambos os polimorfismos estavam associados a RI, mas não conseguiram determinar associação com os componentes da SMet (129).

Por fim, meta-análise recente, sugeriu que o efeito do polimorfismo Pro12Ala não pode ser relacionada com a SMet como uma entidade. Contudo, Pro12Ala poderia afetar individualmente os componentes desta síndrome (6).

Diferentemente, apenas um inquérito populacional e transversal argentino com 572 pacientes verificou que o genótipo Pro / Ala (e o alelo Ala12) foi associado a um alto risco para a SMet e RI, especialmente entre os homens saudáveis não fumantes (4).

Ressaltamos que uma limitação neste estudo é o tamanho da amostra relativamente pequena. Sendo assim, outros estudos com bases populacionais maiores entre indivíduos de mesma etnia são necessários para ratificar os resultados aqui apresentados.

6 CONCLUSÃO

A distribuição genotípica e alélica do polimorfismo Pro12Ala do gene PPAR γ na população de Brasília é similar àquela encontrada em grupos populacionais de diversas origens étnicas, e não difere da observada em pacientes portadores de SMet, sugerindo não haver correlação de risco do polimorfismo com a doença.

Além disso, nosso estudo não mostrou associação do polimorfismo Pro12Ala de PPAR γ com quaisquer das variáveis antropométricas (peso, altura, IMC, CC), bioquímicas (colesterol total, LDL-c, HDL-c, TGL e glicemia) e hemodinâmicas (PAS, PAD), na população com SMet.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Grundy SM. Metabolic syndrome pandemic. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008 Apr;28(4):629-36.
2. Lopez-Jaramillo P, Sanchez RA, Diaz M, Cobos L, Bryce A, Parra-Carrillo JZ, et al. [Latin American consensus on hypertension in patients with diabetes type 2 and metabolic syndrome]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* Apr;58(3):205-25.
3. Gonzalez Sanchez JL, Serrano Rios M, Fernandez Perez C, Laakso M, Martinez Larrad MT. Effect of the Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma-2 gene on adiposity, insulin sensitivity and lipid profile in the Spanish population. *Eur J Endocrinol.* 2002 Oct;147(4):495-501.
4. Tellechea ML, Aranguren F, Perez MS, Cerrone GE, Frechtel GD, Taverna MJ. Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene is associated with metabolic syndrome and surrogate measures of insulin resistance in healthy men: interaction with smoking status. *Circ J.* 2009 Nov;73(11):2118-24.
5. Meirhaeghe A, Cottel D, Amouyel P, Dallongeville J. Association between peroxisome proliferator-activated receptor gamma haplotypes and the metabolic syndrome in French men and women. *Diabetes.* 2005 Oct;54(10):3043-8.
6. Zhang R, Wang J, Yang R, Sun J, Chen R, Luo H, et al. Effects of Pro12Ala polymorphism in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 gene on metabolic syndrome risk: a meta-analysis. *Gene.* Feb 1;535(1):79-87.
7. Rhee EJ, Oh KW, Lee WY, Kim SY, Oh ES, Baek KH, et al. Effects of two common polymorphisms of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene on metabolic syndrome. *Arch Med Res.* 2006 Jan;37(1):86-94.
8. Montagnana M, Fava C, Nilsson PM, Engstrom G, Hedblad B, Lippi G, et al. The Pro12Ala polymorphism of the PPARG gene is not associated with the metabolic syndrome in an urban population of middle-aged Swedish individuals. *Diabet Med.* 2008 Aug;25(8):902-8.
9. Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes.* 1988 Dec;37(12):1595-607.
10. Bruce KD, Byrne CD. The metabolic syndrome: common origins of a multifactorial disorder. *Postgrad Med J.* 2009 Nov;85(1009):614-21.

11. Kassi E, Pervanidou P, Kaltsas G, Chrousos G. Metabolic syndrome: definitions and controversies. *BMC Med.*9:48.
12. Azhar S. Peroxisome proliferator-activated receptors, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Future Cardiol.* Sep;6(5):657-91.
13. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med.* 1998 Jul;15(7):539-53.
14. Balkau B, Charles MA. Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Diabet Med.* 1999 May;16(5):442-3.
15. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation.* 2002 Dec 17;106(25):3143-421.
16. Kahn R, Buse J, Ferrannini E, Stern M. The metabolic syndrome: time for a critical appraisal: joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care.* 2005 Sep;28(9):2289-304.
17. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet.* 2005 Sep 24-30;366(9491):1059-62.
18. Grundy SM, Brewer HB, Jr., Cleeman JI, Smith SC, Jr., Lenfant C. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 Feb;24(2):e13-8.
19. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation.* 2009 Oct 20;120(16):1640-5.
20. Cornier MA, Dabelea D, Hernandez TL, Lindstrom RC, Steig AJ, Stob NR, et al. The metabolic syndrome. *Endocr Rev.* 2008 Dec;29(7):777-822.
21. Ogden CL, Carroll MD, Kit BK, Flegal KM. Prevalence of obesity in the United States, 2009-2010. *NCHS Data Brief.* Jan(82):1-8.

22. Falkner B, Cossrow ND. Prevalence of metabolic syndrome and obesity-associated hypertension in the racial ethnic minorities of the United States. *Curr Hypertens Rep.* Jul;16(7):449.
23. Marquez-Sandoval F, Macedo-Ojeda G, Viramontes-Horner D, Fernandez Ballart JD, Salas Salvado J, Vizmanos B. The prevalence of metabolic syndrome in Latin America: a systematic review. *Public Health Nutr.* Oct;14(10):1702-13.
24. de Carvalho Vidigal F, Bressan J, Babio N, Salas-Salvado J. Prevalence of metabolic syndrome in Brazilian adults: a systematic review. *BMC Public Health.*13:1198.
25. Lebovitz HE, Banerji MA. Point: visceral adiposity is causally related to insulin resistance. *Diabetes Care.* 2005 Sep;28(9):2322-5.
26. Swinburn BA, Sacks G, Hall KD, McPherson K, Finegood DT, Moodie ML, et al. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. *Lancet.* Aug 27;378(9793):804-14.
27. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 2000;894:i-xii, 1-253.
28. Bluher M. Adipose tissue dysfunction in obesity. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2009 Jun;117(6):241-50.
29. Decaria JE, Sharp C, Petrella RJ. Scoping review report: obesity in older adults. *Int J Obes (Lond).* Sep;36(9):1141-50.
30. Frayn KN, Karpe F, Fielding BA, Macdonald IA, Coppack SW. Integrative physiology of human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2003 Aug;27(8):875-88.
31. Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab.* 2000 Oct;11(8):327-32.
32. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Jun;89(6):2548-56.
33. Makki K, Froguel P, Wolowczuk I. Adipose Tissue in Obesity-Related Inflammation and Insulin Resistance: Cells, Cytokines, and Chemokines. *ISRN Inflamm.* Dec 22;2013:139239.
34. Trayhurn P. Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat. *Acta Physiol Scand.* 2005 Aug;184(4):285-93.
35. Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev.* 2000 Dec;21(6):697-738.

36. Klaus S. Adipose tissue as a regulator of energy balance. *Curr Drug Targets*. 2004 Apr;5(3):241-50.
37. Shen W, Wang Z, Punyanita M, Lei J, Sinav A, Kral JG, et al. Adipose tissue quantification by imaging methods: a proposed classification. *Obes Res*. 2003 Jan;11(1):5-16.
38. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*. Feb;11(2):85-97.
39. Proenca AR, Sertie RA, Oliveira AC, Campana AB, Caminhotto RO, Chimin P, et al. New concepts in white adipose tissue physiology. *Braz J Med Biol Res*. Feb;47(3):192-205.
40. Arner E, Westermark PO, Spalding KL, Britton T, Ryden M, Frisen J, et al. Adipocyte turnover: relevance to human adipose tissue morphology. *Diabetes*. Jan;59(1):105-9.
41. Edens NK, Fried SK, Kral JG, Hirsch J, Leibel RL. In vitro lipid synthesis in human adipose tissue from three abdominal sites. *Am J Physiol*. 1993 Sep;265(3 Pt 1):E374-9.
42. Basu A, Basu R, Shah P, Vella A, Rizza RA, Jensen MD. Systemic and regional free fatty acid metabolism in type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001 Jun;280(6):E1000-6.
43. Nielsen S, Guo Z, Johnson CM, Hensrud DD, Jensen MD. Splanchnic lipolysis in human obesity. *J Clin Invest*. 2004 Jun;113(11):1582-8.
44. Ferrante AW, Jr. Obesity-induced inflammation: a metabolic dialogue in the language of inflammation. *J Intern Med*. 2007 Oct;262(4):408-14.
45. Hutley L, Prins JB. Fat as an endocrine organ: relationship to the metabolic syndrome. *Am J Med Sci*. 2005 Dec;330(6):280-9.
46. Wang CC, Goalstone ML, Draznin B. Molecular mechanisms of insulin resistance that impact cardiovascular biology. *Diabetes*. 2004 Nov;53(11):2735-40.
47. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet*. 2005 Apr 16-22;365(9468):1415-28.
48. Tchernof A, Despres JP. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol Rev*. Jan;93(1):359-404.
49. Newell-Price J, Bertagna X, Grossman AB, Nieman LK. Cushing's syndrome. *Lancet*. 2006 May 13;367(9522):1605-17.

50. Pivonello R, De Martino MC, De Leo M, Lombardi G, Colao A. Cushing's Syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2008 Mar;37(1):135-49, ix.
51. Macfarlane DP, Forbes S, Walker BR. Glucocorticoids and fatty acid metabolism in humans: fuelling fat redistribution in the metabolic syndrome. *J Endocrinol.* 2008 May;197(2):189-204.
52. Wei L, MacDonald TM, Walker BR. Taking glucocorticoids by prescription is associated with subsequent cardiovascular disease. *Ann Intern Med.* 2004 Nov 16;141(10):764-70.
53. Arnaldi G, Scandali VM, Trementino L, Cardinaletti M, Appolloni G, Boscaro M. Pathophysiology of dyslipidemia in Cushing's syndrome. *Neuroendocrinology.* 92 Suppl 1:86-90.
54. Mancini T, Kola B, Mantero F, Boscaro M, Arnaldi G. High cardiovascular risk in patients with Cushing's syndrome according to 1999 WHO/ISH guidelines. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2004 Dec;61(6):768-77.
55. Stewart PM. Tissue-specific Cushing's syndrome uncovers a new target in treating the metabolic syndrome--11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Clin Med.* 2005 Mar-Apr;5(2):142-6.
56. Xu C, He J, Jiang H, Zu L, Zhai W, Pu S, et al. Direct effect of glucocorticoids on lipolysis in adipocytes. *Mol Endocrinol.* 2009 Aug;23(8):1161-70.
57. Vegiopoulos A, Herzig S. Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases. *Mol Cell Endocrinol.* 2007 Sep 15;275(1-2):43-61.
58. Fain JN, Cheema P, Tichansky DS, Madan AK. Stimulation of human omental adipose tissue lipolysis by growth hormone plus dexamethasone. *Mol Cell Endocrinol.* 2008 Nov 25;295(1-2):101-5.
59. Giestas A, Palma I, Ramos MH. [Renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) and its pharmacologic modulation]. *Acta Med Port.* Jul-Aug;23(4):677-88.
60. Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev.* 2007 Sep;59(3):251-87.
61. Giacchetti G, Sechi LA, Rilli S, Carey RM. The renin-angiotensin-aldosterone system, glucose metabolism and diabetes. *Trends Endocrinol Metab.* 2005 Apr;16(3):120-6.

62. Wei Y, Sowers JR, Nistala R, Gong H, Uptergrove GM, Clark SE, et al. Angiotensin II-induced NADPH oxidase activation impairs insulin signaling in skeletal muscle cells. *J Biol Chem*. 2006 Nov 17;281(46):35137-46.
63. Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*. 1990 Oct 18;347(6294):645-50.
64. Feige JN, Gelman L, Michalik L, Desvergne B, Wahli W. From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. *Prog Lipid Res*. 2006 Mar;45(2):120-59.
65. Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med*. 2002;53:409-35.
66. Yu JG, Javorschi S, Hevener AL, Kruszynska YT, Norman RA, Sinha M, et al. The effect of thiazolidinediones on plasma adiponectin levels in normal, obese, and type 2 diabetic subjects. *Diabetes*. 2002 Oct;51(10):2968-74.
67. Nawrocki AR, Rajala MW, Tomas E, Pajvani UB, Saha AK, Trumbauer ME, et al. Mice lacking adiponectin show decreased hepatic insulin sensitivity and reduced responsiveness to peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J Biol Chem*. 2006 Feb 3;281(5):2654-60.
68. Michalik L, Auwerx J, Berger JP, Chatterjee VK, Glass CK, Gonzalez FJ, et al. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol Rev*. 2006 Dec;58(4):726-41.
69. Tontonoz P, Spiegelman BM. Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu Rev Biochem*. 2008;77:289-312.
70. Ahmed W, Ziouzenkova O, Brown J, Devchand P, Francis S, Kadakia M, et al. PPARs and their metabolic modulation: new mechanisms for transcriptional regulation? *J Intern Med*. 2007 Aug;262(2):184-98.
71. Brown JD, Plutzky J. Peroxisome proliferator-activated receptors as transcriptional nodal points and therapeutic targets. *Circulation*. 2007 Jan 30;115(4):518-33.
72. Guo L, Tabrizchi R. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma as a drug target in the pathogenesis of insulin resistance. *Pharmacol Ther*. 2006 Jul;111(1):145-73.
73. Ricote M, Glass CK. PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Aug;1771(8):926-35.

74. Straus DS, Glass CK. Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: new insights on cellular and molecular mechanisms. *Trends Immunol.* 2007 Dec;28(12):551-8.
75. Gurevich I, Flores AM, Aneskievich BJ. Corepressors of agonist-bound nuclear receptors. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007 Sep 15;223(3):288-98.
76. Yu S, Reddy JK. Transcription coactivators for peroxisome proliferator-activated receptors. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Aug;1771(8):936-51.
77. Willson TM, Brown PJ, Sternbach DD, Henke BR. The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *J Med Chem.* 2000 Feb 24;43(4):527-50.
78. Kintscher U, Law RE. PPARgamma-mediated insulin sensitization: the importance of fat versus muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005 Feb;288(2):E287-91.
79. Semple RK, Chatterjee VK, O'Rahilly S. PPAR gamma and human metabolic disease. *J Clin Invest.* 2006 Mar;116(3):581-9.
80. Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, et al. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell.* 1999 Oct;4(4):611-7.
81. Duan SZ, Ivashchenko CY, Whitesall SE, D'Alecy LG, Duquaine DC, Brosius FC, 3rd, et al. Hypotension, lipodystrophy, and insulin resistance in generalized PPARgamma-deficient mice rescued from embryonic lethality. *J Clin Invest.* 2007 Mar;117(3):812-22.
82. Yki-Jarvinen H. Thiazolidinediones. *N Engl J Med.* 2004 Sep 9;351(11):1106-18.
83. Dongiovanni P, Valenti L. Peroxisome proliferator-activated receptor genetic polymorphisms and nonalcoholic Fatty liver disease: any role in disease susceptibility? *PPAR Res.* 2013:452061.
84. Kersten S, Mandard S, Escher P, Gonzalez FJ, Tafuri S, Desvergne B, et al. The peroxisome proliferator-activated receptor alpha regulates amino acid metabolism. *FASEB J.* 2001 Sep;15(11):1971-8.
85. Sharma AM, Staels B. Review: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and adipose tissue--understanding obesity-related changes in regulation of lipid and glucose metabolism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Feb;92(2):386-95.
86. Fuentes E, Guzman-Jofre L, Moore-Carrasco R, Palomo I. Role of PPARs in inflammatory processes associated with metabolic syndrome (Review). *Mol Med Rep.* Dec;8(6):1611-6.

87. Roszer T, Ricote M. PPARs in the Renal Regulation of Systemic Blood Pressure. *PPAR Res.* 2010;698730.
88. Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene.* 1999 Jul 8;234(2):177-86.
89. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science.* 2001 Feb 16;291(5507):1304-51.
90. Yen CJ, Beamer BA, Negri C, Silver K, Brown KA, Yarnall DP, et al. Molecular scanning of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma (hPPAR gamma) gene in diabetic Caucasians: identification of a Pro12Ala PPAR gamma 2 missense mutation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 Dec 18;241(2):270-4.
91. Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, Pihlajamaki J, Mykkanen L, Kuusisto J, et al. A Pro12Ala substitution in PPARgamma2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nat Genet.* 1998 Nov;20(3):284-7.
92. Mirzaei H, Akrami SM, Golmohammadi T, Doosti M, Heshmat R, Nakhjavani M, et al. Polymorphism of Pro12Ala in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 gene in Iranian diabetic and obese subjects. *Metab Syndr Relat Disord.* 2009 Oct;7(5):453-8.
93. Ben Ali S, Ben Yahia F, Sediri Y, Kallel A, Ftouhi B, Feki M, et al. Gender-specific effect of Pro12Ala polymorphism in peroxisome proliferator-activated receptor gamma-2 gene on obesity risk and leptin levels in a Tunisian population. *Clin Biochem.* 2009 Nov;42(16-17):1642-7.
94. Milewicz A, Tworowska-Bardzinska U, Dunajska K, Jedrzejuk D, Lwow F. Relationship of PPARgamma2 polymorphism with obesity and metabolic syndrome in postmenopausal Polish women. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2009 Nov;117(10):628-32.
95. Chistiakov DA, Potapov VA, Khodirev DS, Shamkhalova MS, Shestakova MV, Nosikov VV. The PPARgamma Pro12Ala variant is associated with insulin sensitivity in Russian normoglycaemic and type 2 diabetic subjects. *Diab Vasc Dis Res.* Jan;7(1):56-62.
96. Huguenin GV, Rosa G. The Ala allele in the PPAR-gamma2 gene is associated with reduced risk of type 2 diabetes mellitus in Caucasians and improved insulin sensitivity in overweight subjects. *Br J Nutr.* Aug;104(4):488-97.
97. Namvaran F, Azarpira N, Rahimi-Moghaddam P, Dabbaghmanesh MH. Polymorphism of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma)

- Pro12Ala in the Iranian population: relation with insulin resistance and response to treatment with pioglitazone in type 2 diabetes. *Eur J Pharmacol.* Dec 5;671(1-3):1-6.
98. Oh EY, Min KM, Chung JH, Min YK, Lee MS, Kim KW, et al. Significance of Pro12Ala mutation in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 in Korean diabetic and obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 May;85(5):1801-4.
99. Bhatt SP, Misra A, Sharma M, Luthra K, Guleria R, Pandey RM, et al. Ala/Ala genotype of Pro12Ala polymorphism in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 gene is associated with obesity and insulin resistance in Asian Indians. *Diabetes Technol Ther.* Sep;14(9):828-34.
100. Mori Y, Kim-Motoyama H, Katakura T, Yasuda K, Kadowaki H, Beamer BA, et al. Effect of the Pro12Ala variant of the human peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 gene on adiposity, fat distribution, and insulin sensitivity in Japanese men. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 Oct 9;251(1):195-8.
101. Malecki MT, Frey J, Klupa T, Skupien J, Walus M, Mlynarski W, et al. The Pro12Ala polymorphism of PPARgamma2 gene and susceptibility to type 2 diabetes mellitus in a Polish population. *Diabetes Res Clin Pract.* 2003 Nov;62(2):105-11.
102. Guo WL, Tang Y, Han XY, Ji LN. [Meta-analysis of the association of Pro12Ala polymorphism of peroxisome proliferator activated receptor gamma gene with type 2 diabetes in Chinese Han population]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao.* Dec;33(6):593-9.
103. Tong JY, Huang N, Wang L, Yi YS, Pan XH, Lu Y. [Relationship between PPARgamma2 Pro12Ala polymorphism and type 2 diabetes mellitus in Chinese Han population: a Meta-analysis]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi.* Apr;46(4):359-63.
104. Gaggini M, Morelli M, Buzzigoli E, DeFronzo RA, Bugianesi E, Gastaldelli A. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and its connection with insulin resistance, dyslipidemia, atherosclerosis and coronary heart disease. *Nutrients.* May;5(5):1544-60.
105. Hooper AJ, Adams LA, Burnett JR. Genetic determinants of hepatic steatosis in man. *J Lipid Res.* Apr;52(4):593-617.
106. Mavrogiannaki AN, Migdalis IN. Nonalcoholic Fatty liver disease, diabetes mellitus and cardiovascular disease: newer data. *Int J Endocrinol.* 2013:450639.
107. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of

Liver Diseases, and American College of Gastroenterology. *Gastroenterology*. Jun;142(7):1592-609.

108. Rey JW, Noetel A, Hardt A, Canbay A, Alakus H, Zur Hausen A, et al. Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 in patients with fatty liver diseases. *World J Gastroenterol*. Dec 14;16(46):5830-7.

109. Yang Z, Wen J, Li Q, Tao X, Ye Z, He M, et al. PPARG gene Pro12Ala variant contributes to the development of non-alcoholic fatty liver in middle-aged and older Chinese population. *Mol Cell Endocrinol*. Jan 2;348(1):255-9.

110. Gawrieh S, Marion MC, Komorowski R, Wallace J, Charlton M, Kissebah A, et al. Genetic variation in the peroxisome proliferator activated receptor-gamma gene is associated with histologically advanced NAFLD. *Dig Dis Sci*. Apr;57(4):952-7.

111. Dongiovanni P, Rametta R, Fracanzani AL, Benedan L, Borroni V, Maggioni P, et al. Lack of association between peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma2 polymorphisms and progressive liver damage in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a case control study. *BMC Gastroenterol*.10:102.

112. Wang J, Guo X, Wu P, Song J, Ye C, Yu S, et al. Association between the Pro12Ala polymorphism of PPAR-gamma gene and the non-alcoholic fatty liver disease: a meta-analysis. *Gene*. Oct 10;528(2):328-34.

113. Domenici FA, Brochado MJ, Martinelli Ade L, Zucoloto S, da Cunha SF, Vannucchi H. Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma2 polymorphisms in nonalcoholic fatty liver disease: a study in Brazilian patients. *Gene*. Oct 25;529(2):326-31.

114. Yang J, Gong H, Liu W, Tao T. The association of Pro12Ala polymorphism in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 gene with the metabolic characteristics in Chinese women with polycystic ovary syndrome. *Int J Clin Exp Pathol*.6(9):1894-902.

115. Huang X, Zhao J, Zhao T. Effects of peroxisome proliferator activated receptor-gamma 2 gene Pro12Ala polymorphism on fasting blood lipids: a meta-analysis. *Atherosclerosis*. Mar;215(1):136-44.

116. Gao L, Wang L, Yun H, Su L, Su X. Association of the PPARgamma2 gene Pro12Ala variant with primary hypertension and metabolic lipid disorders in Han Chinese of Inner Mongolia. *Genet Mol Res*.9(3):1312-20.

117. Hamada T, Kotani K, Tsuzaki K, Sano Y, Murata T, Tabata M, et al. Association of Pro12Ala polymorphism in the peroxisome proliferator-activated

receptor gamma2 gene with small dense low-density lipoprotein in the general population. *Metabolism*. 2007 Oct;56(10):1345-9.

118. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988 Feb 11;16(3):1215.

119. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res*. 1989 Apr 11;17(7):2503-16.

120. Vieira-Filho JP, Reis AF, Kasamatsu TS, Tavares EF, Franco LJ, Matioli SR, et al. Influence of the polymorphisms Tpr64Arg in the beta 3-adrenergic receptor gene and Pro12Ala in the PPAR gamma 2 gene on metabolic syndrome-related phenotypes in an indigenous population of the Brazilian Amazon. *Diabetes Care*. 2004 Feb;27(2):621-2.

121. Rooki H, Haerian MS, Azimzadeh P, Ebrahimi M, Mirhafez R, Ferns G, et al. Distribution and genotype frequency of the C1431T and pro12ala polymorphisms of the peroxisome proliferator activator receptor gamma gene in an Iranian population. *Indian J Hum Genet*. Oct;19(4):423-9.

122. Li LL, Ma XL, Ran JX, Sun XF, Xu LM, Ren J, et al. Genetic polymorphism of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 Pro12Ala on ethnic susceptibility to diabetes in Uygur, Kazak and Han subjects. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2008 Feb;35(2):187-91.

123. Orio F, Jr., Matarese G, Di Biase S, Palomba S, Labella D, Sanna V, et al. Exon 6 and 2 peroxisome proliferator-activated receptor-gamma polymorphisms in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003 Dec;88(12):5887-92.

124. Valve R, Sivenius K, Miettinen R, Pihlajamaki J, Rissanen A, Deeb SS, et al. Two polymorphisms in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene are associated with severe overweight among obese women. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 Oct;84(10):3708-12.

125. Kao WH, Coresh J, Shuldiner AR, Boerwinkle E, Bray MS, Brancati FL. Pro12Ala of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 gene is associated with lower serum insulin levels in nonobese African Americans: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Diabetes*. 2003 Jun;52(6):1568-72.

126. Doney AS, Fischer B, Cecil JE, Boylan K, McGuigan FE, Ralston SH, et al. Association of the Pro12Ala and C1431T variants of PPAR γ and their haplotypes with susceptibility to Type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2004 Mar;47(3):555-8.
127. Mossner R, Meyer P, Jankowski F, Konig IR, Kruger U, Kammerer S, et al. Variations in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene and melanoma risk. *Cancer Lett*. 2007 Feb 8;246(1-2):218-23.
128. Moffett SP, Feingold E, Barmada MM, Damcott CM, Marshall JA, Hamman RF, et al. The C161-->T polymorphism in peroxisome proliferator-activated receptor gamma, but not P12A, is associated with insulin resistance in Hispanic and non-Hispanic white women: evidence for another functional variant in peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Metabolism*. 2005 Nov;54(11):1552-6.
129. Dongxia L, Qi H, Lisong L, Jincheng G. Association of peroxisome proliferator-activated receptorgamma gene Pro12Ala and C161T polymorphisms with metabolic syndrome. *Circ J*. 2008 Apr;72(4):551-7.
130. Frederiksen L, Brodbæk K, Fenger M, Jorgensen T, Borch-Johnsen K, Madsbad S, et al. Comment: studies of the Pro12Ala polymorphism of the PPAR-gamma gene in the Danish MONICA cohort: homozygosity of the Ala allele confers a decreased risk of the insulin resistance syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Aug;87(8):3989-92.
131. Rooki H, Haerian MS, Azimzadeh P, Mirhafez R, Ebrahimi M, Ferns G, et al. Associations between C1431T and Pro12Ala variants of PPARgamma gene and their haplotypes with susceptibility to metabolic syndrome in an Iranian population. *Mol Biol Rep*. May;41(5):3127-33.
132. Yang LL, Hua Q, Liu RK, Yang Z. Association between two common polymorphisms of PPARgamma gene and metabolic syndrome families in a Chinese population. *Arch Med Res*. 2009 Feb;40(2):89-96.

ANEXO I - QUESTIONÁRIO



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
 FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
 LABORATÓRIO DE FARMACOLOGIA MOLECULAR
 CAMPUS UNIVERSITÁRIO DARCY RIBEIRO, BRASÍLIA - DF
 TELEFONE (061) 3107-2000, E-mail: farmol@unb.br

FICHA DE AVALIAÇÃO

Projeto: “INVESTIGAÇÃO DO POLIMORFISMO PRO12ALA NO GENE DO RECEPTOR ATIVADO POR PROLIFERADOR DE PEROXISSOMO-GAMA (PPAR γ) EM PACIENTES COM SÍNDROME METABÓLICA”

Paciente número:

Data:

Dados de identificação:

Nome:	
Data de Nascimento:	Sexo: F () M ()
Número de registro no HUB:	
Profissão (<i>se aposentado, anotar profissão anterior</i>):	
Endereço:	
Telefones de contato:	

Dados demográficos

Grau de escolaridade (<i>anotar até que ano ou série frequentou a escola</i>):	
Renda mensal estimada do paciente:	
Renda mensal estimada da família:	
Número de pessoas na residência:	

Hábitos de vida

Tabagismo:		
No de cigarros/dia:	Duração:	Se parou, há quanto tempo:
Etilismo	Tipo de bebida:	
Quanto consome/dia:	Duração:	Se parou, há quanto tempo:
Atividade Física		
Tipo:	Frequência:	Quanto tempo por dia:

Diabetes

Diabetes	
Data do diagnóstico (ano):	
Complicações crônicas: Retinopatia: () Nefropatia: () Neuropatia: ()	
Tratamentos anteriores do diabetes	
Histórico familiar de diabetes (<i>anotar parente e, se possível, tipo de DM</i>)	

Doenças coexistentes

Medicamentos

Nome	Dose

Parâmetros clínicos

Pressão Arterial (mmHg):	Peso (kg):	CA (cm):
Altura (m):	IMC (kg/m ²):	CQ (cm):

Parâmetros bioquímicos (Data: / /)

Glicemia de jejum:	Colesterol total:
Glicemia pós-prandial	HDL:
Hemoglobina glicada	LDL:
Triglicerídeo:	VLDL:
Insulina:	PCR US:
Ureia:	Creatinina:
DCE (<i>clearance</i> de creatinina):	Microalbuminúria:
Fundoscopia:	

Parâmetros ecográficos

Esteatose hepática: sim () não ()	Data da ecografia:
Grau: leve () moderada () grave ()	

**ANEXO II - APROVAÇÃO EM COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA EM SERES
HUMANOS DA FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA**



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA - CEP/FS-UNB



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação de polimorfismo Pro12Ala no gene do receptor ativado por proliferador de peroxissomo em pacientes com Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica

Pesquisador: Renato Marano Rocha

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 3

CAAE: 19170613.4.0000.0030

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 539.705

Data da Relatoria: 05/02/2014

Apresentação do Projeto:

A patogênese da doença hepática gordurosa ainda é pouco conhecida, e a elucidação dos mecanismos genéticos associados a esse contexto pode contribuir para uma melhor compreensão dos fatores de susceptibilidade e dos componentes relacionados ao desenvolvimento dessa doença. Nesse trabalho, pretendemos investigar a associação do polimorfismo Pro12Ala no gene PPAR α com o desenvolvimento de DHGNA, através da análise da prevalência desse polimorfismo em pacientes com a doença, em comparação com indivíduos saudáveis, numa população brasileira.

Objetivo da Pesquisa:

1. Investigar a prevalência do polimorfismo Pro12Ala no gene PPAR α em indivíduos saudáveis e em pacientes portadores de síndrome metabólica, com ou sem diagnóstico de DHGNA.
2. Correlacionar a presença do polimorfismo Pro12Ala no gene PPAR α com a ocorrência de DHGNA, nessa população.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

no item conclusões

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-900
 UF: DF Município: BRASÍLIA
 Telefone: (61)3107-1947 Fax: (61)3307-3799 E-mail: cepfs@unb.br



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA - CEP/FS-UNB

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação de polimorfismo Pro12Ala no gene do receptor ativado por proliferador de peroxissomo em pacientes com Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica

Pesquisador: Renato Marano Rocha

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 3

CAAE: 19170613.4.0000.0030

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 539.705

Data da Relatoria: 05/02/2014

Apresentação do Projeto:

A patogênese da doença hepática gordurosa ainda é pouco conhecida, e a elucidação dos mecanismos genéticos associados a esse contexto pode contribuir para uma melhor compreensão dos fatores de susceptibilidade e dos componentes relacionados ao desenvolvimento dessa doença. Nesse trabalho, pretendemos investigar a associação do polimorfismo Pro12Ala no gene PPAR γ com o desenvolvimento de DHGNA, através da análise da prevalência desse polimorfismo em pacientes com a doença, em comparação com indivíduos saudáveis, numa população brasileira.

Objetivo da Pesquisa:

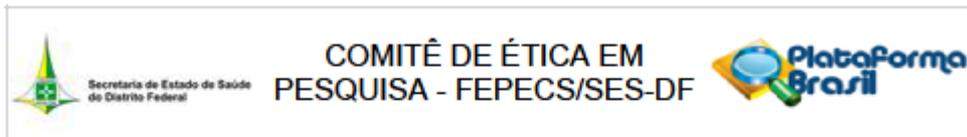
1. Investigar a prevalência do polimorfismo Pro12Ala no gene PPAR γ em indivíduos saudáveis e em pacientes portadores de síndrome metabólica, com ou sem diagnóstico de DHGNA.
2. Correlacionar a presença do polimorfismo Pro12Ala no gene PPAR γ com a ocorrência de DHGNA, nessa população.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

no item conclusões

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1947 **Fax:** (61)3307-3799 **E-mail:** cepfs@unb.br

**ANEXO III - APROVAÇÃO EM COMITÊ DE ÉTICA DA FUNDAÇÃO
HEMOCENTRO - SECRETARIA DE SAÚDE DO DISTRITO FEDERAL**



COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA - FEPECS/SES-DF



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Associação entre o comprimento de Telômeros e a presença de Diabetes Mellitus Tipo 2 em pacientes do Hospital Universitário de Brasília.

Pesquisador: ERICA CARINE CAMPOS CALDAS ROSA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 23433013.4.0000.5553

Instituição Proponente: FUNDAÇÃO HEMOCENTRO DE BRASÍLIA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 484.091

Data da Relatoria: 02/12/2013

Apresentação do Projeto:

Sem alterações em relação ao PARECER CEP/DF Nº 459.752.

Objetivo da Pesquisa:

Sem alterações em relação ao PARECER CEP/DF Nº 459.752.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Sem alterações em relação ao PARECER CEP/DF Nº 459.752.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Em atendimento às recomendações desse CEP, parecer nº 459.752, foi elaborado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e detalhamento do desenho da pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de Rosto; Projeto de Pesquisa em Português; Termo de Consentimento Livre e Esclarecido; Critérios de Inclusão e Exclusão; Orçamento do Projeto de Pesquisa com financiador; Curriculum vitae dos pesquisadores; Termos de Concordância. FORAM APRESENTADOS.

Recomendações:

Foram atendidos as recomendações do PARECER CEP/DF Nº 459.752.

Endereço: SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS
Bairro: ASA NORTE **CEP:** 70.710-904
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3325-4955 **Fax:** (33)3325-4955 **E-mail:** comiteetica.secretaria@gmail.com



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Associação entre o comprimento de Telômeros e a presença de Diabetes Mellitus Tipo 2 em pacientes do Hospital Universitário de Brasília.

Pesquisador: ERICA CARINE CAMPOS CALDAS ROSA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 23433013.4.0000.5553

Instituição Proponente: FUNDAÇÃO HEMOCENTRO DE BRASÍLIA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 484.091

Data da Relatoria: 02/12/2013

Apresentação do Projeto:

Sem alterações em relação ao PARECER CEP/DF Nº 459.752.

Objetivo da Pesquisa:

Sem alterações em relação ao PARECER CEP/DF Nº 459.752.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Sem alterações em relação ao PARECER CEP/DF Nº 459.752.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Em atendimento às recomendações desse CEP, parecer nº 459.752, foi elaborado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e detalhamento do desenho da pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de Rosto; Projeto de Pesquisa em Português; Termo de Consentimento Livre e Esclarecido; Critérios de Inclusão e Exclusão; Orçamento do Projeto de Pesquisa com financiador; Curriculum vitae dos pesquisadores; Termos de Concordância. FORAM APRESENTADOS.

Recomendações:

Foram atendidos as recomendações do PARECER CEP/DF Nº 459.752.

Endereço: SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS
Bairro: ASA NORTE **CEP:** 70.710-904
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3325-4955 **Fax:** (33)3325-4955 **E-mail:** comitedeetica.secretaria@gmail.com