
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA MOTRICIDADE

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES EM GÊMEOS MONOZIGÓTICOS: IMPACTO
DA APTIDÃO CARDIORRESPIRATÓRIA**

MARCOS ROBERTO QUEIROGA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do
Campus de Rio Claro, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos para obtenção
do título de Doutor em Ciências da Motricidade, área
de concentração, Biodinâmica da Motricidade
Humana.

Rio Claro - SP
Outubro - 2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - CAMPUS DE RIO CLARO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA MOTRICIDADE
BIODINÂMICA DA MOTRICIDADE HUMANA

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES EM GÊMEOS MONOZIGÓTICOS: IMPACTO DA APTIDÃO
CARDIORRESPIRATÓRIA

MARCOS ROBERTO QUEIROGA

ORIENTADOR: PROF. DR. EDUARDO KOKUBUN

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de Rio Claro-SP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências da Motricidade - área de concentração, Biodinâmica da Motricidade Humana.

RIO CLARO - SP

Outubro - 2010



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE RIO CLARO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE RIO CLARO

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Análise da expressão de genes em gêmeos monozigóticos. Impacto da aptidão cardiorrespiratória

AUTOR: MARCOS ROBERTO QUEIROGA

ORIENTADOR: Prof. Dr. EDUARDO KOKUBUN

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR em CIÊNCIAS DA MOTRICIDADE, Área: BIODINÂMICA DA MOTRICIDADE HUMANA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. EDUARDO KOKUBUN

Departamento de Educação Física / Instituto de Biociências de Rio Claro


Prof. Dra. ELIETE LÚCIANO

Departamento de Educação Física / Instituto de Biociências de Rio Claro


Prof. Dra. ROSARIO DOMINGUEZ CRESPO HIRATA

Universidade de São Paulo / Faculdade de Ciências Farmacêuticas / São Paulo / SP


Prof. Dra. ANGELINA ZANESCO

Departamento de Educação Física / Instituto de Biociências de Rio Claro


Prof. Dr. MARIO HIROYUKI HIRATA

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas / Universidade de São Paulo

Data da realização: 02 de outubro de 2010.

575.1 Q3a	<p>Queiroga, Marcos Roberto</p> <p>Análise da expressão de genes em gêmeos monozigóticos: impacto da aptidão cardiorrespiratória / Marcos Roberto Queiroga. - Rio Claro : [s.n.], 2010</p> <p>88 f. : il., figs., tabs., quadros</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro</p> <p>Orientador: Eduardo Kokubun</p> <p>1. Genética. 2. Modelo de gêmeos monozigóticos (MZ). 3. Controle de casos (discordantes). 4. Expressão gênica. 5. Canal de potássio dependente de ATP (KATP). 6. Adipocinas. 7. PPARg. I. Título.</p>
--------------	--

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho *In Memoriam* a Carmem Izabel Queiroga, minha irmã querida, que por seu amor, confiança e apoio irrestrito tornou possível a realização de todas as minhas conquistas acadêmicas e profissionais.

AGRADECIMENTOS

São muitos os que merecem ser lembrados neste espaço, porém gostaria de desculpar aos que não foram citados, mas jamais esquecidos do que realmente representam para minha vida. Portanto, agradeço a todos aqueles (citados ou não) que direta ou indiretamente contribuíram para que pudesse concretizar mais um objetivo acadêmico, meu respeito e gratidão, e em particular:

A minha esposa Sandra e ao nosso filho Nicolas que me acompanharam nesta jornada e abdicaram de momentos preciosos de nosso convívio para a realização deste estudo, meu eterno amor.

Aos meus pais Antônio e Dolores, aos meus irmãos (Osmar, Ismael, Vanderlei e Júnior), irmãs (Dalila e Olga) e sobrinhos(as) que depositaram em mim toda a confiança e respeito necessários para a concretização de mais este objetivo, minha especial homenagem.

Ao meu sogro e sogra (José Arildo e Olinda) e a toda família Ferreira (Hylceya, Ricardo e Tiago) que por tantas vezes nos ajudaram e apoiaram espiritualmente na realização de nossos sonhos.

Ao Prof. Dr. Eduardo Kokubun, que por seu apoio, competência e experiência, orientou-me durante o desenvolvimento do programa de doutoramento e na realização desta tese, minha gratidão.

Ao prof. Dr. Mario Hiroyuki Hirata e a sua esposa Prof^a. Dra. Rosario Dominguez Crespo Hirata, coordenadores do Laboratório de Biologia Molecular Aplicado ao Diagnóstico (LABMAD) da FCF/USP pelo apoio incondicional a realização deste estudo, minha profunda gratidão.

Aos estabelecimentos de ensino (Escolas) e ao Laboratório de análises clínicas Hemodiag de Rio Claro, que por meio de suas Direções, Funcionários e Pessoal Administrativo oportunizaram o acesso aos gêmeos e familiares, bem como a colheita e análise de parte do material que tornaram possível a realização deste estudo.

Aos órgãos públicos CAPES e a Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO-Guarapuava-PR) que forneceram apoio financeiro necessário ao desenvolvimento do programa de doutorado, meus agradecimentos.

Aos mestres e amigos das Universidades que freqüentei na Graduação (UEL) e no Mestrado (UFSC) com quem estudei e compartilhei agradáveis momentos, minha admiração.

A todos os professores da UNESP que dividiram conhecimentos e momentos de alegria, em particular aos Profs. Sebastião e Lilian Gobbi, nossa profunda amizade e respeito.

A todos os pais e filhos (gêmeos) que gentilmente aceitaram participar deste estudo, meus sinceros agradecimentos.

Aos amigos e amigas que conhecemos em **Rio Claro**, Ricardo Barbieri, Camila, Priscila, Gleber, Américo, Inaian, Rodrigo, Betinho, Paula Ribeiro, Grace, Rogério Almeida, Roseni Grissi, Raquel, Danila, Deco, André, Claudinho, Colméinha (Leandro), Kátia, Rômulo, Carlos, Fabinho, Gustavão, Alessandro Zagatto, Zé Curiacos, China, Clarisse e Beto (laboratório), Fernando, Flávia, Salma, Andrézinho (mentira), Andrei, Morróida e Chau (república), e em **São Paulo**, Prof Mário e Profª Rosario, André Luchessi, Vivian Silbiger, Joas, Carla, Cristina, Lídio (LABMAD/USP) e muitos outros que compartilharam momentos de muito trabalho e alegria; vocês estão eternamente em nossos corações.

Aos nossos queridos amigos Fernando, Flávia, Salma, Danila, André Magaldi e Cia pelo apoio irrestrito e companheirismo em todas as nossas aventuras, sentiremos muitas saudades.

Aos funcionários do Restaurante Universitário, da Pós-Graduação, SAEPE e da Biblioteca da UNESP, nosso respeito e reconhecimento aos serviços prestados.

Aos amigos e professores do Departamento de Educação Física de Guarapuava (DEDUF/G), em especial a Larissa, Silvano, Luizão, Itamar, Zé Ronaldo e Schelyne.

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES EM GÊMEOS MONOZIGÓTICOS: IMPACTO DA APTIDÃO CARDIORRESPIRATÓRIA

RESUMO

Estudos experimentais revelam que uma baixa aptidão cardiorrespiratória (VO_2 máx) está associada a distúrbios moleculares e bioquímicas que influenciam a sensibilidade e a secreção de insulina. Contudo, não está bem definido se esta associação é confundida por fatores genéticos. Utilizando o modelo de controle de casos (gêmeos monozigóticos (MZ) discordantes) este estudo, de caráter transversal, avaliou 38 pares de gêmeos MZ com idade entre 11 a 18 anos, dos quais nove pares demonstraram diferença média intra-par para o VO_2 máx de $13,5 \pm 3,7$ ml.kg⁻¹.min⁻¹ ($30,6 \pm 9,5\%$). O objetivo foi investigar o impacto da discordância no VO_2 máx nas concentrações bioquímicas de glicose, insulina, lipídios, leptina, interleucina 6 e na expressão do mRNA dos genes SUR1, KIR6.2, IL6, LEPTINA e PPARg, independente de efeitos genéticos. Foram obtidas as medidas antropométricas de massa corporal, estatura, circunferência da cintura (CC) e espessuras de dobras cutâneas (EDC). Um teste de esforço máximo em esteira rolante com análise direta dos gases foi utilizado para a determinação do VO_2 máx e uma colheita de sangue em jejum e pós-carga de glicose (TOTG) para a realização de exames laboratoriais, extração dos genes e estimativa do índice HOMA-RI e HOMA-β. A expressão do mRNA dos genes foi quantificada e avaliada por RT-PCR enquanto as variáveis laboratoriais foram determinadas por kits específicos. Os resultados revelaram maior adiposidade corporal (soma de 6 EDC), índice HOMA (RI e β), concentração sanguínea de leptina, insulina em jejum e pós-carga (2 h) favorecendo as meninas, enquanto os meninos demonstraram maior VO_2 máx. Correlação negativa foi observada entre o VO_2 máx e os indicadores de obesidade (IMC, CC e adiposidade), índice HOMA (RI e β) e concentração sanguínea de leptina, insulina em jejum e pós-

carga (2 h) e, correlação positiva com a expressão do gene PPAR γ . A respeito dos pares discordantes, observou-se que os co-gêmeos mais aptos ($45,9 \pm 10,0$ ml.kg⁻¹.min⁻¹) apresentaram significativamente menor concentração de glicose em jejum e maior expressão do gene PPAR γ em relação aos menos aptos ($32,4 \pm 10,6$ ml.kg⁻¹.min⁻¹). Nós concluímos que quando os fatores genéticos são controlados, crianças e adolescentes com menor VO₂máx são suscetíveis a apresentar maior concentração de glicose em jejum e menor expressão do mRNA do gene PPAR γ . Considerando que valores elevados de leptina, insulina, adiposidade corporal e índices HOMA e menor expressão do gene PPAR γ são fatores de risco bem estabelecidos para resistência à insulina e diabetes tipo 2, este estudo evidencia que um aumento no VO₂máx pode exercer efeitos determinantes no metabolismo de glicose de crianças e adolescentes. Porém, a importância da aptidão cardiorrespiratória observada nesta amostra não se restringe a associações e relações com fatores de risco metabólicos, implica também em provocar mudanças moleculares e bioquímicas (genótipo e fenótipo) independentes de efeitos genéticos.

Palavras chave: Expressão gênica. Canal de potássio dependente de ATP (K_{ATP}). Adipocinas. PPAR γ . Modelo de gêmeos MZ controle de casos.

GENE EXPRESSION ANALYSIS IN MONOZYGOTIC TWINS: IMPACT OF CARDIORESPIRATORY FITNESS

ABSTRACT

Experimental studies have shown that low cardiorespiratory fitness ($VO_2\text{max}$) is associated with molecular and biochemical disturbances that influence insulin sensitivity and secretion. However, it is not defined whether this association is confounded by genetic factors. Using the monozygotic co-twin case-control, this cross-sectional study evaluated 38 MZ twins pairs from 11 to 18 years of age, of which nine pairs presented a mean intrapair difference in $VO_2\text{max}$ of $13.5 \pm 3.7 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ($30.6 \pm 9.5\%$). The objective was to investigate the impact of the discordances of $VO_2\text{max}$ on biochemical concentrations of glucose, insulin, lipids, leptin, and interleukin 6, as well as in genes SUR1, Kir6.2, IL6, leptin and PPARgamma mRNA expression, independent of genetic effects. We obtained the anthropometric measures of body weight, height, waist circumference (WC) and skinfold thickness (ST). The maximal treadmill test with direct analysis of inhaled and exhaled gases was used for determination of $VO_2\text{max}$, as well as fasting and oral glucose tolerance tests (OGTT) blood sample collections for laboratory analysis, gene extraction and estimation of HOMA-IR and HOMA- β indexes. mRNA genes expression was quantified and evaluated by RT-PCR, while laboratory variables were determined using specific kits. The results showed greater body adiposity (sum of 6 STs), HOMA (IR and β) indexes, blood leptin concentration and fasting and post load (2 h) insulin levels in girls, while boys showed greater $VO_2\text{max}$. Negative correlation was found between $VO_2\text{max}$ and indicators of obesity (BMI, WC and fatness), HOMA (IR and β) indexes and blood leptin concentration and fasting and post load (2 h) insulin levels and positive correlation with PPARgamma gene expression. Regarding the discordant pairs, we observed that the co-twins with the highest $VO_2\text{max}$ values ($45.9 \pm 10.0 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) had

significantly lower concentrations of fasting glucose and increased expression of the gene PPARgamma, when compared to the co-twins with the lowest VO_{2max} values ($32.4 \pm 10.6 \text{ ml}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$). We conclude that when genetic factors are controlled, children and adolescents with lower VO_{2max} are likely to have higher concentrations of fasting glucose and lower PPARgamma mRNA gene expression. Taking into consideration that high levels of leptin, insulin, adiposity and HOMA and low PPARgamma gene expression are well established risk factors for insulin resistance and type 2 diabetes, this study shows that an increase in VO_{2max} can have decisive effects on the glucose metabolism in children and adolescents. However, the importance of cardiorespiratory fitness, observed in this sample, is not restricted to associations and relations with metabolic risk factors, as it also means to cause molecular and biochemical changes (genotype and phenotype), independent of genetic effects.

Key words: Gene expression. ATP dependent potassium channels (K_{ATP}). Adipokines. PPARgamma. Monozygotic co-twin case-control.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	iv
AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	vii
ABSTRACT.....	ix
SUMÁRIO	xi
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVOS.....	21
2.1. OBJETIVO GERAL	21
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	22
3.1. Aptidão cardiorrespiratória e sensibilidade à insulina	22
3.2. Aptidão cardiorrespiratória e expressão de genes	24
3.3. Aptidão cardiorrespiratória em crianças e jovens	27
3.4. Papel da Leptina e da interleucina 6 (IL6) na sensibilidade à insulina.....	30
3.5. Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma (PPAR).....	34
3.6. Papel dos canais de potássio sensíveis ao ATP (KATP) na secreção de insulina.....	36
3.7. Pressupostos para utilização de gêmeos como modelo de pesquisas	39
3.8. Análise de gêmeos MZ (modelo controle de casos)	41
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1. Casuística	43
4.2. Procedimentos e coleta dos dados	44
4.2.1. Medidas antropométricas.....	45
4.2.2. Avaliação da aptidão cardiorrespiratória e estabelecimento dos grupos concordantes e discordantes	45

4.2.3. Amostras biológicas	46
4.2.4. Teste oral de tolerância a glicose (TOTG)	47
4.3. Determinação dos parâmetros laboratoriais	47
4.3.1. Cálculos dos índices Homa-RI e Homa-Beta (β)	47
4.4. Utilização das técnicas de biologia molecular	48
4.4.1. Isolamento e avaliação do RNA total	48
4.4.2. Análise da expressão de mRNA por meio da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR)	48
4.4.3. Determinação da zigosidade com base em microssatélites do DNA	50
4.5. Análise estatística	51
5. RESULTADOS	52
5.1. Descrição da amostra	52
5.2. Relação entre VO ₂ máx com idade, características físicas, expressão gênica e variáveis bioquímicas em gêmeos MZ	56
5.3. Comparação entre irmãos gêmeos discordantes e concordantes para aptidão cardiorrespiratória	58
6. DISCUSSÃO	61
6.1. Comparação entre meninos e meninas	61
6.2. Correlação entre VO ₂ máx, idade, características físicas, variáveis bioquímicas e a expressão do mRNA dos genes em gêmeos MZ	63
6.3. Estudo controle de casos	65
7. CONCLUSÃO	72
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
ANEXO. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	87
APÊNDICE. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	88

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1. Nível de aptidão cardiorrespiratória em crianças e adolescentes	29
QUADRO 2. Classificação da aptidão cardiorrespiratória de crianças e adolescentes Brasileiros	29
4.1. Casuística	43
QUADRO 3. Levantamento de crianças e adolescentes gêmeos de 11 a 18 anos do mesmo sexo localizados em 2008 nas Escolas Estaduais e Particulares do Município de Rio Claro-SP	44
QUADRO 4. Iniciadores e sondas utilizadas na PCR em tempo real	49
QUADRO 5. Determinação da zigosidade por meio de microssatélites do DNA dos gêmeos participantes	52

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Idade, características físicas e VO ₂ máx de 38 pares de gêmeos MZ (n=76)	53
TABELA 2. Características das concentrações bioquímicas de 38 pares de gêmeos MZ (n=76)	54
TABELA 3. Valor de expressão gênica (Δ Ct) em gêmeos MZ	55
TABELA 4. Relação entre VO ₂ máx, idade e características físicas de gêmeos MZ	56
TABELA 5. Relação entre VO ₂ máx e as variáveis bioquímicas em gêmeos MZ	57
TABELA 6. Relação entre VO ₂ máx e a expressão gênica em pares de gêmeos MZ	57
5.3. Comparação entre irmãos gêmeos discordantes e concordantes para aptidão cardiorrespiratória.	58
TABELA 7. Comparação entre as variáveis físicas e bioquímicas de 38 pares de gêmeos MZ com maior (9 pares) e menor (29 pares) diferença intra-par para o VO ₂ máx (\neq dentro dos pares)	59
TABELA 8. Comparação entre valores da expressão gênica (Δ Ct) de 19 pares de gêmeos MZ com maior (4 pares) e menor (15 pares) diferença intra-par para o VO ₂ máx (\neq dentro dos pares)	60

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Esquema representativo da secreção de insulina nas células beta pancreática, estimulada pelo aumento na concentração de glicose plasmática	38
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

- ABCC8 (SUR1): Genes which encode subunit SUR 1 ou Receptor de Sulfoniluréia 1
- ACSM: *American College of Sports Medicine* ou Colégio Americano de Medicina do Esporte
- AdipoQ: Adiponectina
- AdipoR1/R2: Receptores de Adiponectina 1 e 2
- AGL: Ácido Graxo Livre
- AMPK: Proteína Quinase Ativada por AMP
- BRCA1 e BRCA2: Breast Cancer 1 and 2, early onset
- CAPN10: Gene da Calpaína-10
- CC: Circunferência da cintura (ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca)
- CDC: *Centers for Disease Control and Prevention*
- cDNA: Ácido Desoxiribonucleico Complementar
- CEIS: Centro de Estudos de Insetos Sociais (IB-UNESP)
- cm: Centímetros
- *Ct*: *Cycle treshold*
- DEXA: *Dual-Energy X-ray Absorptiometry* ou Absortometria Radiológica de Dupla Energia
- DM2: Diabetes Melito não Insulino Dependente ou Diabetes Tipo 2
- DP (\pm): Desvio Padrão
- DZ: Gêmeos Dizigóticos ou fraternos
- EDC: Espessura de Dobras Cutâneas
- EDN1: Gene Endotelina-1
- EDTA: *Ethylenediamine Tetraacetic Acid* ou Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
- FITNESSGRAM: Programa de Aptidão Física
- FTO: *Fat Mass and Obesity Associated*
- GAPDH: Gliceraldeído 3 Fosfato Desidrogenase
- Glic 2h: Glicemia Pós-Carga
- Glic jej: Glicemia em Jejum
- GLUT2: Proteína Transportadora de Glicose 2
- GLUT4: Proteína Transportadora de Glicose 4
- HDL-Colesterol: Lipoproteínas de Alta Densidade
- HOMA-IR: *Homeostatic Model Assessment Method for Insulin Resistance*

- HOMA- β : *Homeostatic Model Assessment Method for Insulin Secretion*
- IGF-1: Fator de Crescimento *insulin-like 1*
- IL6: Interleucina 6
- IMC: Índice de Massa Corporal
- Ins 2h: Insulina Pós-Carga
- Ins jej: Insulina em Jejum
- K_{ATP} : *Adenosine-triphosphate-sensitive potassium channels* ou Canais de potássio dependentes de ATP ou canais de potássio sensíveis ao ATP
- KCNJ11 (KIR6.2): *Potassium (K^+) inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 11, which encode subunit Kir6.2*
- kg/m^2 : Kilogramas por metro quadrado
- kg: Kilogramas
- KIR6.2: *Inwardly rectifying potassium channel* ou retificador interno do canal de potássio
- l/min: Litros por Minuto
- LBMA: Laboratório de Biologia Molecular Aplicado ao Diagnóstico (USP-FCF)
- LDL-Colesterol: Lipoproteínas de Baixa Densidade
- MC: Massa Corporal
- mg/dL: Miligramas por Decilitro
- $ml \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$: Mililitros de oxigênio consumidos por quilo de peso corporal por minuto
- mL: Mililitro
- MM: Massa Muscular
- mRNA: Ácido Ribonucléico Mensageiro
- MZ: Gêmeos Monozigóticos ou idênticos
- NAFES: Núcleo de Atividade Física, Esporte e Saúde (IB-UNESP)
- NCHS: National Center for Health Statistics
- NF κ B: *Nuclear Factor κ B*
- ng: Nanograma
- PAI-1: Inibidor do Ativador de Plasminogênio 1
- PCR: Reação em Cadeia de Polimerase
- pg/mL: Picogramas por Mililitro
- PGC-1 β e PGC-1 α : Coativadores do PPAR γ
- PPAPs: *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor* ou Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissoma

- PPAR γ ou PPAR γ : *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma* ou Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma gama
- PPAR α : Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma alfa
- PPAR δ/β : Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma delta/beta
- Primer: Oligonucleotídeo iniciador (iniciadores)
- Pro12Ala: Substituição da Prolina por Alanina no códon 12
- r: Coeficiente de Correlação de Pearson
- rho: Coeficiente de Correlação de Spearman
- RI: Resistência à Insulina
- RNA: Ácido Ribonucléico
- RT-PCR: Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia de Polimerase
- SLC2A2: *Solute Carrier Family 2 - Facilitated Glucose Transporter, Member 2, GLUT2*
- SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*
- STR: *Short Tandem Repeat* ou Sequências Curtas Repetidas em Tandem
- TCF7L2: *Transcription Factor 7 like-2*
- TG: Triacilgliceróis ou Triglicérides
- TGF- β : Fator Transformador de Crescimento- β
- TNF α : Fator de Necrose Tumoral Alfa
- TOTG: Teste Oral de Tolerância à Glicose
- UCP3: *Uncoupling proteins 3*
- VO₂máx: Volume (Consumo) Máximo de Oxigênio
- α : Alfa
- β : Beta
- δ : Delta
- Δ Ct: Delta Ct
- μ L: Microlitros
- μ U/ml: micro unidades por mililitros
- mmol/L: milimol por litro
- \neq : Diferença
- ♀: Sexo Feminino
- ♂: Sexo Masculino

1. INTRODUÇÃO

A quantidade de atividades físicas realizadas por crianças e jovens tem reduzido de forma dramática nos últimos anos (CDC, 2002; GORDON-LARSEN *et al.*, 2004; RIDDOCH *et al.*, 2004; KIMM *et al.*, 2002; HILL & PETERS, 1998; KIMM *et al.*, 2005; LATINI *et al.*, 2009). Antecipando as evidências de que a maioria das doenças associadas à prática insuficiente de atividades físicas que se manifesta na vida adulta, inicia na infância e adolescência (PARSONS *et al.*, 1999), nos últimos anos tem se observado que o diabetes melito não insulino dependente ou diabetes tipo 2 (DM2) está sendo diagnosticado frequentemente entre os jovens (ROSEMBLOOM *et al.*, 1999; RAMACHANDRAN *et al.*, 2003; PINHAS-HAMIEL *et al.*, 1996; FAGOT-CAMPAGNA *et al.*, 2001; KANG *et al.*, 2002; IMPERATORE *et al.*, 2006). A preocupação não é mais que uma criança com um determinado fator de risco possa se tornar um adulto doente, mas sim às complicações que este fator de risco vem provocando já na infância, que incluem transtornos emocionais e alterações no metabolismo de glicose e lipídios.

Num passado recente o DM2 era considerado um distúrbio metabólico com baixa prevalência populacional e ainda de manifestação tardia (adultos e idosos) e não uma condição pediátrica (ARSLANIAN, 2002). Atualmente, figura entre as doenças crônico-degenerativas de maior crescimento e com perspectiva de difundir-se ainda mais. A projeção para 2030 é que supere a quantidade de 366 milhões de portadores no planeta (WILD *et al.*, 2004). Apesar da estreita relação com fatores genéticos, o aumento acentuado na prevalência de DM2 em um espaço relativamente pequeno de tempo tem sido associado à adoção de hábitos e comportamentos ao estilo de vida atual. De acordo com Booth & Lees (2007) mudanças ocorridas no estilo de vida do homem moderno, comparado ao seu ancestral, estão provocando anormalidades na expressão de genes que tem sido associada à elevada incidência de DM2. Relata-se ainda que muitos destes genes ainda desempenham funções para a qualidade de vida, porém agora causando morte prematura mediante doenças crônicas produzidas pela deficiência de um comportamento que foi determinante para a sobrevivência de nossos antepassados, a atividade física.

O DM2 é uma desordem caracterizada por concentrações elevadas de glicose plasmática. Por sua vez, a tolerância normal a glicose é o produto de um equilíbrio entre sensibilidade à insulina nos tecidos (ação) e a função das células beta (β) pancreática (secreção). Por isso, defeitos nestas condições metabólicas são considerados anormalidades primárias e precoces para o desenvolvimento do DM2 (BALKAU & CHARLES, 1999; REAVEN, 1984; BECK-NIELSEN *et al.*, 2003; SHULMAN, 2000; DeFRONZO, 1988). Deve-se destacar que deficiências na sensibilidade e na secreção de insulina estão relacionadas a um grande número de variáveis ambientais e genéticas. Neste sentido, foram

identificados diversos genes e compostos protéicos e não protéicos que agem sobre a membrana das células β , adipócitos e outros tecidos do organismo provocando alterações marcantes no metabolismo de glicose via secreção e ação da insulina.

Na sensibilidade à insulina destacam-se o receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPARg), que integra a família dos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAPs) e algumas adipocinas como a Interleucina 6 (IL6) e a Leptina. Além dos efeitos sobre a sensibilidade à insulina e ao DM2, o PPARg e as adipocinas supramencionadas também estão associadas a outras disfunções como aterosclerose, dislipidemias e a hipertensão arterial (ISSEMAN & GREEN, 1990; LYON *et al.*, 2003; RAJALA & SCHERER, 2003; AHIMA & FLIER, 2000; TRAYHURN & BEATTIE, 2001; STEINBERGER *et al.*, 2003). Mecanismos que afetam o metabolismo de glicose, porém no que diz respeito à regulação da secreção de insulina, foram descobertos após evidências de que a atividade das células β pancreática é regulada pelos canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}). Estes canais são formados por duas subunidades; uma subunidade atua como um sensor de ATP/ADP do canal e é conhecida como receptor de Sulfoniluréia 1 (SUR1) e a outra subunidade forma o poro do canal e é denominada *Inwardly Rectifying Potassium Channel* ou retificador interno do canal de potássio (KIR6.2).

Apesar das recentes descobertas, os mecanismos pelos quais os marcadores genéticos e bioquímicos afetam a sensibilidade e a secreção de insulina, permanecem incertos. Adicionalmente, evidências confirmaram que genes candidatos bem como marcadores bioquímicos associados à sensibilidade e secreção de insulina interagem com fatores ambientais, como a atividade física, e determinam desenvolvimento de DM2. A prática regular de atividades físicas e uma maior aptidão cardiorrespiratória ($VO_2máx$) são considerados fatores comportamentais/ambientais determinantes na prevenção e tratamento de DM2 via influências na ação e secreção de insulina (SCHMITZ *et al.*, 2002; KASA-VUBU *et al.*, 2005; QI *et al.*, 2008). Foi observado em diversos estudos que em condições de descontrole metabólico ou mediante prática de atividades físicas a expressão do PPARg, das adipocinas e dos K_{ATP} sofrem alterações que afetam o metabolismo de glicose (RANKINEN *et al.*, 2007; KELLER *et al.*, 2003; MEIER & GRESSNER, 2004; PATTI *et al.*, 2003; BLÜHER *et al.*, 2006; ANDREASEN *et al.*, 2008; KILPELÄINEN *et al.*, 2007).

Muitos pesquisadores têm aproveitado as ferramentas provenientes da biologia molecular para investigar efeitos da atividade física, do desempenho físico e da aptidão cardiorrespiratória em base molecular. Neste sentido, está se formando um corpo de conhecimento para se compreender o papel das atividades físicas, incluindo a aptidão cardiorrespiratória, na expressão do mRNA de genes considerados candidatos a diversas enfermidades. Alguns destes estudos têm demonstrado resultados de alterações funcionais e metabólicas decisivas para o desenvolvimento ou prevenção de doenças

crônicas como o DM2 por meio do aumento na sensibilidade ou secreção de insulina (FRANCAUX, 2009; BOOTH & LEES, 2007; BLÜHER *et al.*, 2006; KILPELÄINEN *et al.*, 2008).

Porém, o conhecimento gerado até o momento, em relação à expressão de genes e aptidão cardiorrespiratória (VO_2 máx), ao mesmo tempo em que fornece informações valiosas, abre espaço para duas considerações com relação à utilização dos resultados. Uma diz respeito às transformações metabólicas que acompanham o processo de envelhecimento. Neste contexto, um interessante trabalho demonstrou que a concentração de adiponectina (AdipoQ) em crianças e adolescentes é dependente da idade (PUNTHAKEE *et al.*, 2006). Da mesma forma, a expressão dos genes que influenciam a concentração de lipídios plasmáticos, lipoproteínas e apolipoproteínas também sofre alterações com a idade (SNIEDER *et al.*, 1997), enquanto há relatos de que a expressão de coativadores do PPAR γ (PGC-1 α e PGC-1 β) encontra-se reduzida com o envelhecimento (LING *et al.*, 2004). Isto significa que se a concentração de uma determinada proteína for dependente da idade, os efeitos provenientes da aptidão cardiorrespiratória na expressão de alguns genes não poderão ser generalizados para crianças e adolescentes, uma vez que a amostra investigada na maioria dos estudos desta natureza é composta por adultos. A segunda diz respeito à contribuição de fatores genéticos para a expressão de nossas características (fenótipos). Assim, quando se investiga a expressão gênica ou outro indicador de sensibilidade e secreção de insulina em indivíduos ativos e não ativos, como é o caso dos estudos anteriores, as diferenças nos antecedentes genéticos dos sujeitos não têm sido consideradas. Isto é relevante tendo em vista que aproximadamente 66% da variação na sensibilidade à insulina é geneticamente determinada (NARKIEWICZ *et al.*, 1997).

Para esclarecer essas questões a primeira medida seria escolher uma população que incluísse uma amostra composta por crianças e adolescentes. A segunda, para avaliar o impacto da aptidão cardiorrespiratória (VO_2 máx) sobre variáveis bioquímicas e a expressão do mRNA de genes marcadores de sensibilidade e secreção de insulina, independente de efeitos (fatores) genéticos, seria necessário examinar gêmeos, mais especificamente, gêmeos monozigóticos (MZ) discordantes para o VO_2 máx (RÖNNEMAA *et al.*, 1997). O modelo de estudo que utiliza pares de gêmeos MZ discordantes para uma característica é conhecido como modelo controle de casos. Por sua vez, oferece uma ótima oportunidade para determinar se esta característica (fenótipo) age em outra variável, independente da genética (PIETILÄINEN *et al.*, 2005; SAMARAS *et al.*, 1999). Uma vez que os gêmeos MZ são geneticamente idênticos, a descoberta de concordância para uma determinada característica indica efeito genético, enquanto a discordância (diferenças intra-par) sugere efeito ambiental (MUSTELIN *et al.*, 2007).

Estudos têm confirmado, mediante diversos modelos científicos, que a aptidão cardiorrespiratória é um componente da aptidão física determinante na prevenção e tratamento do

DM2. Apesar dos recentes avanços, a causa de DM2 em muitos pacientes ainda é desconhecida. Porém, em última análise, o DM2 resulta de defeitos na afinidade da insulina nos tecidos (sensibilidade à insulina), da capacidade das células β pancreática secretarem insulina ou de ambas as condições. Portanto, investigar o papel da aptidão cardiorrespiratória em mecanismos moleculares e bioquímicos relacionados à ação e secreção de insulina parece de grande relevância para estabelecer mecanismos precisos de prevenção e tratamento para o DM2.

Dessa forma, considerando que o aumento da aptidão cardiorrespiratória está associada com melhorias na sensibilidade à insulina (QI *et al.*, 2008) e que a resistência à insulina nos tecidos e defeitos na sua secreção são influenciados por significativos fatores genéticos (NARKIEWICZ *et al.*, 1997; LEHTOVIRTA *et al.*, 2005), pretendemos verificar se a aptidão cardiorrespiratória é capaz de provocar mudanças nas concentrações bioquímicas de glicose, insulina, lipídios (HDL-C, LDL-C, TG, CT), leptina, IL6 e na expressão do mRNA dos genes SUR1, KIR6.2, IL6, LEPTINA e PPAR γ , independente da genética. Para tanto, utilizamos o modelo de gêmeos MZ discordantes para a aptidão cardiorrespiratória (VO_2 máx) com a finalidade de determinar se o co-gêmeo com menor VO_2 máx apresenta diferenças nas variáveis investigados em relação ao co-gêmeo com maior VO_2 máx.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar o impacto da discordância na aptidão cardiorrespiratória nas concentrações bioquímicas de glicose, insulina, lipídios, leptina, IL6 e na expressão do mRNA dos genes SUR1, KIR6.2, IL6, LEPTINA e PPARg em gêmeos monozigóticos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comparar a aptidão cardiorrespiratória, a expressão de genes e as variáveis laboratoriais entre meninos e meninas;

Demonstrar a relação entre VO_2 máx, expressão do mRNA dos genes SUR1, KIR6.2, IL6, LEPTINA e PPARg e variáveis laboratoriais em crianças e adolescentes;

Verificar a expressão do mRNA dos genes SUR1, KIR6.2, IL6, LEPTINA e PPARg e as concentrações de glicose, insulina, lipídios, leptina e IL6 em gêmeos MZ discordantes para o VO_2 máx.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Aptidão cardiorrespiratória e sensibilidade à insulina

O diabetes melitu não insulino dependente ou diabetes tipo 2 (DM2), é caracterizada pela elevada concentração sanguínea de glicose (BAIER & HANSON, 2004). Sua prevalência aumentou 33% no período de 1990 (4,9%) a 1998 (6,5%). Este crescimento foi observado em ambos os gêneros, todas as faixas etárias, grupos étnicos e níveis educacionais (MOKDAD *et al.*, 2000). Será uma das doenças mais comuns do século XXI e há algum tempo pesquisadores vem recomendando prioridade para sua prevenção (CHIASSON & RABASA-LHORET, 2004). Apesar de ser uma enfermidade predominantemente de indivíduos adultos e idosos é cada vez mais comum entre crianças e jovens (FAGOT-CAMPAGNA *et al.*, 2001). Pinhas-Hamiel *et al.* (1996) destacam que houve um aumento de dez vezes na incidência de DM2 em adolescentes entre 1982 a 1994.

Apesar do DM2 ser considerada uma enfermidade de caráter multifatorial, fortes evidências apontam para defeitos na secreção de insulina pelas células beta, para a ação reduzida nos tecidos (sensibilidade) ou ambos como as principais causas do DM2 (REAVEN, 1988, 1984; BECK-NIELSEN *et al.*, 1994, 2003; GOLDSTEIN, 2002; DeFRONZO, 1988). A resistência a insulina (RI), ou ação da insulina diminuída nos tecidos, é uma característica comum entre indivíduos com parentes de primeiro grau com DM2 e é geralmente observada antes de qualquer redução na secreção de insulina (LEHTOVIRTA *et al.*, 2000; ERIKSSON *et al.*, 1989). A RI e a hiperinsulinemia compensatória são condições que podem ser encontradas décadas antes do diagnóstico do DM2 (GOLDSTEIN, 2002; REUSCH, 2002; HOUMARD *et al.*, 1991). Estas evidências, além de elegerem a RI e a capacidade secretora das células beta como as causas de maior destaque para o desenvolvimento de DM2, sugerem que estes distúrbios iniciam na juventude.

Entre os fatores de risco que são encontrados com freqüência em pessoas com sensibilidade a insulina reduzida é a baixa aptidão cardiorrespiratória (IMPERATORE *et al.*, 2006) e o excesso de gordura corporal (BUNT *et al.*, 2003). Um hábito que tem sido incorporado ao comportamento de crianças e adolescentes com maior freqüência é a inatividade física (atividade física insuficiente). O consumo máximo de oxigênio ($VO_2\text{máx}$), que é um indicador de aptidão cardiorrespiratória, pode ser considerado uma parâmetro objetivo do status de aptidão física e/ou prática de atividade física diária. Frequentemente indivíduos diabéticos e resistentes à insulina possuem baixa aptidão cardiorrespiratória (KOHL *et al.*, 1992). Neste sentido, Lynch *et al.* (1996) demonstraram que valores de aptidão cardiorrespiratória superiores a $31 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ foram associados a um menor risco de

desenvolvimento de DM2 em adultos. Nyholm *et al.* (1996) verificaram o papel da aptidão física na RI em indivíduos com parentes de primeiro grau portadores de DM2 e compararam com indivíduos sem qualquer história de diabetes. Os pesquisadores observaram que as pessoas com história de diabetes demonstraram menor captação de glicose estimulada pela insulina no músculo esquelético quando comparados ao grupo controle. Esta anormalidade foi associada à baixa capacidade aeróbia. Indivíduos com baixa aptidão cardiorrespiratória possuem, respectivamente, 1,9 e 3,7 vezes mais risco de desenvolver intolerância a glicose e DM2 do que fisicamente ativos (WEI *et al.*, 1999).

Foi observado que o exercício físico além de melhorar a sensibilidade à insulina nos tecidos periféricos, também reduz as concentrações de insulina e de glicose plasmática em idosos e jovens (COKER *et al.*, 2006; KANG *et al.*, 2002). Estes benefícios estão associados ao aumento da ação supressora da insulina sobre a produção de glicose hepática (MIKINES *et al.*, 1989) e no aumento do número e da atividade dos receptores de glicose (GLUT4) no músculo esquelético (HOUMARD *et al.*, 1991). Evidências sugerem também que melhoras na sensibilidade à insulina associadas com o exercício físico estão relacionadas à expressão e/ou atividade das proteínas envolvidas na sinalização da insulina no tecido muscular esquelético como a proteína quinase ativada por AMP (AMPK) (HAWLEY & LESSARD, 2008).

Embora a sensibilidade à insulina seja menor em descendentes de parentes com DM2, sugerindo que as anormalidades metabólicas precoces resultem em parte de uma predisposição genética, a RI herdada pode ser prevenida a partir de um aumento na aptidão cardiorrespiratória (NYHOLM *et al.*, 2004). Isto apóia a noção de que a atividade física ajuda a prevenir distúrbios no metabolismo de glicose mesmo em grupos (predispostos) com alto risco de desenvolver diabetes (AHN *et al.*, 2004). Foi descrito que a atividade física aumenta a concentração de transportadores de glicose (GLUT4) nos tecidos alvo (GOODYEAR & KAHN, 1998), o que pode explicar um dos mecanismos pelo qual o exercício melhora a sensibilidade a insulina. A atividade física também pode melhorar a sensibilidade a insulina indiretamente pela indução a perda de peso e pelo aumento da massa magra. Parece não haver dúvidas de que o aumento da atividade física e da aptidão cardiorrespiratória é capaz de maximizar a ação de fatores benéficos e minimizar a ação de outros fatores, porém de risco, para as doenças crônicas como diabetes melitu, hipertensão e doença arterial coronária.

3.2. Aptidão cardiorrespiratória e expressão de genes

A atividade física regular e a aptidão cardiorrespiratória reduzem o risco de mortes por doenças cardiovasculares e metabólicas mediante uma multiplicidade de razões (KRAUS *et al.*, 2002; MANSON *et al.*, 2002; WEI *et al.*, 1999). Estudos demonstrando os efeitos da atividade física regular, exercício ou treinamento físico no aumento da aptidão cardiorrespiratória, da tolerância ao exercício, da massa muscular, da mineralização óssea, da sensibilidade à insulina, das lipoproteínas de alta densidade (HDL) e, na redução da pressão arterial, dos depósitos de gordura, das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), dos triglicérides (TG) sanguíneos e dos marcadores inflamatórios bem como suas inter-relações benéficas com fatores de risco cardiovasculares e metabólicos são encontrados em grande quantidade nas bases de busca.

Resultados de estudos de Coort Prospectivos e Clínicos Experimentais demonstram que a atividade física regular ou a aptidão cardiorrespiratória e mudanças no estilo de vida (dieta, controle do peso) podem prevenir o desenvolvimento de DM2 (KNOWLER *et al.*, 2002; TUOMILEHTO *et al.*, 2001). Adicionalmente, uma significativa proporção de variação nos fenótipos associados ao DM2 pode ser atribuída à genética. O risco de diabetes é aumentado na presença de determinados genes dos quais o TCF7L2, KCNJ11 (KIR6.2), ABCC8 (SUR1), AdipoQ, CAPN10, LEPTINA e o PPARg são os mais fortemente relacionados (FREEMAN & COX, 2006; QI *et al.*, 2008). Apesar das evidências as explicações de como os genes afetam ou contribuem para o desenvolvimento do DM2 é motivo de muita discussão. Mais recentemente, as técnicas da biologia molecular possibilitaram investigar o papel da atividade física na expressão de genes, associados a algum fenótipo, com interesse de quantificar a importância deste fator ambiental (atividade física) na saúde da população. Deve-se admitir que as pesquisas com genética, atividade física e saúde ainda estão em fase de gestação, no entanto já existem alguns indícios que permitem sugerir que a atividade física afeta a condição de saúde e a reconhecer que nosso genoma modula as associações entre atividade física e a saúde em múltiplos níveis.

Neste sentido, há evidências de interações entre atividade física e genótipo para doenças coronárias e câncer (HOKANSON *et al.*, 2003; KING *et al.*, 2003). Um estudo de Coort Prospectivo populacional demonstrou que o risco de desenvolver doenças em portadores de um polimorfismo no gene lipase hepática (LIPC-480C>T), preditor de doenças coronárias, foi 2,6 vezes maior em indivíduos com níveis de atividade física normal quando comparado a indivíduos portadores dos polimorfismos, porém que participavam de atividades físicas vigorosas (HOKANSON *et al.*, 2003). Outro trabalho mostrou que a atividade física regular e a ausência de obesidade na adolescência podem prorrogar o

início de câncer no seio entre mulheres que demonstram predisposição genética, ou seja, que são portadoras de mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 (KING *et al.*, 2003).

Em relação às adipocinas, foram determinados os níveis circulantes de adiponectina (AdipoQ) e a expressão de seus receptores AdipoR1/R2 no músculo esquelético de 140 pessoas com tolerância a glicose normal e reduzida. Parte da amostra (n=60) foi submetida a um programa de atividades físicas durante quatro semanas. Verificou-se que a atividade física melhorou a sensibilidade à insulina não apenas mediante aumento da AdipoQ circulante, mas também devido à maior expressão dos seus receptores (BLÜHER *et al.*, 2006). Uma vez que a concentração de AdipoQ é inversamente associada à obesidade, resistência à insulina e ao DM2 (WEYER *et al.*, 2001), o exercício neste caso poderá mediar uma melhora na sensibilidade a insulina em resposta ao treinamento físico. O padrão da expressão do gene da IL6 no tecido adiposo mediado pelo exercício foi investigado por Keller *et al.* (2003). Os pesquisadores concluíram que o exercício promove um aumento na expressão do gene IL6 no tecido adiposo. Contrariamente, Polak *et al.* (2006) não demonstraram efeitos do exercício na expressão de genes no tecido adiposo (AdipoQ, LEPTINA, TNF α , ou IL6) ou nos níveis plasmáticos de adipocinas (exceto leptina) em 25 mulheres obesas submetidas a três meses de treinamento aeróbio.

Efeitos da atividade física nos componentes moleculares das vias de fosforização oxidativa também são relatados. Em pacientes com DM2 a baixa capacidade aeróbia foi associada com reduzida expressão dos genes envolvidos com a fosforização oxidativa (MOOTHA *et al.*, 2003). Por um lado, esta relação demonstra que a capacidade aeróbia é um importante mecanismo de regulação da função mitocondrial mediante expressão de genes favoráveis. Por outro, sugere um componente genético para a capacidade aeróbia proveniente do metabolismo oxidativo. Um estudo realizado com gêmeos monozigóticos (idênticos) demonstrou que a obesidade e a baixa aptidão cardiorrespiratória provocam falhas na expressão de genes responsáveis pelo funcionamento das vias oxidativas mitocondriais do tecido adiposo (MUSTELIN *et al.*, 2008). Em função do controle rigoroso dos fatores genéticos adotados neste trabalho pode-se aceitar que a obesidade e a aptidão cardiorrespiratória adquiridas são fortes candidatos para controlar o metabolismo oxidativo.

Interações entre atividade física e polimorfismos do gene PPAR γ foram investigadas em um grupo de 479 homens de meia idade obesos com tolerância a glicose reduzida. Os participantes foram divididos em dois grupos um de intervenção (n=256) e outro controle (n=257). O grupo controle recebeu aconselhamentos individualizados sobre dieta e atividade física. Foram acompanhados durante 4 anos e a atividade física foi avaliada anualmente por questionário. Os pesquisadores demonstraram que o aumento na atividade física diminuiu o risco dos alelos (rs17036314, rs1801282 e rs1152003) causarem DM2 (KILPELÄINEN *et al.*, 2008). Em outros estudos, o exercício físico melhorou a sensibilidade a insulina em pacientes com DM2 mediante aumento da concentração de proteínas

musculares e da expressão dos genes PPAR δ , UCP3 (FRITZ *et al.*, 2006) e do GLUT4 (O'GORMAN *et al.*, 2006; CHRIST-ROBERTS *et al.*, 2004).

Enquanto os efeitos da atividade física na sensibilidade a insulina são bem conhecidos (HENRIKSEN, 2002) faltam informações em relação à influência da aptidão física na secreção de insulina. Por sua vez, há evidências demonstrando que o aumento da atividade física melhora a função das células beta sem alterar a sensibilidade à insulina (DELA *et al.*, 2004). Em um interessante estudo Kilpeläinen *et al.* (2007) demonstraram que a atividade física de intensidade moderada a vigorosa realizada por pessoas com tolerância a glicose reduzida pode modificar o risco de desenvolvimento de DM2 por meio da regulação de genes associados com a secreção de insulina (SUR1 e GLUT2).

Em um estudo de caráter longitudinal a expressão do gene endotelina-1 (EDN1), potente vasoconstritor endógeno, foi modulada pela atividade física e aptidão cardiorrespiratória em pacientes normotensos e hipertensos submetidos a 20 semanas de treinamento aeróbio. Embora todos os participantes do estudo possuíssem o genótipo, em indivíduos com menor capacidade aeróbia o risco de hipertensão foi duas vezes maior do que naqueles com maior capacidade (RANKINEN *et al.*, 2007).

Em uma investigação que reuniu 17.508 pessoas distribuídas em cinco grupos de estudos, os participantes de meia idade com menores níveis de atividade física apresentaram maior expressão do polimorfismo rs9939609 do gene FTO, associado com a obesidade e o DM2. Os resultados do estudo sugerem que os menores níveis de atividade física acentuam o efeito do gene no acúmulo de gordura corporal (ANDREASEN *et al.*, 2008). Este achado parece apoiar as declarações de Booth & Neuffer (2005) no qual admitem que a maior causa da epidemia de obesidade é o enorme declínio na atividade física causada pela revolução industrial e pela era da informática.

Em outro experimento, foi relatado que a atividade física de intensidade moderada ou vigorosa altera o risco de desenvolvimento de DM2 em pessoas com tolerância a glicose reduzida mediante efeitos sobre polimorfismos dos genes SUR1 e GLUT2 que, reconhecidamente, regulam a secreção de insulina (KILPELÄINEN *et al.*, 2007). Para os pesquisadores, a atividade física de intensidade vigorosa ou moderada pode modificar o risco de desenvolvimento de DM2 em pessoas com tolerância a glicose reduzida através da modulação de genes que regulam a secreção de insulina (SLC2A2, ABCC8).

Estes estudos demonstram que os efeitos gerados pela aptidão física em uma determinada doença ou distúrbio não são apenas indiretos ou superficiais. Em outras palavras, eles são de natureza molecular, promovendo alterações diretamente no mecanismo de síntese protéica. Um aumento na aptidão cardiorrespiratória e na atividade física provoca complexas mudanças transcricionais em tecidos alvo, como músculo esquelético, músculo liso e tecido adiposo, associados com melhora na sensibilidade a insulina, processos inflamatórios, metabolismo de gorduras e de carboidratos (TERAN-GARCIA *et al.*, 2005).

3.3. Aptidão cardiorrespiratória em crianças e jovens

A aptidão ou resistência cardiorrespiratória é entendida como a capacidade de realizar exercícios físicos dinâmicos de intensidade moderada a alta, envolvendo a participação de grandes grupos musculares por período de tempo prolongado (ACSM, 2000), enquanto o consumo máximo de oxigênio ($VO_2máx$) é a mais alta captação de oxigênio que um indivíduo pode alcançar durante um trabalho físico respirando ar ao nível do mar (ASTRAND & RODAHL, 1987).

Como é uma medida de capacidade funcional, muitas vezes a aptidão cardiorrespiratória é utilizada para dar uma idéia do estado atual de envolvimento de uma pessoa com a atividade física. A atividade física regular é considerada um elo importante para o aumento da aptidão física e da capacidade de realizar exercícios bem como dos benefícios para a saúde (De BACKER *et al.*, 2003). Apesar de parecer uma associação óbvia, a existência de uma relação direta entre $VO_2máx$ e atividade física diária têm sido defendida (BERTHOUIZE *et al.*, 1995) e contestada em adultos (GILL, 2007). Ao assumir a existência de relação entre $VO_2máx$ e atividade física, a aptidão cardiorrespiratória deverá ser compreendida como uma característica fisiológica determinada pelo comportamento ativo, o que levaria automaticamente a concluir que indivíduos mais ativos são mais aptos e vice-versa (GILL, 2007). Porém, os diferentes conceitos e significados dos termos aptidão física e atividade física, bem como a faixa etária investigada, fornecem munção para se contestar uma relação direta entre esses fenômenos. Dessa forma, aptidão física (que possui como principal componente o $VO_2máx$) descreve o quão bem um indivíduo pode executar uma tarefa, enquanto atividade física denota a quantidade de movimento (energia) que um indivíduo realiza (gasta) diariamente (ROWLAND, 2008). A determinação da aptidão cardiorrespiratória a partir da calorimetria indireta (troca de gases) fornece maior poder aos estudos que a empregam para identificar interações com outras variáveis, uma vez que a precisão das medidas de atividade física (questionários e levantamentos) são muito questionadas (QI *et al.*, 2008).

Em crianças e adolescentes apenas alguns estudos apresentam relações significantes entre atividade física habitual e o $VO_2máx$ e mesmo assim, são de magnitudes baixas (LOFTIN *et al.*, 1998). Talvez as respostas a essa baixa correlação estejam nas diferenças operacionais e fisiológicas existentes entre o $VO_2máx$ e a atividade física. Enquanto a atividade física diária é determinada, na maior parte das vezes, por influências psicológicas a aptidão aeróbia é um atributo físico determinado pelo $VO_2máx$. A primeira diz respeito a um comportamento enquanto o segundo é amplamente influenciado por fatores genéticos. É admitido que 10 a 50% da variância no $VO_2máx$ seja hereditário (BOUCHARD; MALINA & PÉRUSSE, 1997). Apesar de assumir enormes riscos ao classificar indivíduos como ativos (alta atividade física), porém inaptos (baixo VO_2) e, indivíduos inativos, porém

aptos, deve-se ressaltar que a maior influência para o desenvolvimento do VO_2 máx ainda é provocada por fatores ambientais.

Por um lado um indivíduo com altos valores de VO_2 máx poderia estar levando vantagem nesta condição em função de seu repertório genético e não necessariamente do seu envolvimento com as atividades físicas diárias. Por outro, fatores ambientais, incluindo a atividade física diária, poderiam estar realmente contribuindo para o maior VO_2 máx. Dessa forma, não se discute em demasia qual o fator mais importante para o estabelecimento dos níveis de aptidão cardiorrespiratória (genético ou ambiental, nature ou nurture) até por que o VO_2 máx é entendido como o produto da interação entre fatores genéticos com os ambientais (hábitos fisicamente ativos). Cabe aqui ainda salientar que os fatores genéticos parecem estabelecer limites para o que é alcançado pela atividade física.

É importante salientar ainda que o período correspondente à infância e adolescência é marcado pelo aumento progressivo do sistema cardiorrespiratório, com conseqüente aprimoramento do desempenho de resistência. Neste sentido, a aptidão aeróbia máxima aumenta conforme a criança cresce (ROWLAND, 2008). Em função dessas alterações fisiológicas e funcionais naturais, é possível assumir que na infância uma redução no VO_2 máx seria improvável, mesmo com pouca atividade física. Dessa forma envolvimento das crianças e adolescentes com as atividades físicas poderia contribuir ainda mais para um aumento no VO_2 máx.

Independente da significativa influência que os fatores genéticos exercem sobre a variação da aptidão cardiorrespiratória (VO_2 máx) é um consenso de que é o componente da aptidão física relacionada à saúde mais importante. Há evidências de que indivíduos com maior aptidão cardiorrespiratória (VO_2 máx) possuem maior longevidade, mais disposição, menor conteúdo de gordura corporal, melhor perfil lipídico e metabolismo de glicose, entre outras enormes vantagens (LAAKSONEN *et al.*, 2002).

Em relação ao desenvolvimento da aptidão cardiorrespiratória, ocorre um aumento do VO_2 max em termos absolutos (l/min) ao longo da idade, com maior aceleração em meninos do que em meninas. Esse aumento está intimamente relacionado ao incremento da massa muscular (influência anabólica da testosterona), de forma que, se for considerar o VO_2 max corrigido por indicadores de massa muscular não será observado aumento com a idade em crianças e adolescentes do sexo masculino (VO_2 max/kg peso corporal permanece constante), enquanto ocorre um declínio progressivo em meninas (VO_2 max/kg peso corporal reduz com a idade). Neste sentido, enquanto a massa muscular média, como percentual do peso corporal nos meninos, aumenta de 42% aos 5 anos para 53% aos 17, nas meninas, nenhuma mudança apreciável é observada (41 e 42%, respectivamente) ao longo do mesmo período (ROWLAND, 2008).

O nível de aptidão cardiorrespiratória é classificado de acordo com pontos de corte específicos para idade e sexo. Os pontos de corte utilizados para adultos de 20 a 49 são baseados em informações provenientes do Aerobics Center Longitudinal Study (BLAIR et al., 1989). Os padrões de referência usados para classificar a aptidão cardiorrespiratória de crianças e adolescentes de 12 a 19 anos (Quadro 1) são baseados em critérios do FITNESSGRAM program (CURETON & WARREN, 1990). Vale ressaltar que a aptidão cardiovascular baixa é definida com um VO₂máx menor do que o 20º percentil; aptidão moderada com valores entre o 20º e 59º percentil e níveis altos (elevados) com valores iguais ou superiores ao 60º percentil (NCHS, 2004).

QUADRO 1. Nível de aptidão cardiorrespiratória em crianças e adolescentes

Aptidão cardiorrespiratória (ml.kg ⁻¹ .min ⁻¹)	Meninos		Meninas		
	12 a 19 anos	12 anos	13 anos	14 anos	15 a 19 anos
Baixa	< 42	<37	<36	<35	<35
Moderada	42-51,99	37-45,99	36-44,99	35-43,99	35 - 42,99
Alta	> 52	> 46	≥45	> 44	≥43

Nota: Critérios do FITNESSGRAM program (CURETON & WARREN, 1990)

No Brasil recentemente houve a preocupação em fornecer valores referenciais da aptidão cardiorrespiratória para crianças a adolescentes de 10 a 14 anos (RODRIGUES *et al.*, 2006). A vantagem deste estudo foi a realização do teste com estimativa direta do VO₂máx. O Quadro 2 exibe uma classificação da aptidão cardiorrespiratória relatada em uma amostra de crianças e adolescentes brasileiros de 10 a 14 anos.

QUADRO 2. Classificação da aptidão cardiorrespiratória de crianças e adolescentes Brasileiros

Nível aptidão (ml.kg ⁻¹ .min ⁻¹)	Meninos	Meninas
Muito fraca	< 38,7	< 33,0
Fraca	38,7 – 43,3	33,0 – 36,4
Regular	43,4 – 47,9	36,5 – 38,7
Boa	48,0 - 52,2	38,8 – 42,4
Excelente	≥ 52,3	≥ 42,5

Nota: Adaptado de Rodrigues *et al.* (2006)

3.4. Papel da Leptina e da interleucina 6 (IL6) na sensibilidade à insulina

A literatura apresenta muitas evidências sugerindo uma associação entre diversas doenças com estado de inflamação crônica. Foi sugerido que um processo inflamatório crônico pode representar o fator desencadeante na origem da resistência à insulina e, eventualmente, até no aparecimento do DM2 (PICKUP & CROOK, 1998). Adicionalmente, o envelhecimento e a obesidade também estão associados com aumento da inflamação crônica (LAMBERT *et al.*, 2008). A inflamação é um mecanismo complexo de defesa no qual os leucócitos migram dos vasos sanguíneos (vasculatura) para dentro dos tecidos danificados com a finalidade de destruir os agentes que potencialmente podem causar lesões (GABAY, 2006). A inflamação aguda é uma resposta imediata do organismo diante de uma infecção, enquanto a inflamação crônica é um fenômeno persistente que pode levar a danos teciduais.

A resistência à insulina é considerada um estado pró-inflamatório, pois está associada com elevada concentração de marcadores inflamatórios. Sabe-se que defeitos da ação da insulina nos tecidos, tais como músculo, fígado e o tecido adiposo levam a um aumento do processo inflamatório crônico de baixa intensidade (YUDKIN, 2003). Neste contexto, destaca-se o papel desempenhado pelas adipocinas, que são proteínas de baixo peso molecular com diversas funções metabólicas e endócrinas que participam da inflamação e resposta do sistema imune. Várias dessas adipocinas são fatores de risco independentes para doenças metabólicas e arteriais. As principais fontes de adipocinas (adipocinas/adipocitocinas) são o tecido adiposo subcutâneo e visceral.

Descobertas recentes demonstraram que não se aplica mais a idéia de que o tecido adiposo age apenas como um reservatório energético e isolamento térmico. Sabe-se atualmente que o tecido adiposo funciona também como um importante órgão endócrino (MOHAMED-ALI *et al.*, 1998). Nos últimos 20 anos, vários estudos confirmaram a capacidade dos adipócitos em secretar hormônios (protéicos e não protéicos), tornando-se um tema alvo de muitas investigações científicas. As adipocinas revolucionaram os conceitos sobre a função biológica dos lipídios no organismo, com destaque para a regulação metabólica. A síntese e secreção de adipocinas são proporcionais a quantidade de lipídios, ou seja, a expressão de adipocinas é maior em pessoas obesas do que em pessoas magras. Por sua vez, a expressão é dependente do volume das células adiposas (tamanho) e do local de armazenamento dos lipídios (distribuição de gordura).

A diversidade química (tipo) e a variedade das funções já identificadas pelas adipocinas às qualificam numa dimensão que inclui desde os efeitos benéficos até efeitos prejudiciais para a saúde. Desta maneira, além de outras funções desempenhadas no metabolismo, atuam no sistema imune [fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e interleucina 6 (IL6)], fator de crescimento [fator transformador

de crescimento- β (TGF- β) e adiposina], regulação da pressão arterial (angiotensinogênio), coagulação sanguínea [inibidor do ativador de plasminogênio 1 (PAI-1)], homeostase da glicose [adiponectina (AdipoQ), resistina e leptina], resistência à insulina (resistina e TNF α), lipólise (TNF α e IL6) e proliferação e diferenciação de adipócitos [fator de crescimento insulina símile-1 (IGF-1)] (FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2007). Algumas dessas adipocinas são potencialmente pró-inflamatórias como o TNF α , a resistina, a IL6 e o PAI-1 (TRAYHURN & BEATTIE, 2001). Outras são consideradas antiinflamatórias e/ou sensibilizadoras de insulina como a adiponectina (GUERRE-MILLO, 2008; AHIMA & FLIER, 2000) e a leptina que é um hormônio envolvido tanto com o controle do apetite quanto com a reprodução humana.

Tendo em vista que as adipocinas produzidas no tecido adiposo modulam uma série de eventos fisiológicos e fisiopatológicos no organismo humano, passaram a receber grande atenção de pesquisadores. A IL6 tornou-se alvo de investigações que demonstraram que é capaz de provocar resistência a insulina, porém baseado em observações que a IL6 frequentemente está elevada em pacientes com DM2 e obesidade (VOZAROVA *et al.*, 2001). O contra-senso destas informações foi à demonstração de que a IL6 é secretada rapidamente na circulação durante exercícios físicos (FEBBRAIO & PEDERSEN, 2002). Em outras palavras, significa que o músculo esquelético também secreta IL6 (HISCOCK *et al.*, 2004). Este estudo permitiu questionar porque o exercício provocaria a liberação pelos músculos de um fator que inibe a sinalização de insulina quando na verdade a ação da insulina é aumentada imediatamente após o período de atividade física (WOJTASZEWSKI *et al.*, 2003). Contrariamente, Lambert *et al.* (2008) demonstraram que um programa de 12 semanas de treinamento aeróbio provocou uma redução de 50% na expressão do mRNA dos genes IL6 e TNF α em idosos. O estudo de Febbraio & Pedersen (2002) foi motivo de muitos debates na literatura, cada parte defendendo funções opostas da IL6 no metabolismo de glicose (PEDERSEN & FEBBRAIO, 2007; MOONEY, 2007).

Para Gabay (2006) a IL6 desempenha papel fundamental na inflamação crônica e sua concentração é elevada em doenças inflamatórias. Informações sugerem que a produção de IL6 é dependente de estímulos provocados por outra adipocina inflamatória, o TNF α (PETERSEN & PEDERSEN, 2006). Também foi sugerido que a IL6 é importante para o metabolismo de lipídios, pois, foi relatado que é capaz de estimular a lipólise e a oxidação de gorduras (van HALL *et al.*, 2003). A IL6 pode aumentar a liberação de ácidos graxos livres e glicerol e sua expressão aumentada parece estar relacionada à inibição da síntese de leptina e a estimulação da produção de proteína C reativa (HERMSDORFF & MONTEIRO, 2004). Estes estudos sugerem que a IL6 desempenha importante função na mobilização de energia em forma de ácidos graxos livres (AGL). Se esta atividade ocorre em

resposta ao exercício físico para fornecimento de energia metabólica, explicaria o aumento na sensibilidade à insulina nos tecidos.

A grande quantidade evidências tanto pró quanto contra as funções da IL6 na sensibilidade à insulina provocam discussões interessantes em torno do assunto. Em uma recente revisão, foi abordada com bastante clareza a relação entre resistência à insulina e IL6 (ALLEN & FEBBRAIO, 2010). Diferentes idéias foram discutidas, porém a mensagem é que a IL6 esta mais para reduzir a obesidade e atingir o equilíbrio metabólico do que o contrário. No entanto, o que no final levou os autores a decidirem por está conclusão foi um estudo com animais (SADAGURSKI *et al.*, 2010). Isto leva a crer que muitas questões ainda precisam ser respondidas para estabelecer claramente a participação da IL6 na sensibilidade à insulina. Estas observações indicam que a IL6 pode atuar em múltiplos níveis, tanto em tecidos periféricos quanto centrais, o que provoca efeitos diretos no peso corporal, no equilíbrio energético e na sensibilidade à insulina.

As funções da leptina estão mais bem definidas. A leptina é uma proteína codificada pelo gene *ob*, o qual é predominantemente expresso pelos adipócitos, e seus níveis plasmáticos se correlacionam bem com a massa de gordura corporal. Enquanto proteína, a leptina possui seu receptor (OB-R) expresso no sistema nervoso e tecidos periféricos como, tecido adiposo, músculo esquelético, células- β pancreática e fígado. É reguladora das funções neuroendócrinas, da saciedade e do gasto energético (ZACHAROVA *et al.*, 2005). Além da sua ação no equilíbrio energético (inibe ingestão alimentar, aumenta a demanda energética) a leptina também esta envolvida na regulação da pressão arterial, do sistema imune, respiratório e reprodutivo (HAVEL, 1999). Foi relatado que deficiência ou resistência a leptina causa hiperfagia, obesidade mórbida, disfunção imune e autonômica além de uma variedade de anormalidades endócrinas (FRIEDMAN & HALLAS, 1998). A leptina provavelmente age como inibidor de apetite e ganho de peso reduzindo a expressão de peptídeos orexígenos (estimulam o apetite) como o neuropeptídeo Y e aumentando a expressão dos peptídeos anorexígenos (inibem o apetite).

Em crianças e em adultos, há evidências sugerindo que a concentração de leptina está associada com a demanda energética proveniente da atividade física (ARSLANIAN *et al.*, 1998; GOMEZ-MERINO *et al.*, 2002). A concentração de leptina plasmática possui forte associação com o conteúdo de gordura corporal e foi demonstrado que o aumento relativo da leptina circulante com o passar do tempo prediz ganho de gordura principalmente na região subcutânea (KETTANEH *et al.*, 2007).

A expressão de leptina nos adipócitos é regulada transcricionalmente, com a condição do armazenamento de energia no tecido adiposo branco e o tamanho do adipócito como principais determinantes (de CARVALHO *et al.*, 2006). Além disso, a expressão da leptina e seus níveis séricos aumentam após as refeições, porém, é rapidamente suprimida com a restrição de alimentos

(PEELMAN *et al.*, 2004). Em crianças e adolescente a leptina plasmática correlacionou com a gordura corporal ($r=0,77$), insulina em jejum, independente da gordura corporal ($r=0,60$), mas não correlacionou com a sensibilidade à insulina (ARSLANIAN *et al.*, 1998). Em um estudo mais recente, foi verificada associação entre a leptina com resistência à insulina em jovens de 11 a 14 anos. Porém, esta associação foi atenuada pelo ajuste da adiposidade corporal (STEINBERGER *et al.*, 2003).

Foram demonstrados efeitos supressivos da leptina na produção de insulina nas células β humanas tanto na secreção quanto na expressão dos genes (SEUFERT *et al.*, 1999). Este estudo indica a existência de um eixo adipo-insulina em humanos, no qual a insulina estimula a produção de leptina nos adipócitos e a leptina inibe a produção de insulina nas células beta. Porém esta associação entre leptina e obesidade levou a formulação da hipótese de uma condição de resistência à leptina. No entanto, a base molecular para a resistência à leptina precisa ser melhor investigada. Evidências sugerem que a leptina promove oxidação de AGL e reduz o acúmulo de gordura nos tecidos e estes efeitos aumentariam indiretamente a sensibilidade à insulina (SHIMABUKURO *et al.*, 1997). No entanto, embora a leptina seja necessária para o equilíbrio metabólico, aumentar a concentração de leptina circulante não é o remédio para a obesidade comum (GUERRE-MILLO, 2004).

Em síntese, existem evidências sugerindo que a leptina está relacionada à resistência a insulina tanto em adultos quanto em crianças (HAFFNER *et al.*, 1996; STEINBERGER *et al.*, 2003). Considerando que a leptina e a resistência à insulina estão fortemente relacionados com outras doenças (SINAIKO *et al.*, 2001), estudar esta relação em crianças e adolescentes pode contribuir para esclarecer aspectos metabólicos no desenvolvimento do DM2.

3.5. Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma (PPAR)

Nas últimas décadas foram identificados importantes receptores intracelulares (nucleares) dos quais, entre outros, destaca-se o receptor ativado por proliferadores de peroxissoma (PPAR). Os PPARs são fatores de transcrição ligantes dependentes pertencentes à superfamília dos receptores hormonais nucleares. Ao contrário dos receptores encontrados na membrana plasmática, os receptores nucleares são fatores transcripcionais que exercem sua função regulatória diretamente no promotor do gene-alvo (KANUNFRE, 2002; ISSEMAN & GREEN, 1990). Três isoformas de PPARs codificadas por genes distintos foram identificadas, ou seja, o PPAR alfa (α), beta e/ou delta (β/δ) e gama (γ/g). Os membros da família dos PPARs desempenham papéis biológicos determinantes na homeostase da glicose, no metabolismo das gorduras e nos processos inflamatórios. Cada isoforma possui sua própria função e distribuição nos tecidos. Estas proteínas regulam a expressão do gene-alvo pela ligação a específicos elementos responsivos aos proliferadores de peroxissoma situados em sítios regulatórios de cada gene (TAVARES; HIRATA & HIRATA, 2007). Uma vez ativado pelo seu ligante, os PPARs controlam a taxa transcripcional de uma grande quantidade de genes implicados em diversas funções fisiológicas, incluindo modulação da homeostase da glicose, no metabolismo das gorduras, nos processos inflamatórios e na proliferação e diferenciação celular (LUQUET *et al.*, 2005).

Os PPARs podem ser ativados por uma grande quantidade de compostos (ligantes), incluindo eicosanóides (prostaglandinas), ácidos graxos poliinsaturados, drogas sintéticas (medicamentos antidiabetes) e LDLs oxidadas. Tendo em vista que a expressão dos PPARs foi associada a uma ampla variedade de doenças como aterosclerose, diabetes, inflamação e certos tipos de câncer, os efeitos benéficos dependem do uso de ligantes específicos (BISHOP-BAILEY, 2000). Quanto à função celular dos PPARs cabe salientar que, de acordo com o tecido, o efeito metabólico da isoforma é particular e específica. Assim, o PPAR α atua no catabolismo de ácidos graxos (AG) no fígado, coração, rins e músculo esquelético. Juntamente com o PPAR γ , o PPAR α participa do controle do processo inflamatório. Para tanto, impede a atividade transcripcional do fator de transcrição (NF κ B) responsável pela expressão do IL6. O papel do PPAR α no metabolismo de lipídios está bem estabelecido na literatura (BERGER & MOLLER, 2002). O PPAR α é expresso predominantemente em hepatócitos, fibras musculares esqueléticas e cardíacas, células renais, endoteliais e eritrócitos.

Mais recentemente foi demonstrada importante participação do PPAR δ na oxidação de ácidos graxos nos adipócitos e nos músculos esqueléticos (LUQUET *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2003). Uma possível associação com o desempenho físico também foi sugerida devido a uma variação observada na seqüência de DNA no locus do PPAR δ que participa de alterações na aptidão cardiorrespiratória e na concentração de HDL-C em indivíduos saudáveis submetidos ao exercício físico (HAUTALA *et al.*,

2007). Foi demonstrado que entre os PPARs o PPAR δ é o receptor mais abundante no músculo esquelético e que está primariamente envolvido com o metabolismo de AGL (MUOIO *et al.*, 2002).

O gene do PPAR γ da origem, no mínimo, a outras três isoformas, são elas, PPAR γ 1, PPAR γ 2 e PPAR γ 3 (FAJAS *et al.*, 1998). Estas isoformas são expressas em diferentes tecidos e conseqüentemente desempenham funções metabólicas específicas. O PPAR γ 2 tem recebido muita atenção devido ao efeito protetor contra o risco de desenvolver resistência à insulina e DM2 (GELMAN *et al.*, 2007). O PPAR γ está envolvido na diferenciação dos adipócitos, estoque de lipídios e sensibilidade à insulina (BERGER & MOLLER, 2002). É o único membro da família dos PPARs que se encontra expresso em altos níveis, especialmente no tecido adiposo. Foi relatado que mutações no PPAR γ produz severa resistência à insulina, hipertensão e diabetes (BARROSO *et al.*, 1999). É um receptor para as tiazolidinedionas, medicamento utilizado para o tratamento de diabetes (MEIRHAEGHE *et al.*, 2000) e um receptor que regula a adipogênese (TONTONNOZ *et al.*, 1994). Estudos mostram que o PPAR γ pode inibir a expressão de genes pró-inflamatórios que desencadeiam a aterosclerose (JIANG *et al.*, 1998). A ativação do PPAR γ induz aumento do consumo de AGL pelo tecido muscular esquelético e adiposo o que promove redução na concentração deste lipídio no plasma. Essa diminuição na disponibilidade de AG pode explicar o aumento na sensibilidade à insulina (RANDLE *et al.*, 1963). Observa-se que muitos estudos descrevem o papel do PPAR γ na regulação do metabolismo de glicose e de lipídios, porém também sugerem um possível papel regulador na expressão de adipocinas pró-inflamatórias que provocam processos inflamatórios e ateroscleróticos.

A ação dos PPARs é dependente de ligantes, e esses, por sua vez, podem ser naturais ou endógenos, como AGL e seus derivados, ou sintéticos, como as drogas antiinflamatórias, hipolipemiantes e antidiabéticas (CLAUSELL & TAVARES, 2004). Ações metabólicas mediadas pelos PPARs via seus distintos ligantes, fornecem subsídios suficientes para estabelecer uma relação com a resistência à insulina, DM2 e doença arterial coronária particularmente no que se refere ao PPAR γ . O papel da atividade física no conteúdo de PPARs merece maiores investigações até porque os resultados iniciais são bastante promissores (KILPELÄINEN *et al.*, 2008; HAUTALA *et al.*, 2007; LUQUET *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2003).

3.6. Papel dos canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) na secreção de insulina

Em um desfecho típico de DM2 o paciente atravessa três fases bem marcantes. A primeira, devido a uma moderada resistência à insulina, a produção hepática de glicose aumenta, característica comumente observada em pacientes com DM2 e com hiperglicemia de jejum. Na segunda fase a resistência à insulina se torna mais intensa, o que pode ser uma conseqüência do grau de carga genética e/ou de condições adquiridas como obesidade, sedentarismo e envelhecimento. Na terceira, o paciente pode se tornar dependente de insulina, uma vez que a função das células β pancreática em produzir e secretar insulina é drasticamente reduzida ou interrompida totalmente. Não há relato quanto à duração de cada fase, apenas da existência das mesmas.

Hipóteses recentes têm sido desenvolvidas atribuindo a deterioração da função das células β (terceira fase) à exposição crônica a elevados concentrações de ácidos graxos livres como ocorre na obesidade e nos estados de resistência insulínica. Análogo ao conceito de glicotoxicidade, a noção de lipotoxicidade tem demonstrado o potencial mecanismo que associa o acúmulo de gordura com a disfunção na secreção pancreática de insulina assim como a diminuição da função das células β . De acordo com esta hipótese, a exposição crônica aos AGL, em estados em que há deficiência de ação de leptina (que regula a oxidação no tecido gorduroso), ativaria vias mais tóxicas. Isto permitiria aumento do stress oxidativo e ativação de vias inflamatórias resultando em apoptose das células β pancreática.

O diabetes melito relacionada à função das células β também pode ser devida a anormalidades genéticas pré-programadas na função das células β pancreática. Estas células possuem a função de secretar insulina em resposta ao aumento da glicose circulante. Em condição normal a célula β pancreática secreta insulina suficiente para manter equilibrados os metabolismos de glicose, lipídios e proteínas. Os mecanismos envolvidos na secreção de insulina pelas células β pancreática incluem (ASHCROFT & GRIBBLE, 1999): a) Transporte da glicose para o interior das células β pelo transportador GLUT2; b) Metabolização intracelular da glicose via glicólise e/ou ciclo de Krebs, gerando ATP; c) Aumento intracelular da razão ATP/ADP; d) Fechamento dos canais de potássio (K⁺) sensíveis ao ATP (K_{ATP}); e) Aumento do K⁺ intracelular; f) Despolarização de membrana da célula β ; g) Abertura do canal de Ca²⁺ voltagem dependente; h) Influxo de Ca²⁺ e aumento de sua concentração citoplasmática e; i) Exocitose dos grânulos secretores contendo insulina.

Observa-se papel de destaque dos canais iônicos em regular o funcionamento adequado das células β . Os canais iônicos estão presentes na membrana plasmática e nas organelas intracelulares de todas as células e são responsáveis pela coordenação de diversas funções como neurotransmissão, contração, secreção e controle do volume celular. Dentre os canais iônicos, os canais de potássio

sensíveis ao ATP (K_{ATP}) expressos nas células β pancreática, demonstram papel central nos mecanismos envolvidos com a secreção de insulina. O K_{ATP} realiza a ligação entre o sinal gerado pelo metabolismo da glicose com a despolarização da membrana celular e com a exocitose dos grânulos de insulina (REIS & VELHO, 2004). Os canais K_{ATP} são um complexo octamérico composto por subunidades presentes nas células β pancreática; estas são, o receptor de sulfoniluréia 1 (SUR1) que é uma unidade regulatória e a outra é a formadora do poro, KIR6.2 (inwardly rectifying potassium channels) um canal iônico. Os K_{ATPs} estão presentes em vários tecidos, incluindo coração, adipócitos, músculo liso vascular e no cérebro.

Estas subunidades dos K_{ATP} desempenham papel central na secreção de insulina mediada pela glicose. Alterações no número de canais na superfície celular estão associadas com doenças genéticas e aberrações na secreção de insulina (SIVAPRASADARAO *et al.*, 2007). Há fortes evidências demonstrando que a regulação da expressão dos K_{ATP} e suas subunidades pode estar associada à variação da concentração plasmática de glicose (SMITH *et al.*, 2007). Os pesquisadores deduziram isto após verificarem que uma redução na glicemia provoca aumento na expressão de KIR6.2 e SUR1. Por sua vez, a exposição das células beta a elevadas taxas de glicose diminui a expressão destes genes.

A subunidade KIR6.2 é codificada pelo gene KCNJ11 e a subunidade SUR1 pelo gene ABCC8, ambas localizadas no cromossomo 11 (lócus 11p 15.1). Esses canais têm papel importante na secreção de insulina fazendo a ligação entre o metabolismo celular e a atividade elétrica da membrana plasmática, sendo tanto o KIR6.2 quanto SUR1 vitais para a regulação adequada da secreção de insulina. A glicose entra nas células β através da proteína transportadora (GLUT-2) sendo então metabolizada nas mitocôndrias por enzimas da via glicolítica, incluindo a glicoquinase, para produzir ATP. O aumento da relação ATP/ADP intracelular leva ao fechamento do canal K_{ATP} e à despolarização da membrana plasmática. Isto leva ao bloqueio de canais K_{ATP} , redução da saída do k^+ da célula, despolarização celular, ativação da permeabilidade ao Ca^{2+} sensível à voltagem. A entrada e acúmulo do Ca^{2+} nas células resulta na exocitose dos grânulos de insulina (Figura 1). Acredita-se que o SUR1 seja o sensor da relação ATP/ADP (REIS & VELHO, 2002).

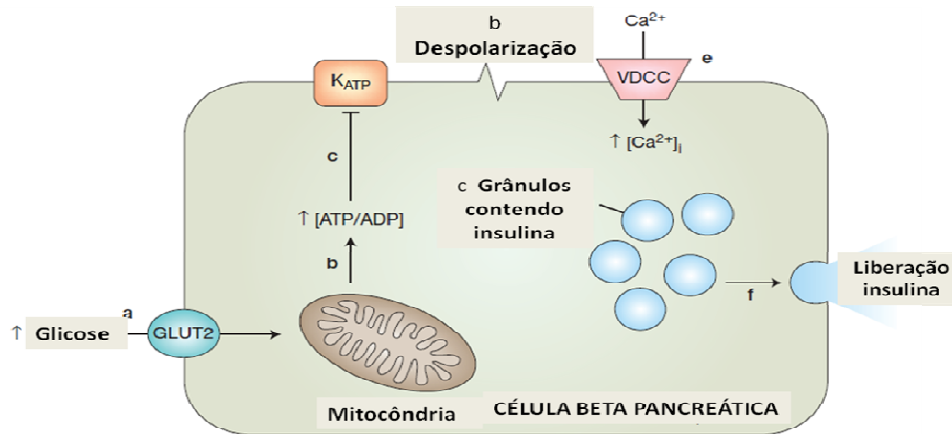


FIGURA 1. Esquema representativo da secreção de insulina nas células beta pancreática, estimulada pelo aumento na concentração de glicose plasmática (Adaptado de Smith et al., 2007)

A função do K_{ATP} na regulação da secreção de insulina foi bem estabelecida em estudos com pacientes hipoglicêmicos e hiperinsulinêmicos persistentes da infância. A perda da atividade das células β pancreática causada por mutações no SUR1 ou KIR6.2 é responsável pela hiper-secreção descontrolada de insulina, apesar da hipoglicemia (THOMAS *et al.*, 1996). Para gerar um sinal elétrico de magnitude desejada, a membrana plasmática da célula beta deve possuir uma quantidade apropriada de canais. Um inadequado número de canais pode levar a hiperinsulinemia congênita, enquanto um número excessivo causaria uma condição oposta (SMITH *et al.*, 2007).

Tendo em vista que a célula alvo que sintetiza e secreta a insulina se encontra no pâncreas, o estudo de mecanismos de transcrição molecular (in vivo e direto) envolvidos neste processo em humanos é limitado por questões éticas. Em outras palavras, em situações experimentais não seria conveniente obter amostras das células β em humanos vivos. Portanto, a expressão dos genes que regulam a secreção de insulina, como o SUR1 e o KIR6.2, é determinada a partir de células obtidas do sangue periférico (ex. leucócitos) bem como dos tecidos (ex. adiposo e muscular). Embora seja um tema importante, poucos estudos comparam a expressão destes genes no sangue e nos tecidos. Um destes foi demonstrado diferença na expressão do SUR1, mas não do KIR6.2 entre os leucócitos sanguíneos totais e o tecido adiposo. A expressão do SUR1 foi maior no tecido adiposo do que no sangue periférico (MARQUES, 2008). Mesmo assim, são localizados com certa frequência estudos que determinaram o padrão de secreção da insulina in vivo, associado à expressão do mRNA dos genes SUR1 e KIR6.2, em leucócitos totais do sangue periférico (KILPELÄINEN *et al.*, 2007).

Determinar a expressão das subunidades do canal de potássio (KIR6.2 e SUR1) pode revelar precocemente importantes disfunções no funcionamento das células beta e, dessa forma, possibilitar intervenções preventivas.

3.7. Pressupostos para utilização de gêmeos como modelo de pesquisas

Já se passaram mais de cem anos desde que deram início os primeiros debates sobre natureza (*nature*) e criação (*nurture*). Apesar de não ser um consenso, oficialmente Francis Galton foi o primeiro a discutir o papel da hereditariedade nas características humanas. Em uma polêmica declaração afirmou que o talento e a genialidade eram hereditários. Anos mais tarde, Galton passou a utilizar gêmeos com a idéia de testar suas hipóteses sobre hereditariedade. Ele deduziu que havia dois tipos de gêmeos, os idênticos e os fraternos. Para ele, os tipos de gêmeos compartilhavam a criação (ambiente), porém os gêmeos idênticos demonstravam maior similaridade (genética) do que os fraternos. Notavelmente chegou a um ponto em que suas hipóteses sobre hereditariedade poderiam encontrar apoio metodológico. No Brasil, os créditos aos estudos utilizando gêmeos devem ser concedidos especialmente aos Drs Bernardo Beiguelman e Pedro Henrique Saldanha que além de publicarem diversas obras e artigos científicos também forneceram fundamentos importantes para a utilização desta população em pesquisas genéticas.

A realização de estudos utilizando gêmeos passou a ser significativa em diversas ciências, contribuindo para identificar a magnitude das diferenças entre os pares de gêmeos de um óvulo (MZ) e de dois óvulos (DZ), fornecendo uma estimativa da hereditariedade e da influência do ambiente num dado fenótipo. Na opinião de diversos pesquisadores, na espécie humana o estudo com gêmeos constitui-se no melhor exemplo de experiências naturais que permitem testar a importância relativa da genética e da criação em determinados fenótipos (CRUZ FERNANDES & MAIA, 2006; SALDANHA, 1980; FROTA-PESSOA *et al.*, 1976; MacGREGOR *et al.*, 2000). Por isso, os estudos com gêmeos agregam um grande valor científico tanto na área de biologia quanto na medicina.

Desde que a zigosidade (MZ ou DZ) dos gêmeos seja conhecida, eles podem compor delineamentos de pesquisas em diferentes áreas. Os gêmeos MZ serviriam como controle dos efeitos de fatores ambientais por apresentarem estrutura genética idêntica, enquanto os DZ possibilitam estudar os efeitos de diferentes genótipos em um meio similar, uma vez que compartilham metade dos genes. Por sua vez, a utilização de gêmeos para estimar a importância relativa dos genes e do ambiente na determinação de um fenótipo apóia-se em premissas que devem ser destacadas e argumentadas a luz da literatura (CRUZ FERNANDES & MAIA, 2007, BEIGUELMAN, 2008).

1) Os gêmeos compartilham, na fase pré-natal, o mesmo ambiente e por isso estão sujeitos às mesmas influências maternas relacionadas à idade, paridade, condições de saúde, poluição, dieta,

cigarro e medicamentos; 2) Os fatores ambientais (pós-natal) que agem sobre os gêmeos MZ, provocando diferenças intra-par, são os mesmos que atuam sobre os pares DZ; 3) O ambiente dos gêmeos é aparentemente igual ao ambiente de outros indivíduos da população; 4) Os integrantes de cada par de gêmeos estão sujeitos aos mesmos efeitos ambientais, que interagindo com o genótipo produzem o fenótipo e; 5) Os gêmeos podem ser considerados uma amostra da população geral. Sendo assim, assume-se uma normalidade na distribuição de caracteres entre os gêmeos e os outros indivíduos.

Apesar de que estas premissas fornecem sustentação teórica para a utilização dos gêmeos em estudos científicos, estão sujeitas a diversas críticas. Uma delas se baseia no fato da similaridade. Como os gêmeos MZ são mais parecidos poderiam ser tratados de modo mais semelhante do que os DZ, principalmente na infância. Isto certamente poderia contribuir para acentuar a variância entre os gêmeos MZ e DZ. Neste raciocínio, a variância entre os gêmeos MZ e DZ também pode aumentar devido aos anexos embrionários. Dois terços dos gêmeos MZ compartilham a mesma placenta (monocoriônico) isto pode resultar tanto na competição entre os gêmeos para um limitado suprimento de nutrientes como acarretar anastomoses vasculares graves (LOOS *et al.*, 2001; RAMOS-ARROYO *et al.*, 1988). Neste sentido, a formação da estrutura embrionária pode influenciar a divisão de suprimentos no útero e contribuir para um ambiente muito adverso entre os gêmeos MZ e DZ. No entanto, os efeitos provocados pela estrutura embrionária na variância entre os gêmeos poderiam ser minimizados a partir do seguinte achado. Como o nascimento dos pares DZ está sujeita a idade materna e que mães mais velhas possuem condições de gestação piores do que as mães mais jovens, que dão a luz mais freqüentemente a MZ, supõe-se que o ambiente intra-uterino, nesta faixa etária, seja mais adverso para os DZ do que para os MZ (BEIGUELMAN, 2008). Mesmo assumindo que os gêmeos MZ sejam mais concordantes do que o DZ, Guo (2001) não admite que todos os fenótipos concordantes sejam causados por fatores ambientais.

Outra crítica, e talvez a mais importante, aborda fatores que atuam no ambiente intra-uterino provocando menor desenvolvimento fetal. Estudos relatam uma associação inversa entre baixo peso de nascimento e aumento na incidência de hipertensão arterial, obesidade, dislipidemias, doenças coronárias e diabetes em adultos. O desenvolvimento de doenças na vida adulta associadas à má nutrição fetal resultou na hipótese denominada origem fetal das doenças (BARKER, 1992). As evidências de que os gêmeos MZ, na grande maioria dos casos, apresentam menor desenvolvimento no útero, e nascem com menor peso corporal do que gêmeos DZ, foram suficientes para promover os estudos com gêmeos como um modelo bastante interessante para testar a hipótese da origem fetal das doenças. Em um destes experimentos foi sugerido que o modelo com gêmeos poderia ser inadequado para explicar a origem genética de muitas doenças uma vez que o ambiente pré-natal dos gêmeos MZ

é mais adverso do que de gêmeos DZ. Conseqüentemente, a maior taxa de concordância para doenças observada em MZ poderia ser devido ao baixo peso de nascimento e não a presença de genes para doenças específicas (PHILLIPS, 1993). No entanto não há concordância em relação a essa declaração. Foi notado que o menor peso corporal de nascimento não foi preditor de pressão arterial e nem de tolerância à glicose em gêmeos (BAIRD *et al.*, 2001; WILLIAMS & POULTON, 1999). Este conflito permitiu a Ross (1999) reconhecer que os insultos fetais que causam malformação no peso e na estatura dos gêmeos, como cigarro e fornecimento de nutrientes, podem afetar qualquer tipo de gestação, não proibindo o uso de gêmeos em estudos desta natureza.

Apesar das críticas em relação às premissas empregadas para justificar o uso de gêmeos em estudos que investigam a importância do genótipo na determinação do fenótipo, elas são aceitas por uma grande parcela da comunidade científica (BOOMSMA *et al.*, 2002). Dessa maneira, as premissas sustentam que a comparação da similaridade entre gêmeos MZ e DZ, em relação a um caractere, possibilita identificar as fontes de variação na população.

Em linhas gerais é fato que o uso dos gêmeos em estudos genéticos depende dos cuidados metodológicos adotados, principalmente como os gêmeos são amostrados e investigados (HAWKES, 1997). Admite-se que estudos com gêmeos, que sejam bem conduzidos, são capazes de mudar completamente a direção de um problema científico e possibilitam re-orientações constantes no foco da pesquisa. O desafio atual para as pesquisas com gêmeos é utilizar os recursos da biologia molecular para estabelecer comparações entre os pares em relação à expressão gênica, epigenética e outros (MARTIN, 2005).

Existem diversas variações de modelos que utilizam gêmeos em estudos científicos. Em geral resumem-se em realizar comparações entre MZ e DZ (quantitativo e qualitativo) ou apenas empregar irmãos MZs (estudo controle de casos). No entanto, após o clássico estudo de Bouchard *et al.* (1990) com gêmeos MZ, este modelo passou a ser mais explorado. A seguir serão apresentadas algumas considerações sobre o uso de gêmeos MZ em estudos.

3.8. Análise de gêmeos MZ (modelo controle de casos)

O estudo com gêmeos MZ para o estabelecimento da interação entre genótipo e ambiente, pode ser realizado com os pares criados juntos ou separados na infância (adotados). Como são raras as pesquisas com gêmeos MZ criados separados, vamos nos ater a descrever o modelo que utiliza os pares MZ criados juntos.

Este modelo de estudo é conhecido como modelo controle de casos, ou clone controle (PIETILÄINEN *et al.*, 2008). É considerada uma poderosa ferramenta para investigar a relação entre

variáveis (fenótipos) de duas pessoas geneticamente idênticas (SAMARAS *et al.*, 1999; RÖNNEMAA *et al.*, 1997a). Em uma amostra de pares de gêmeos MZ são selecionados apenas aqueles discordantes para uma determinada característica (ou outros fatores de risco). Este método foi usado para investigar o efeito da atividade física na composição corporal (SAMARAS *et al.*, 1998), no índice de amplificação na pressão arterial sistólica (GREENFIELD *et al.*, 2003), na produção de glicose hepática e na secreção e ação da insulina (VAAG *et al.*, 1995; OPPERT *et al.*, 1995). A análise de controle de casos é considerada o único e bem estabelecido modelo pelo qual o efeito de fatores ambientais e físicos sobre uma característica pode ser quantificado independente de influências genéticas (SAMARAS *et al.*, 1999). Como os gêmeos MZ compartilham 100% de seus genes este modelo permite controlar os fatores genéticos potencialmente intervenientes (GREENFIELD *et al.*, 2003). Portanto, qualquer diferença dentro dos pares de gêmeos para uma variável deve ser em função de fatores físicos e ambientais os quais os pares de gêmeos são discordantes. Por exemplo, se os gêmeos MZ discordantes para adiposidade corporal possuem maior diferença dentro dos pares para sensibilidade a insulina do que os pares concordantes (não diferem), implica que a gordura corporal (adiposidade) pode estar exercendo efeito sobre a sensibilidade à insulina independente de influências genéticas.

Os estudos com gêmeos MZ comumente são provenientes de grandes bases de dados de nascimentos múltiplos existentes principalmente na Europa. Os trabalhos apóiam-se no pressuposto de que como os gêmeos MZ são geneticamente idênticos a descoberta de concordância para uma determinada característica indica fortemente efeito genético, enquanto a discordância sugere um efeito ambiental. Adicionalmente, todos os estudos localizados até o momento utilizaram amostras de gêmeos adultos. Essa característica parece bastante aplicada ao modelo, uma vez que para se determinar discordância entre os gêmeos MZ para uma determinada variável, a idade é fundamental. Em outras palavras, o tempo de exposição ao ambiente e o fato de separarem depois de um tempo (estudar, constituir família) pode permitir padrões de discordâncias mais evidentes. Já na infância e adolescência, os gêmeos vivem na mesma casa e compartilham seus hábitos e atividades a maior parte do tempo. Dessa forma, a discordância será menos evidente, porém é importante verificar se pequenas diferenças fenotípicas nessa faixa etária podem ser capazes de afetar o comportamento de outra variável independente de fatores genéticos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Casuística

O estudo foi constituído por gêmeos do mesmo sexo residentes no município de Rio Claro-SP. A escolha dos gêmeos para a pesquisa foi intencional, servindo-se de gêmeos voluntários entre 11 a 18 anos (nascidos no período de 1990 a 1997). Com intenção de localizar os gêmeos o projeto inicialmente foi divulgado em meios formais de comunicação como jornais, rádio e televisão. Durante o primeiro semestre de 2008, todas as Escolas Estaduais (19) e Particulares (5) do município foram visitadas. Nestas instituições, estudantes do 6º ano do ensino fundamental ao 3º ano do ensino médio (11 a 18 anos), desde que fossem gêmeos do mesmo sexo, foram considerados elegíveis para a pesquisa. Os critérios adotados para a inclusão no estudo foram que os participantes deveriam ser gêmeos do mesmo sexo, que não estivessem em tratamento médico/farmacológico que interferisse no metabolismo de glicose e lipídios e, que houvesse consentimento de todos os envolvidos, inclusive os pais e/ou responsáveis.

Para ter acesso às instituições de ensino públicas, solicitou-se autorização, mediante envio de um memorando com explicações gerais sobre o projeto, a Secretaria Regional de Educação. As escolas particulares foram visitadas a partir de um agendamento prévio com o coordenador pedagógico. Os procedimentos durante as visitas foram: reunir os gêmeos, explicar a intenção da pesquisa, registrar informações sobre os pais ou responsáveis (nome, telefone) e entregar um folheto (convite) com um resumo do projeto e o contato dos pesquisadores para solucionar dúvidas e fornecer outras informações. Nos casos em que não foi possível ter acesso direto aos gêmeos (pararam de frequentar as aulas ou não foram localizados durante o levantamento), o coordenador da escola ligava e solicitava permissão aos pais ou responsáveis para fornecer seus endereços aos pesquisadores.

Ao finalizar as visitas aos colégios contabilizou-se 98 pares de gêmeos do mesmo sexo (53 pares moças e 45 pares de rapazes), 2 trigêmeos de sexo oposto (1 menino e duas meninas) e 1 trigêmeo do mesmo sexo (3 meninas) todos na faixa etária estabelecida. Aceitaram participar do estudo 54 pares (35 pares moças e 19 pares de rapazes) e dois trigêmeos (1 menino com 2 meninas e 3 meninas), totalizando 114 crianças e jovens (Quadro 3). Todos os voluntários eram saudáveis e no momento das avaliações não estavam em tratamento medicamentoso.

QUADRO 3. Levantamento de crianças e adolescentes gêmeos de 11 a 18 anos do mesmo sexo localizados em 2008 nas Escolas Estaduais e Particulares do Município de Rio Claro-SP

	Pares (mesmo sexo)			Trigêmeos (ambos os sexos)		Trigêmeos (mesmo sexo)	
	Meninas	Meninos	Todos	2 ♂	2 ♀	3 ♂	3 ♀
	Levantamento (pares)	54,1% (53)	45,9% (45)	100% (98)	--	2	--
Não localizados (pares)	23% (3)	77% (10)	13,3% (13)	--	--	--	--
Localizados (pares)	59,3% (50)	40,7% (35)	86,7% (85)	--	2	--	1
Recusas (pares)	48,4% (15)	51,6% (16)	36,5% (31)	--	1	--	--
Avaliados (pares)	65,5% (35)	34,5% (19)	63,5% (54)	--	1	--	1
Total (n=114)	70	38	108	--	3 (1 ♂; 2 ♀)	--	3 (3 ♀)

Nota: ♂: meninos; ♀: meninas

Com a finalidade de classificar os gêmeos de acordo com a zigosidade, ou seja, MZ e DZ foram realizadas análises de DNA extraídos do sangue periférico. Os resultados revelaram que a amostra avaliada possuía 38 pares de gêmeos MZ e 16 pares de gêmeos DZ. Tendo em vista o delineamento deste estudo foram utilizados para atendimento dos objetivos apenas os resultados dos gêmeos MZ, ou seja, 38 pares.

Os gêmeos, seus pais e/ou responsáveis foram previamente informados quanto aos procedimentos experimentais empregados e apresentaram, por escrito, Consentimento Livre e Esclarecido para participação (APÊNDICE). Os protocolos de intervenção foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual Paulista (protocolo nº5093 - ANEXO) e acompanham normas da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde sobre pesquisa envolvendo seres humanos.

4.2. Procedimentos e coleta dos dados

Os gêmeos foram submetidos a uma coleta de dados que inclui um questionário de identificação (com informações gerais sobre os gêmeos e seus genitores), medidas antropométricas (massa corporal, estatura, circunferência da cintura, espessuras de dobras cutâneas), teste de esforço para determinação da aptidão cardiorrespiratória (VO_2 máx) e da colheita de sangue para as análises bioquímicas e moleculares. Os testes e medidas foram realizados no Núcleo de Atividade Física,

Esporte e Saúde (NAFES) da UNESP. Os procedimentos de coleta e armazenagem das amostras de sangue foram realizados pelo Laboratório de Análises Clínicas (Hemodiag) sediado em Rio Claro, enquanto a extração e análise da expressão dos genes foram realizados, respectivamente, no Laboratório do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) da UNESP e no Laboratório de Biologia Molecular Aplicado ao Diagnóstico (LBMAD) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

4.2.1. Medidas antropométricas

As medidas antropométricas de massa corporal (MC) e estatura foram verificadas seguindo as recomendações de Gordon et al. (1991). A partir destas medidas, foi calculado o Índice de Massa Corporal (IMC) por meio da divisão da MC, em quilogramas, pela estatura em metros elevada ao quadrado (kg/m^2). Medidas das espessuras das dobras cutâneas foram obtidas com o uso de um compasso Harpenden®, nas regiões tricipital (TR), subescapular (SB), supra-ílica anterior (SI), abdominal (AB), coxa média (CX) e perna medial (PM) a partir das orientações de Queiroga (2005). A circunferência da cintura (CC) foi medida em duplicata no ponto médio entre as últimas costelas e a crista ílica com auxílio de uma fita métrica inextensível (Mabis®Japan).

4.2.2. Avaliação da aptidão cardiorrespiratória e estabelecimento dos grupos concordantes e discordantes

Os gêmeos, acompanhados de seus responsáveis, compareceram ao NAFES/UNESP (Núcleo de Atividade Física, Esporte e Saúde) com horário agendado para a avaliação de parâmetros antropométricos e para a realização de um teste de esforço físico máximo (TEF) com a finalidade de determinar o consumo máximo de oxigênio ($\text{VO}_{2\text{máx}}$). Os sujeitos foram orientados a não ingerir bebidas à base de cafeína ou álcool por quatro horas antes do teste, a consumir refeição leve duas horas antes e a evitar esforços físicos vigorosos no dia anterior. O TEF foi realizado em esteira ergométrica modelo ATL Super® (Inbrasport), sem inclinação, nos períodos matutino e vespertino entre as 09:00-11:30h e 14:00-18:00h, respectivamente, em um laboratório com temperatura ambiente mantida entre 20 a 25° C. Todos os testes foram coordenados e administrados pelo mesmo pesquisador que possuía treinamento e experiência em TEF. Após período de 5 a 10 minutos de familiarização com o ergômetro a diferentes velocidades (4 a 7 km/h), no qual foram informados procedimentos básicos para a realização e interrupção do teste, os avaliados permaneceram um minuto em repouso na esteira em posição ortostática. Em seguida, foi iniciado o teste utilizando-se de um protocolo único que previa velocidade inicial de 4 km/h com incremento progressivo da carga de

trabalho de 1 km/h por minuto. Incentivo verbal foi empregado na tentativa de obter o esforço físico máximo. Apesar de que o principal critério para interromper o teste tenha sido a exaustão voluntária, o pesquisador também se orientou pela taxa de troca respiratória (QR) superior a 1,15, na classificação do esforço percebido em 20 (escala de Borg de 6 a 20) (BORG, 1982) e na frequência cardíaca máxima prevista (220-idade). Em repouso e durante o TEF foram continuamente registrados o volume minuto (VE), o consumo de oxigênio (VO_2) e a produção de dióxido de carbono (VCO_2) pela análise de trocas gasosas pulmonares (analisador metabólico MedGraphics VO2000® - Aerosport Inc.). O equipamento para análise de trocas gasosas foi calibrado previamente ao desenvolvimento da pesquisa (pela empresa responsável) e, no início de cada TEF por meio de auto calibração. O $VO_{2m\acute{a}x}$ foi coletado respiração a respiração (*breath by breath*) e o valor adotado para análise dos dados foi registrado como o consumo de oxigênio médio nos 30 segundos que antecediam a interrupção do TEF. A frequência cardíaca (FC) foi obtida mediante cardiofrequencímetro modelo Polar S810.

Para aplicar o modelo de estudos com os gêmeos MZ (modelo controle de casos), o valor relativo obtido (VO_2 em $ml.kg^{-1}.min^{-1}$) foi empregado para o estabelecimento dos grupos concordantes e discordantes para aptidão cardiorrespiratória a partir da diferença absoluta intra-par no $VO_{2m\acute{a}x}$ de 10 $ml.kg^{-1}.min^{-1}$. O valor foi estabelecido supondo que 10 $ml.kg^{-1}.min^{-1}$ seja uma diferença considerável, admitindo que se trata de gêmeos MZ. O grupo discordante foi constituído por 9 pares de gêmeos que apresentaram diferença no $VO_{2m\acute{a}x}$ igual ou superior ao valor de corte, enquanto o grupo concordante, foi formado por 29 pares com diferença intra-par no $VO_{2m\acute{a}x}$ inferior a 10 $ml.kg^{-1}.min^{-1}$. Seguindo o raciocínio, os grupos formados (concordantes e discordantes) ainda foram internamente separados em dois sub-grupos, um formado pelo irmão do par com *maior* e outro formado pelo irmão com *menor* $VO_{2m\acute{a}x}$ (Tabela 7).

4.2.3. Amostras biológicas

Aproximadamente uma semana após a avaliação da capacidade cardiorrespiratória ($VO_{2m\acute{a}x}$) os gêmeos, acompanhados de seus responsáveis, foram orientados comparecerem ao laboratório em condição de jejum noturno (10 a 12 horas). A colheita foi realizada no laboratório de análises clínicas Hemodiag de Rio Claro com auxílio de profissionais treinados. Após permanecerem por 30 minutos em repouso, foram submetidos aos procedimentos de colheita sanguínea em jejum e pós-carga de glicose. Todos os procedimentos nesta fase duraram aproximadamente 3 horas. A coleta foi realizada mediante punção da veia antecubital utilizando o sistema de coleta a vácuo (Vacutainer™ Becton Dickinson Company, Plymouth, Reino Unido), sendo em tubos de 4,0 mL com anticoagulante (fluoreto associado ao EDTA 1 mg/mL sangue e EDTA 1 mg/mL) e tubos de 3,5 mL com heparina. Uma parte do plasma

foi utilizada para determinação da glicose e insulina em jejum e 120 minutos e do perfil lipídico (HDL-C, TG e CT). Outra parte foi separada em alíquotas e mantida a -80° para análise de outros parâmetros laboratoriais, como a leptina e a interleucina 6 (IL6). Um tubo contendo sangue total (EDTA 1 mg/mL) foi utilizado, imediatamente após a coleta, para a extração de RNA (4,5 ml).

4.2.4. Teste oral de tolerância a glicose (TOTG)

O TOTG consistiu em, após colheita de sangue em jejum, da ingestão, durante o período de 5 minutos, de 1,75 g/kg de glicose por via oral diluída em 300 ml de água fresca. Uma nova coleta de sangue foi realizada 120 minutos após o procedimento para dosagem de glicose e insulina (2 h pós-carga de glicose). Durante o teste, o avaliado permaneceu confortavelmente sentado, sendo permitido andar um pouco, sem, entretanto, realizar qualquer exercício físico intenso, fumar ou consumir café antes e no decorrer da prova.

4.3. Determinação dos parâmetros laboratoriais

As concentrações em jejum de glicose, insulina e lipídios (HDL-C, TG, CT) bem como as concentrações de leptina e IL6 foram determinadas mediante kits específicos. O colesterol LDL-C foi estimado por meio da fórmula de Friedewald: $LDL-C = CT - HDL - (TG/5)$ (FRIEDEWALD *et al.*, 1972). Vale destacar que esta fórmula se aplica somente a amostras que apresentariam concentração de TG inferior a 400 mg/dL, no entanto, ressalta-se que não houve nenhum caso com valor superior a este critério.

4.3.1. Cálculos dos índices Homa-RI e Homa-Beta (β)

A estimativa da resistência à insulina e da função das células beta foi realizada a partir do índice Homa (Homa-RI e Homa-Beta, respectivamente) que é conhecido como método da homeostase glicêmica (homeostasis model assessment) (MATTHEWS *et al.*, 1985).

O índice Homa-RI foi calculado por meio da fórmula:

- $Homa\ RI = (insulina\ em\ jejum\ (\mu U/mL) \times glicose\ em\ jejum\ (mmol/L)) / 22,5;$

Por sua vez, o cálculo do índice Homa-Beta, que avalia a função secretora das células beta, foi calculado mediante fórmula:

- $Homa\ Beta = 20 \times (insulina\ em\ jejum\ (\mu U/ml) / (glicemia\ em\ jejum\ (mmol/L))) - 3,5.$

4.4. Utilização das técnicas de biologia molecular

As técnicas de biologia molecular foram utilizadas na extração de RNA para determinação da expressão do mRNA dos genes SUR1, KIR6.2, IL6, LEPTINA e PPARg e para extração de DNA para a verificação da zigozidade dos participantes. A extração do RNA foi realizada no Laboratório do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) da UNESP e os demais passos realizados no Laboratório de Biologia Molecular Aplicado ao Diagnóstico (LBMAD) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. A extração do DNA e o teste de zigozidade foram realizados no laboratório DNA Center sediado na cidade de Natal-RN.

4.4.1. Isolamento e avaliação do RNA total

O RNA total foi extraído em triplicata a partir de sangue periférico (4,5 ml), colhido com EDTA em jejum de 12 horas, utilizando-se o kit PAXgene® Blood RNA Kit, QIAGEN, GmbH, Alemanha, imediatamente após a colheita da amostra. Este método utiliza o sistema de colunas associadas às propriedades de ligação seletiva da membrana sílica gel com propriedades de centrifugação. Todos os procedimentos foram realizados seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. A integridade do RNA obtido foi avaliada utilizando-se da eletroforese capilar através do equipamento Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, EUA). A quantificação de RNA foi realizada por espectrofotometria a 260 nm pelo Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, EUA) e o grau de pureza do RNA foi determinada pela relação A_{260nm}/A_{280nm} .

4.4.2. Análise da expressão de mRNA por meio da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR)

A quantificação da expressão de mRNA dos genes SUR1, KIR6.2, IL6, LEPTINA e PPARg foi realizada por transcrição reversa do mRNA seguida de PCR (RT-PCR) em tempo real. Para essa finalidade foram utilizados o sistema de amplificação TaqMan™ e o equipamento ABI 7500 (Applied Biosystems, Foster City, EUA).

A síntese de cDNA foi feita utilizando o Reagente High Capacity (Applied Biosystems, Foster City, EUA). A síntese ocorreu de acordo como o protocolo descrito pelo fabricante, considerando o uso de um termociclador Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, EUA). O cDNA obtido foi armazenado a -20°C até a realização da PCR.

O cDNA proveniente de RNA total de leucócitos do sangue periférico foi amplificado pela PCR em tempo real. Foram selecionados iniciadores e sondas específicas marcadas com fluoróforos para os genes SUR1, KIR6.2, IL6, LEPTINA e PPAR γ e fluoróforo VIC para o gene da gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase (GAPDH) (Quadro 4). A escolha foi realizada com auxílio do programa *Primer Express* (Applied Biosystems, Foster City, EUA) e *Primer Premier 5.0* (PremierBiosoft, Palo Alto EUA).

QUADRO 4. Iniciadores e sondas utilizadas na PCR em tempo real

GENES	INICIADORES
SUR1	5' TCAACGCCAGCGATTTCAG 3'
	5' GGGTCATCCAAGAAGACAACG 3'
KIR6.2	5' 6FAM CCCTCTACCAGCACGC MGBNFQ 3'
	5' CTTCTCGTCTGCCTTCCTTTTC 3'
	5' AGCCCCACGATGTTCTGC 3'
IL6	5' 6FAM TCCAAGTGACTATTGGCTT MGBNFQ 3'
	5' AGCCCTGAGAAAGGAGACATGTA 3'
	5' TCTGCCAGTGCCTCTTTGCT 3'
LEPTINA	5' 6FAM CAAGAGTAACATGTGTGAAA GMGBNFQ 3'
	5' CACCAAACCCTCATCAAGACA 3'
	5' GACTTTCTGTTTGGAGGAGACTGACT 3'
PPAR γ	5' 6FAM AGGATCAATGACATTTTC MGBNFQ 3'
	5' GCAAAGGCGAGGGCG 3'
	5' CCCATCATTAAAGGAATTCATGTCAT 3'
GAPDH	5' 6FAM CAGACAAATCACCATTCG MGBNFQ 3'
	5' GGAAGGTGAAGGTCGGAGTCA 3'
	5' CTGGAAGATGGTGTGATGGGATTTTC 3'
	5' VIC TCAGCCTTGACGGTGC MGBNFQ 3'

Nota: SUR1: receptor de sulfoniluréia 1; KIR6.2: potassium inward-rectifier channel; IL6: interleucina 6; PPAR γ : receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama; GAPDH: gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase (controle endógeno)

A PCR em tempo real foi realizada nas seguintes condições: 20 μ L de volume final de reação contendo TaqMan™ *master mix* 1 X (AmpliTaQ™ DNA Polimerase, dNTPs com dUTP, AmpErase UNG) (Applied Biosystems, Foster City, EUA), 3000 nM de iniciadores e 200 nM das sondas marcadas. O programa de amplificação no PCR foi constituído de: (1) um ciclo de 2 min a 50°C (ativação da UNG);

(2) um ciclo de 5 minutos a 95°C (inativação da UNG); (3) 40 ciclos de 15 seg a 95°C (desnaturação); e, (4) 1 min a 60°C (hibridização e extensão). Os sinais de fluorescência emitidos pelos fluoróforos das sondas TaqMan foram detectadas pelo equipamento ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Os dados foram analisados utilizando-se o programa *System 7500 SDS software* (Applied Biosystems, Foster City, EUA) que gera curvas semilogarítmicas dos sinais de amplificação. Esse programa fornece o parâmetro ciclo em que o sinal de fluorescência é significativo, denominado ciclo threshold (Ct) (BUSTIN, 2000).

Para cada amostra cDNA, o Ct de cada gene foi registrado e comparado com o GAPDH que é utilizado como controle endógeno. Os valores de Ct obtidos nesses ensaios foram utilizados para o cálculo da expressão relativa de mRNA de cada gene alvo em relação à do controle endógeno (GAPDH). O resultado é denominado Delta Ct (ΔCt) e representa a taxa de expressão do gene em estudo em relação ao gene endógeno. É calculada pela seguinte fórmula:

$$\Delta Ct = (Ct_{\text{gene alvo}} - Ct_{\text{controle endógeno}})$$

4.4.3. Determinação da zigosidade com base em microssatélites do DNA

A atribuição de monozigosidade ou de dizigosidade aos gêmeos foi realizada por intermédio da investigação da concordância dos gêmeos em relação a marcadores genéticos polimórficos (DNA), como os genes de locos de microssatélites, também conhecidos pela sigla STR (Short Tandem Repeat) (HILL & JEFFREYS, 1985). Os microssatélites são trechos de DNA que consistem em unidades repetidas de dois, três ou quatro nucleotídeos.

Para a análise, aproximadamente 20 μL de sangue de cada participante foi pipetado diretamente para o QIAcard FTA Spots da QIAGEN com tecnologia Whatman® FTA onde posteriormente foi realizada a extração do DNA através do FTA reagente Whatman®. A análise do DNA dos gêmeos ocorreu utilizando a técnica de extração e amplificação do DNA por cadeia de reação da polimerase (PCR). Em todas as amostras de DNA, a análise de 16 STRs autossômicos (CSF1PO, D2S1338, D3S1358, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, D5S51, FGA, TH01, TPOX, vWA e o *locus* da Amelogenina), foi efetuada por amplificação em PCR, utilizando o *kit* comercial *Identifiler* (AB Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante. A genotipagem foi efetuada em aparelho ABI 310 Genetic Analyzer (AB Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante, por determinação do tamanho dos fragmentos de DNA e comparação com escalas alélicas fornecidos com os *kits* comerciais.

4.5. Análise estatística

Para o atendimento dos objetivos, os gêmeos foram separados por gênero, para a comparação entre meninos e meninas; considerados como amostra total, para o estabelecimento das relações entre as variáveis e; divididos em grupos concordantes e discordantes para o VO₂máx com a finalidade de controlar os efeitos genéticos. As análises foram realizadas com auxílio de um pacote estatístico comercial (SPSS versão 13.0) adotando como nível de significância $p < 0,05$. Inicialmente o teste de *Shapiro Wilk* foi utilizado para a análise da distribuição dos dados. Variáveis com distribuição normal foram apresentadas em valores de média e desvio-padrão (\pm) enquanto variáveis assimétricas em valores de mediana (mínimo-máximo). Como a maioria das variáveis apresentou distribuição assimétrica métodos estatísticos não paramétricos foram adotados para as análises dos dados. Dessa forma, o teste *Mann-Whitney* foi empregado para testar a significância entre meninos e meninas, enquanto coeficiente de correlação de *Spearman* (ρ) foi utilizado para análise das associações estatísticas entre VO₂máx com expressão dos genes, variáveis físicas e bioquímicas. Para verificar a presença de diferenças entre os gêmeos com maior e menor VO₂máx (concordantes e discordantes) em relação a expressão dos genes, variáveis físicas e bioquímicas, utilizou-se o teste *Wilcoxon*.

5. RESULTADOS

5.1. Descrição da amostra

Todos os gêmeos localizados foram convidados, em consonância com seus respectivos responsáveis, a participarem do estudo. Após o contato inicial, 54 pares de gêmeos e 2 trigêmeos aceitaram participar da pesquisa (Quadro 3). Todos foram submetidos aos procedimentos de coleta sanguínea, medidas antropométricas e teste de aptidão cardiorrespiratória.

Os gêmeos foram classificados em monozigóticos (MZ) e dizigóticos (DZ) com base nos microssatélites do DNA (Quadro 5). De acordo com a análise, dos 54 pares e dois trigêmeos, 37 pares e duas meninas pertencentes a um trigêmeo (♂♀♀) foram considerados MZ enquanto que, 16 pares foram classificados como DZ. Os trigêmeos constituídos por três meninas também foram diagnosticados como MZ. Entre os meninos, 14 pares e entre as meninas, 23 pares e duas irmãs (1 par) pertencentes a um trio formado por mais um menino, foram considerados MZ. Para atender aos objetivos deste estudo apenas os gêmeos MZ (38 pares) que possibilitaram a constituição de pares foram incluídos na análise (Quadro 5).

QUADRO 5. Determinação da zigosidade por meio de microssatélites do DNA dos gêmeos participantes

Zigossidade	Pares		Trigêmeos	Total n	Total n (MZ)*
	MZ	DZ			
Meninos n (pares)	28 (14*)	10 (5)	1	39	28 (14)
Meninas n (pares)	46 (23)	24 (12)	5 (1)	75	48 (24)
Todos n (pares)	74 (37)	34	6 (1)	114	76 (38)

Nota: *Em negrito apenas os gêmeos MZ

A Tabela 1 apresenta os valores descritivos dos gêmeos MZ em relação à faixa etária, características físicas e de aptidão cardiorrespiratória (VO_2 máx). A amostra foi constituída por 14 pares de meninos e 24 pares de meninas. Após teste de normalidade (Shapiro-Wilk), observou-se a presença de variáveis com distribuição assimétrica que, em função disso, foram apresentadas em forma de mediana (md) e valores mínimos e máximos. Por sua vez, as variáveis distribuídas normalmente foram exibidas como média e desvio padrão (\pm). Os meninos demonstraram valores significativamente superiores no VO_2 máx e inferiores na adiposidade corporal (soma de seis dobras cutâneas) quando comparados aos resultados das meninas.

TABELA 1. Idade, características físicas e VO_2 máx de 38 pares de gêmeos MZ (n=76)

Variáveis	Todos pares (n=76)	Meninos (n=28)	Meninas (n=48)
Idade	14,5 (11-18)	13,0 (11-17)	15,0 (11-18)
MC	51,4 \pm 13	50,9 \pm 14,1	49,9 (32,8-89,6)
Estatura	158,2 \pm 10,6	160,9 \pm 13,8	159 (134,1-170)
IMC	19,4 (14,3-32,8)	19,2 \pm 2,8	19,7 (14,6-32,8)
CC	67,5 (54,5-102,5)	67,2 (54,5-82,8)	67,5 (56,0-103,0)
Adiposidade	84,6 (30,8-272,0)	61,0 (30,8-128,2)	107,3 (40,8-272,0)^a
VO_2 máx	40,3 \pm 10,2	48,5 \pm 9,1	35,5 \pm 7,4^a

Nota: Idade: em anos; MC: massa corporal (kg); Estatura em cm; IMC: índice de massa corporal (kg/m^2); CC: circunferência da cintura (cm); Adiposidade: soma de seis dobras cutâneas (mm); VO_2 máx: consumo máximo de oxigênio ($ml.kg^{-1}.min^{-1}$). Dados apresentados como média e desvio padrão (\pm) para variáveis com distribuição normal e mediana (md) (mínimo-máximo) para variáveis assimétricas.

^a $p < 0,01$: meninos vs meninas, teste independente Mann-Whitney

A Tabela 2 exibe as características bioquímicas dos participantes. Foi observada diferença significativa entre os sexos na concentração de glicose e insulina em jejum, insulina 2 horas, nos índices Homa (RI e β) e leptina. Os meninos apresentaram maior concentração sanguínea de glicose em jejum, enquanto as meninas demonstram concentrações superiores para insulina em jejum, insulina 2 horas, Homa (RI e β) e na leptina.

TABELA 2. Características das concentrações bioquímicas de 38 pares de gêmeos MZ (n=76)

Variáveis	Todos MZ (n=76)	Meninos (n=28)	Meninas (n=48)
Glic jej	86,1 \pm 8,7	89,0 (71-117)	84,0 (70-107)^b
Glic 2h	93 (53-151)	96,1 \pm 16,9	94,7 \pm 22,4
Insul Jej	6,8 (1-51)	6,0 \pm 2,1	10,5 \pm 8,5^a
Insul 2h	37,2 (5,7-173,5)	28,2 (5,7-81,3)	44,6 (9,4-173,5)^a
Homa-RI	1,5 (0,2-10,1)	1,3 (0,4-2,9)	1,6 (0,2-10,1)^a
Homa- β	115,9 (20,5-1013,7)	92,2 (20,5-194,9)	147,0 (50,8-1013,7)^a
CT	152,5 \pm 33,8	148,3 \pm 36,5	155 \pm 32,3
HDL-C	42 (26-168)	43,0 (32-168)	41,5 (26-66)
LDL-C	93,6 \pm 29,8	95,0 \pm 25,8	92,6 \pm 32,1
TG	74,5 (43-182)	70,0 (43-176)	82,5 (45-182)
Leptina	5,5 (1,5-35,8)	3,0 (1,5-6,9)	9,4 (2,2-35,8)^a
IL6	2,0 (2-17,8)	2,0 (2-8,2)	2,0 (2-17,8)

Nota: Glic jej: glicemia em jejum (mg/dL); Glic 2h: glicemia pós carga (mg/dL); Ins jej: insulina em jejum (mg/dL); Ins 2h: insulina pós carga (mg/dL); Homa-RI: Homeostasis model assessment (resistência à insulina); Homa- β : função secretora das células beta; CT: colesterol total (mg/dL); HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade (mg/dL); LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade (mg/dL); TG: triglicérides (mg/dL); Leptina (ng/mL); IL6: interleucina 6 (pg/mL) Dados apresentados como média e desvio padrão (\pm) para variáveis com distribuição normal e mediana (mínimo-máximo) para variáveis assimétricas.

^ap<0,01; ^bp<0,05: meninos vs meninas, teste independente Mann-Whitney

A Tabela 3 apresenta, em unidades de ΔCt , a expressão dos genes SUR1, KIR6.2, IL6, LEPTINA e PPARg obtidos em sangue periférico de todos os gêmeos MZ bem como separados por sexo. Não houve diferenças na expressão destes genes em relação ao sexo.

TABELA 3. Valor de expressão gênica (ΔCt) em gêmeos MZ

Genes	n	Todos MZ	n	Meninos	n	Meninas
SUR1	38	0,0138321 (0,00009-0,39668)	18	0,02017765 (0,000093-0,396675)	20	0,04180249 $\pm 0,050861244$
KIR6.2	38	0,0816469 (0,00035-1,74372)	18	0,10928142 (0,001554-1,743716)	20	0,01842444 (0,000349-1,246468)
IL6	28	0,0003256 (0,00007-0,01652)	12	0,00055116 (0,000101-0,008483)	16	0,00248799 $\pm 0,004603282$
LEPTINA	18	0,0000691 (0,00001-0,00027)	8	0,00008194 (0,000036-0,000268)	10	0,00006479 (0,000012-0,000241)
PPARg	26	0,0002730 (0,00005-0,00289)	10	0,00076730 $\pm 0,000963271$	16	0,00026269 $\pm 0,000140795$

Nota: SUR1: receptor de sulfoniluréia 1; KIR6.2: potassium inward-rectifier channel; IL6: interleucina 6; PPARg: receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama. Dados apresentados como média e desvio padrão (\pm) para variáveis com distribuição normal e mediana (md) (mínimo-máximo) para variáveis assimétricas; A expressão do mRNA dos genes são exibidos em valores de $\Delta Ct = Ct_{\text{gene alvo}} - Ct_{\text{controle endógeno (GAPDH)}}$.

Meninos vs meninas, teste independente Mann-Whitney

5.2. Relação entre VO₂máx com idade, características físicas, expressão gênica e variáveis bioquímicas em gêmeos MZ

A análise da correlação de Spearman (ρ) entre VO₂máx, idade e características físicas da amostra total (n=76) demonstrou uma relação inversa entre aptidão cardiorrespiratória e os indicadores de obesidade, como IMC ($\rho = -0,363$), CC ($\rho = -0,305$) e adiposidade ($\rho = -0,628$). Por sua vez, a idade, a MC e a estatura apresentaram relação positiva com estes indicadores (Tabela 4).

TABELA 4. Relação entre VO₂máx, idade e características físicas de gêmeos MZ

	Idade	MC	Estatura	IMC	CC	Adiposidade
VO ₂ máx	-0,218	-0,186	0,160	-0,363**	-0,305**	-0,628**
Idade		0,607**	0,581**	0,495**	0,585**	0,430**
MC			0,765**	0,886**	0,922**	0,672**
Estatura				0,449**	0,632**	0,266*
IMC					0,869**	0,790**
CC						0,698**

Nota: VO₂máx: consumo máximo de oxigênio (ml.kg⁻¹.min⁻¹); Idade em anos; MC: massa corporal (kg); Estatura em cm; IMC: índice de massa corporal (kg/m²); CC: circunferência da cintura (cm); Adiposidade: soma de seis dobras cutâneas (mm).

Coefficiente de Correlação de Spearman (ρ) **p<0,01; *p<0,05

A análise da relação entre aptidão cardiorrespiratória e bioquímica sanguínea revelou um comportamento inverso entre VO₂máx e as concentrações de insulina em jejum ($\rho = -0,292$), insulina pós carga ($\rho = -0,226$), índice Homa-RI ($\rho = -0,268$), Homa- β ($\rho = -0,270$) e na leptina ($\rho = -0,737$). A concentração de glicose pós carga (Glic 2h) demonstrou correlação positiva com glicose em jejum ($\rho = 0,275$), CT ($\rho = 0,222$) e insulina pós carga ($\rho = 0,656$), enquanto CT apresentou correlação direta com LDL-C ($\rho = 0,861$) e TG ($\rho = 0,371$) e inversa com HDL-C ($\rho = -0,210$). Por sua vez, HDL-C também demonstrou relação negativa com LDL-C ($\rho = -0,310$) e TG ($\rho = -0,520$). Outras relações ainda podem ser observadas na Tabela 5 entre os índices Homa (RI e β), colesterol LDL-C, TG, insulina em jejum e pós-carga e leptina. A concentração plasmática de IL6 não demonstrou relação com nenhuma outra variável investigada.

TABELA 5. Relação entre VO₂máx e as variáveis bioquímicas em gêmeos MZ

	Glic jej	Glic 2h	Insul Jej	Insul 2h	Homa-RI	Homa β	CT	HDL-C	LDL-C	TG	Leptina	IL6
VO ₂ máx	0,107	0,094	-0,292*	-0,226*	-0,268*	-0,270*	0,112	-0,039	0,196	-0,060	-0,737**	-0,119
Glic jej		0,275*	0,158	0,059	0,291*	-0,501**	0,080	-0,142	0,142	0,084	-0,002	-0,011
Glic 2h			0,106	0,656**	0,152	-0,177	0,222*	0,100	0,191	0,081	-0,009	0,013
Insul Jej				0,428**	0,977**	0,703**	-0,073	-0,175	-0,186	0,390**	0,465**	-0,116
Insul 2h					0,430**	0,220	0,156	-0,001	0,089	0,276*	0,461**	-0,144
Homa-RI						0,592**	-0,054	-0,167	-0,166	0,382**	0,409**	-0,121
Homa β							-0,078	-0,125	-0,198	0,293*	0,393**	-0,089
CT								-0,210*	0,861**	0,371**	-0,175	-0,169
HDL-C									-0,310**	-0,520**	-0,060	0,000
LDL-C										0,217*	-0,259*	-0,066
TG											0,191	0,040
Leptina												0,006

Nota: VO₂máx: consumo máximo de oxigênio (ml.kg⁻¹.min⁻¹); Glic jej: glicemia em jejum (mg/dL); Glic 2h: glicemia pós carga (mg/dL); Ins jej: insulina em jejum (mg/dL); Ins 2h: insulina pós carga (mg/dL); Homa-RI: Homeostasis model assessment (resistência à insulina); Homa-β: função secretora das células beta; CT: colesterol total (mg/dL); HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade (mg/dL); LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade (mg/dL); TG: triglicérides (mg/dL); Leptina (ng/mL); IL6: interleucina 6 (pg/mL)

Coefficiente de Correlação de Spearman (rho) **p<0,01; *p<0,05

A aptidão cardiorrespiratória (VO₂máx) foi diretamente relacionada com a expressão do mRNA do gene PPARg (rho = 0,515). Diferentemente da inexistência de relação entre a expressão do gene IL6 com variáveis bioquímicas, quando comparado com a expressão de outros genes, demonstrou correlação moderada positiva com a expressão do gene Leptina (rho = 0,531) e muito forte com os genes KIR6.2 (rho = 0,861) e SUR1 (rho = 0,911). Ainda, as duas subunidades dos canais de potássio (KIR6.2 e SUR1) demonstraram forte correlação entre si (rho = 0,960) (Tabela 6).

TABELA 6. Relação entre VO₂máx e a expressão gênica em pares de gêmeos MZ

	IL6	KIR6.2	LEPTINA	PPARg	SUR1
n	28	38	18	26	38
VO ₂ máx	0,179	0,193	0,263	0,515**	0,142
IL6		0,861**	0,531*	-0,203	0,911**
KIR6.2			0,065	-0,137	0,960**
LEPTINA				0,368	0,106
PPARg					-0,081

Nota: VO₂máx: consumo máximo de oxigênio (ml.kg⁻¹.min⁻¹); SUR1: receptor de sulfoniluréia 1; KIR6.2: potassium inward-rectifier channel; IL6: interleucina 6; PPARg: receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama

Coefficiente de Correlação de Spearman (rho) **p<0,01; *p<0,05

5.3. Comparação entre irmãos gêmeos discordantes e concordantes para aptidão cardiorrespiratória

Como planejado, uma diferença fixa de $10 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ na aptidão cardiorrespiratória dentro dos pares de gêmeos MZ foi utilizada para estabelecer concordância e discordância entre os pares para o $\text{VO}_2\text{máx}$. Neste sentido, os gêmeos que apresentaram diferença absoluta dentro do par igual ou superior a $10 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ no $\text{VO}_2\text{máx}$, foram considerados discordantes para aptidão cardiorrespiratória. Por sua vez, os pares concordantes foram aqueles que demonstraram diferenças inferiores a $10 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$. Seguindo o raciocínio, os grupos formados (concordantes e discordantes) ainda foram internamente separados em dois sub-grupos, um constituído pelo irmão do par com *maior* $\text{VO}_2\text{máx}$ e outro pelo irmão com *menor* $\text{VO}_2\text{máx}$. O objetivo de procurar discordâncias fenotípicas em pares de gêmeos MZ foi o de demonstrar os efeitos da variável discordante ($\text{VO}_2\text{máx}$) em outros fenótipos (expressão) independente da genética.

Vale destacar que a diferença relativa entre o gêmeo com maior e menor $\text{VO}_2\text{máx}$ (discordantes) variou de 16,9 a 42,1%, com média de $30,6 \pm 9,5\%$ e para os gêmeos concordantes, essa diferença variou de 0,3 a 33% com média de $10,6 \pm 8,2\%$ (dados não apresentados). Por sua vez, a média absoluta dessas diferenças para os pares discordantes foi de $13,5 \pm 3,7 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ e de $3,6 \pm 2,3 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ para os pares concordantes (Tabela 7).

Os gêmeos discordantes apresentaram valores médios de $\text{VO}_2\text{máx}$ de $45,9 \pm 10,0$ vs $32,4 \pm 10,6 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ para o irmão mais apto e menos apto, respectivamente. Entre os gêmeos concordantes, esses valores foram respectivamente, para o irmão mais apto e menos apto, de $42,4 \pm 9,2$ vs $38,8 \pm 9,8 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$. Em ambos os grupos, estas diferenças foram estatisticamente significantes ($p < 0,01$). Observou-se que no grupo formado por pares de gêmeos MZ discordantes, as concentrações de glicose em jejum foram significativamente inferiores no irmão gêmeo com maior $\text{VO}_2\text{máx}$. Por sua vez, não foi notada diferença entre os irmãos gêmeos MZ concordantes (Tabela 7).

TABELA 7. Comparação entre as variáveis físicas e bioquímicas de 38 pares de gêmeos MZ com maior (9 pares) e menor (29 pares) diferença intra-par para o VO₂máx (≠ dentro dos pares)

Variáveis	Gêmeos MZ discordantes (9 pares) [▪]		Gêmeos MZ concordantes (29 pares) [•]	
	Maior	Menor	Maior	Menor
VO ₂ máx	45,9 ± 10,0	32,4 ± 10,6^a	42,4 ± 9,2	38,8 ± 9,8^a
Idade	13,9 ± 2,2		14,2 ± 2,1	
n (♂/♀)	18 (8/10)		58 (20/38)	
MC	46,4 ± 9,0	46,2 ± 8,7	51,2 ± 14,1	53,7 ± 13,6
Estatura	155,7 ± 11,5	156,4 ± 11,0	158,8 ± 10,6	159,1 ± 10,6
IMC	18,9 ± 1,4	18,7 ± 1,5	19,4 (14,6-32,8)	20,6 (14,3-31,4)
CC	66,5 ± 4,4	65,7 ± 5,0	66,0 (55-103)	71,2 (54,5-100,5)
Adiposidade	68,9 ± 25,8	72,0 ± 29,0	93 (30,8-272)	100,4 (33,8-248,6)
Glic jej	82,9 ± 7,3	86,7 ± 7,6^b	86,6 ± 8,6	86,3 ± 9,6
Glic 2h	88,0 ± 20,4	83,0 ± 18,4	97,6 ± 19,5	98,8 ± 20,8
Insul Jej	5,4 ± 1,5	6,0 ± 1,6	9,8 ± 9,4	9,8 ± 6,6
Insul 2h	36,5 ± 34,6	25,3 ± 13,7	50,4 ± 39,5	54,5 ± 36,5
Homa-RI	1,0 (0,7-1,8)	1,2 (0,7-2,0)	1,6 (0,4-10,1)	1,6 (0,2-6,5)
Homa-β	106,1 (77,4-194,9)	86,4 (50,3-147,5)	108,4 (20,5-1013,7)	130,1 (37,4-614,2)
CT	151,2 ± 42,1	161,7 ± 36,4	149,3 ± 31,3	153,2 ± 34,1
HDL-C	42,6 ± 5,3	44,2 ± 5,6	42,0 (26-168)	44,0 (27-166)
LDL-C	93,2 ± 40,1	102,5 ± 34,6	91,2 ± 26,7	93,1 ± 28,8
TG	77,2 ± 26,1	74,9 ± 27,1	77,0 (50-182)	75 (43-178)
Leptina	5,7 ± 3,6	5,3 ± 3,0	10,1 ± 9,6	10,9 ± 10,1
IL6	2,0 (2-4,1)	2,0 (2-4,4)	3,7 ± 3,7	3,1 ± 3,0

Nota: VO₂máx: consumo máximo de oxigênio (ml.kg⁻¹.min⁻¹); Idade em anos; MC: massa corporal (kg); Estatura em cm; IMC: índice de massa corporal (kg/m²); CC: circunferência da cintura (cm); Adiposidade: soma de seis dobras cutâneas (mm); Glic jej: glicemia em jejum (mg/dL); Glic 2h: glicemia pós carga (mg/dL); Ins jej: insulina em jejum (mg/dL); Ins 2h: insulina pós carga (mg/dL); Homa-RI: Homeostasis model assessment (resistência à insulina); Homa-β: função secretora das células beta; CT: colesterol total (mg/dL); HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade (mg/dL); LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade (mg/dL); TG: triglicérides (mg/dL); Leptina (ng/mL); IL6: interleucina 6 (pg/mL).

▪ Diferença intra-par para o VO₂máx ≥ a 10 ml.kg⁻¹.min⁻¹;

• Diferença intra-par para o VO₂máx menor do que 10 ml.kg⁻¹.min⁻¹.

Dados apresentados como média e desvio padrão (±) para variáveis com distribuição normal e mediana (md) (mínimo-máximo) para variáveis assimétricas.

^ap<0,01; ^bp<0,05: maior vs menor VO₂máx dentro dos pares concordantes e discordantes, teste pareado Wilcoxon

A Tabela 8 apresenta, em unidades de ΔCt , a expressão dos genes SUR1, KIR6.2, IL6, LEPTINA e PPARg obtidos em sangue periférico de gêmeos MZ discordantes e concordantes para VO_2 máx. A análise indicou a existência de diferença significativa na expressão do mRNA do gene PPARg em gêmeos discordantes para o VO_2 máx. Neste grupo, foi observado que o irmão com maior aptidão cardiorrespiratória apresentou um aumento na expressão deste gene quando comparado com seu co-gêmeo com menor aptidão cardiorrespiratória. Por sua vez, no grupo concordante, não foram observadas diferenças entre os irmãos com maior e menor VO_2 máx.

TABELA 8. Comparação entre valores da expressão gênica (ΔCt) de 19 pares de gêmeos MZ com maior (4 pares) e menor (15 pares) diferença intra-par para o VO_2 máx (\neq dentro dos pares)

Variáveis	Gêmeos MZ discordantes (9 pares) [■]			Gêmeos MZ concordantes (29 pares) [•]		
	Pares	Maior	Menor	Pares	Maior	Menor
VO ₂	4	43,0 ± 9,6	33,1 ± 9,4^a	15	43,4 ± 9,4	41,1 ± 9,6^a
SUR1	4	0,00325056 (0,001534-0,103700)	0,00474254 (0,000093-0,022734)	15	0,03110333 (0,000191-0,131816)	0,02704441 (0,000095-0,396675)
KIR6.2	4	0,00914446 (0,003772-0,409977)	0,01043796 (0,001857-0,198246)	15	0,11132125 (0,000646-1,246468)	0,15698910 (0,000349-1,743716)
IL6	2	0,00024340 (0,000223-0,000264)	0,00021574 (0,000144-0,000288)	12	0,00042249 (0,000101-0,016518)	0,00071843 (0,000073-0,008483)
LEPTINA	4	0,00006028 (0,000055-0,000268)	0,00006788 (0,000036-0,000119)	5	0,00007223 (0,000012-0,000134)	0,00008452 (0,000048-0,000241)
PPARg	4	0,00062571 (0,000107-0,002886)	0,00035223 (0,000100-0,002074)^b	9	0,00025452 (0,000070-0,000473)	0,00030940 (0,000049-0,000513)

Nota: VO_2 máx: consumo máximo de oxigênio ($ml.kg^{-1}.min^{-1}$); SUR1: receptor de sulfoniluréia 1; KIR6.2: potassium inward-rectifier channel; IL6: interleucina 6; PPARg: receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama; Dados apresentados como mediana (mínimo-máximo);

A expressão do mRNA dos genes são exibidos em valores de $\Delta Ct = Ct_{\text{gene alvo}} - Ct_{\text{controle endógeno (GAPDH)}}$.

■ Diferença intra-par para o VO_2 máx maior ou igual a $10 ml.kg^{-1}.min^{-1}$;

• Diferença intra-par para o VO_2 máx menor do que $10 ml.kg^{-1}.min^{-1}$

^a $p < 0,01$; ^b $p < 0,05$: maior vs menor VO_2 máx dentro dos pares concordantes e discordantes, teste pareado Wilcoxon

6. DISCUSSÃO

O modelo de estudo com gêmeos MZ tem contribuído enormemente para a compreensão dos efeitos que o estilo de vida e fatores ambientais provocam em fenótipos humanos (MARTIN et al., 1997). Entre indivíduos geneticamente idênticos as diferenças intra-par são causadas por fatores ambientais e podem, consequentemente, serem utilizados em estudos de relacionamento enquanto os fatores genéticos são controlados (MUSTELIN et al., 2008). Em outras palavras, diferenças dentro do par de gêmeos MZ para um determinado fenótipo são atribuídas a fatores ambientais ou outras características para os quais os pares de gêmeos são discordantes (GREENFIELD *et al.*, 2003). Neste estudo, de abordagem transversal, estudamos gêmeos MZ que eram ou discordantes ou concordantes para o VO_2 máx para testamos os efeitos da aptidão cardiorrespiratória na expressão de genes e em variáveis bioquímicas (medidas laboratoriais), independente dos efeitos genéticos.

6.1. Comparação entre meninos e meninas

Primeiramente, foi examinado se haviam diferenças entre os gêmeos em relação ao sexo para as variáveis investigadas. Não foram verificadas diferenças entre os gêneros em relação à idade, medida de massa corporal (MC) e estatura, índice de massa corporal (IMC) e circunferência da cintura (CC). Porém as meninas demonstraram significativamente maior adiposidade corporal indicada pela soma das seis espessuras das dobras cutâneas nas regiões tricipital, subescapular, supra-ílica, abdominal, coxa média e perna medial. A medida das espessuras das dobras cutâneas fornece um parâmetro de adiposidade corporal total, uma vez que aproximadamente metade do conteúdo de gordura do corpo está localizada na região subcutânea, com o restante sendo gordura visceral e orgânica (McARDLE et al., 2003).

Os resultados também revelaram que a aptidão cardiorrespiratória (VO_2 máx) foi significativamente menor nas meninas do que nos meninos. Na adolescência, os valores médios de VO_2 máx expressos relativamente à massa corporal ($ml \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$) são 20 a 25% mais altos nos rapazes do que nas moças (ROWLAND, 2008). Neste estudo a diferença entre meninos e meninas foi de 42% (48,5 vs 35,5 $ml \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$). Alguns fatores que explicam essa discrepância incluem diferenças próprias relacionadas ao sexo feminino, como, menor massa corporal magra, concentração de hemoglobina, atividade física habitual e maior quantidade de gordura corporal total. Vale ressaltar que representam em grande parte, diferenças biológicas reais entre meninos e meninas.

Em relação à comparação dos valores das variáveis bioquímicas entre os sexos, observou-se que as meninas apresentaram menor concentração de glicose em jejum e maiores de insulina jejum, insulina 2h, índices Homa (RI e β) e de leptina. Em relação à leptina plasmática, um estudo que sustenta nossos achados foi realizado com gêmeos MZ. Os resultados demonstraram que as meninas apresentaram concentrações três vezes maiores do que os meninos, tanto quando classificadas como grupo obeso quanto não-obeso (RÖNNEMAA *et al.*, 1997b). Está estabelecido na literatura que as variáveis mais importantes na regulação da leptina são a massa de gordura corporal (MEIER & GRESSNER, 2004) e a concentração de insulina. Foi observado que crianças com cetoacidose diabética tratadas com insulina apresentaram significativo aumento na leptina plasmática (HATHOUT *et al.*, 1999). Da mesma forma que a leptina, as concentrações de insulina também são proporcionais a quantidade de gordura corporal (FRENCH & CASTIGLIONE, 2002). Para relacionar essas informações com nossos resultados é necessário estabelecer as diferenças entre os sexos no conteúdo de gordura corporal. Neste sentido, a quantidade de gordura corporal relativa ao peso corporal apresenta tendência crescente em ambos os sexos até por volta de 10-11 anos de idade. No entanto, na sequência, entre os meninos essa ascensão estabiliza ou até reduz por alguns anos, enquanto entre as meninas nota-se uma tendência crescente e acentuada de deposição de gordura com o passar dos anos (GUEDES & GUEDES, 1997). Essa característica de caráter biológico/cultural, juntamente com a evidência de maior adiposidade (soma de dobras cutâneas), pode explicar em parte as maiores concentrações de insulina, índices Homa (RI e β) e de leptina nas meninas em relação aos meninos demonstradas neste estudo. Deve-se destacar também que a insulinemia superior nas meninas pode ter contribuído para a menor concentração de glicose observada em jejum, comparada aos meninos, uma vez que é o hormônio responsável em mediar o transporte de glicose através das membranas celulares.

Quanto a expressão dos genes SUR1, KIR6.2, IL6, LEPTINA e PPAR γ entre meninos e meninas, não foram identificadas diferenças entre os sexos. Porém, um fato chama a atenção na comparação entre meninos e meninas em relação às concentrações das variáveis bioquímicas e na expressão dos genes investigados. As meninas demonstraram significativamente maior concentração de leptina (mediana) do que os meninos (md 9,4 vs 3,0 ng/ml, respectivamente). Contudo, os valores de expressão do mRNA do gene LEPTINA não foram diferentes entre os sexos. Em estudos experimentais, o exercício foi associado com um aumento na concentração sanguínea de citocinas (IL6, IL-1 β , TNF α), mas não na expressão dos mesmos genes (MOLDOVEANU *et al.*, 2000). Em outro, foi notado efeito contrário, no qual o exercício implicou no aumento da expressão dos genes (IL6, IL8, TNF α), mas não no aumento das proteínas circulantes (BUFORD *et al.*, 2009). Este estudo sugere que a expressão não resulta necessariamente em síntese de proteínas. No entanto, essas discrepâncias,

apesar de não serem bem compreendidas, também são influenciadas pela escolha das células alvo para se determinar a expressão do gene (leucócitos totais do sangue periférico, tecido muscular ou adiposo), da idade da amostra e da intensidade do programa de exercícios. Neste sentido, Clayton & Tillmann (1998) relatam que o mRNA da LEPTINA é expresso exclusivamente no tecido adiposo enquanto possui receptores em todos os tecidos.

6.2. Correlação entre VO₂máx, idade, características físicas, variáveis bioquímicas e a expressão do mRNA dos genes em gêmeos MZ

Utilizando todos os gêmeos MZ (n = 76), procuramos verificar a relação, mediante correlação de Spearman, entre o VO₂máx com as variáveis investigadas. Foi observada relação inversa entre VO₂máx com IMC (rho = -0,363), CC (rho = -0,305) e adiposidade (rho = -0,628). Não é novidade que indivíduos mais ativos, ou aptos fisicamente, apresentam menor quantidade de gordura corporal. Esta associação é encontrada em todas as faixas etárias e gêneros. Há enormes dificuldades metodológicas em desenvolver experimentos que permitam testar quem é a causa ou o efeito desta relação. Porém, um estudo longitudinal demonstrou que uma baixa demanda energética provocada pela atividade física pode ser um preditor mais forte do que a dieta no ganho de peso em adultos (KLESGES *et al.*, 1992).

A aptidão cardiorrespiratória apresentada pelos gêmeos também demonstrou relação significativamente inversa, porém fraca, para a concentração de insulina em jejum (rho = -0,292), insulina pós-carga (rho = -0,226), índice Homa-RI (rho = -0,268) e Homa-β (rho = -0,270); no entanto, uma correlação forte com a concentração de leptina (rho = -0,737). Estudos experimentais demonstram que o exercício físico está associado ao aumento na sensibilidade à insulina (Homa-RI), na função das células beta pancreática (Homa-β) e na tolerância à glicose (LAKKA *et al.*, 2004; DELA *et al.*, 2004; WEI *et al.*, 1999). Outras evidências corroboram que o exercício físico melhora a sensibilidade à insulina nos tecidos periféricos e reduz as concentrações de insulina e de glicose plasmática em idosos e jovens (COKER *et al.*, 2006; KANG *et al.*, 2002).

Pelo fato do exercício físico promover aumento no VO₂máx, estas pesquisas concordam indiretamente com este estudo. Em nossa amostra de jovens, verificamos que quanto maior a aptidão cardiorrespiratória menor a concentração de insulina em jejum e pós-carga de glicose, bem como os índices Homa (RI e β). Foi observado em outro estudo que indivíduos diabéticos ou resistentes à insulina apresentam baixa aptidão cardiorrespiratória (KOHL *et al.*, 1992). Em adultos, valores de aptidão cardiorrespiratória superiores a 31 ml.kg⁻¹.min⁻¹ foram associados a um menor risco de desenvolvimento de DM2 (LYNCH *et al.*, 1996).

Quanto a relação negativa encontrada em nossa análise entre VO_2 máx e a concentração de leptina em jovens, deve-se recordar que a leptina apresentou correlação positiva com as mesmas variáveis bioquímicas que o VO_2 máx, porém, ao contrário, de magnitude negativa (insulina em jejum, insulina pós carga, índice Homa-RI e Homa- β). Há uma grande quantidade de evidências associando a leptina (gene ou proteína) a gordura corporal. Neste sentido, um trabalho realizado com uma amostra de crianças e adultos revelou que o aumento na concentração de leptina é capaz de prever maior ganho de massa de gordura, principalmente na região subcutânea (KETTANEH *et al.*, 2007); em outro, a produção e secreção de leptina foi proporcional ao tamanho e número dos adipócitos (COUILLARD *et al.*, 2000). Estudos experimentais também mostram que os efeitos do exercício físico na redução da concentração de leptina pode ser mais evidente quando há alterações na massa de gordura ou na sensibilidade à insulina (BENATTI & LANCHÁ JÚNIOR, 2007). Neste sentido, tanto a insulina quanto a gordura corporal parecem modular fortemente a concentração de leptina no organismo. Estes estudos, apesar das diferenças metodológicas, estão de acordo com nossos resultados. Nós demonstramos que os gêmeos com menor aptidão cardiorrespiratória apresentaram relação direta com adiposidade corporal, concentração de leptina e de insulina.

Quanto a relação entre aptidão cardiorrespiratória (VO_2 máx) e expressão do mRNA dos genes investigados, foi observado correlação positiva com a transcrição do gene PPAR γ ($\rho = 0,515$). Análise de variantes do PPAR γ (PPAR γ C1A) e PPAR δ demonstraram efeitos aditivos no aumento da aptidão aeróbia e na sensibilidade à insulina em participantes de um programa de intervenção (STEFAN *et al.*, 2007). A ativação do PPAR γ está associada ao aumento do consumo de AGL pelo músculo esquelético e adiposo, inibição da expressão de genes pró-inflamatórios que desencadeiam a aterosclerose e no aumento da sensibilidade à insulina (JIANG *et al.*, 1998). Estes estudos indicam a existência de laços fisiológicos importantes entre o VO_2 máx e o gene PPAR γ . Evidências sugerem que a função mitocondrial, associada com a aptidão aeróbia e a resistência à insulina, é profundamente afetada pela expressão de coativadores (PGC-1 α e PGC-1 β) do gene PPAR γ (ST-PIERRE *et al.*, 2003)

Uma associação direta entre aptidão cardiorrespiratória com o gene PPAR γ foi demonstrada em remadores. Além do PPAR γ , o PPAR γ Ala e o PPAR δ também foram considerados marcadores genéticos associados com a performance física (AKHMETOV *et al.*, 2007). Apesar do reduzido número de estudos que investigaram a associação entre aptidão cardiorrespiratória com o gene PPAR γ , é possível deduzir que a relação demonstrada no presente estudo é benéfica tanto para o desempenho quanto para possíveis mecanismos que agem favoravelmente no metabolismo de glicose e lipídios.

6.3. Estudo controle de casos

A hipótese deste estudo foi que uma variação no VO_2 máx (aptidão cardiorrespiratória) entre gêmeos idênticos (MZ) igual ou superior a $10 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ seria capaz de influenciar as concentrações bioquímicas e a expressão de genes relacionados a secreção (SUR1, KIR6.2) e a sensibilidade à insulina (PPARg, IL6 e LEPTINA). Por meio do teste Wilcoxon, para medidas pareadas, a expressão do mRNA dos genes SUR1, KIR6.2, IL6, LEPTINA e PPARg, características físicas e bioquímicas foram comparadas entre o gêmeo com maior e menor VO_2 máx (modelo controle de casos), nos grupos concordante e discordante. Como os grupos são formados por gêmeos MZ, esta análise permite indicar que as diferenças entre os pares discordantes podem ser devidas a aptidão cardiorrespiratória, independente de efeitos genéticos.

Por um lado foi observado que, exceto para o VO_2 máx, não houve qualquer diferença significativa na expressão dos genes, em características físicas ou bioquímicas entre os 29 pares de gêmeos concordantes. A ausência de diferenças significativas entre as variáveis analisadas neste grupo de gêmeos MZ (diferença intra-par menor do que $10 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) talvez possa ser explicada pelo valor de corte para a definição de concordância e discordância. Neste caso o valor de $10 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ foi adequado para estabelecer discordância e concordância nesta faixa etária. Outra possibilidade é mais teórica. Nesta a concordância em gêmeos MZ jovens necessariamente não significa que o fenótipo (característica) seja genético em sua origem. Estes gêmeos vivem juntos e, por conseguinte, compartilham o mesmo ambiente. A concordância nesse caso poderia ser o resultado de similaridades genéticas e ambientais (compartilhadas). Entretanto, quando os gêmeos se separarem, o que ocorre mais tarde na vida, e ainda assim persistir concordância, daí então o resultado deveria sugerir que a doença é genética. Discordância, por sua vez, deve indicar que a doença é devida, no mínimo em parte, a fatores não genéticos (BARNETT *et al.*, 1981).

Por outro, foram identificadas diferenças significantes nos pares MZ que demonstraram média das diferenças intra-par (relativa) no VO_2 máx igual ou superior a $10 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ (discordantes). A esse respeito, as concentrações de glicose em jejum foram significativamente inferiores no irmão gêmeo com maior VO_2 máx. Em relação à expressão do mRNA dos genes SUR1, KIR6.2, IL6, LEPTINA e PPARg verificou-se que o irmão gêmeo com maior VO_2 máx demonstrou valores mais elevados de expressão apenas para o gene PPARg em relação ao seu irmão correspondente com menor aptidão cardiorrespiratória. Estes resultados sugerem que o modelo controle de casos empregado (gêmeos MZ discordantes) sustenta a hipótese de que a aptidão cardiorrespiratória pode modular a concentração plasmática de glicose e a expressão do PPARg independente de fatores genéticos.

As informações sobre o PPAR γ apontam um envolvimento direto com a diferenciação dos adipócitos, estoque de lipídios e sensibilidade a insulina (BERGER & MOLLER, 2002) e pode ser encontrado expresso tanto no tecido adiposo quanto no sangue periférico (MARQUES, 2008). A ativação do PPAR γ induz aumento do consumo de AGL pelo tecido muscular esquelético e adiposo o que promove redução na concentração deste lipídio no plasma. No tecido adiposo, a ação adipogênica do PPAR γ é antagônica a ação de citocinas pró-inflamatórias como o TNF α e a IL6 (JIANG *et al.*, 1998). Por sua vez, um polimorfismo do gene PPAR γ (uma substituição silenciosa de “C” para “T” (C161T) no exon 6 do gene) demonstrou associação com maior concentração de leptina plasmática do que em portadores do alelo 161C (MEIRHAEGHE *et al.*, 1998). Ao contrário, outro polimorfismo relativamente comum, localizado na porção amino-terminal da isoforma PPAR γ 2, substituindo a prolina por alanina no códon 12 (Pro12Ala), apresentou relação direta com maior sensibilidade à insulina e menor risco de DM2 (BARROSO *et al.*, 1999; TAVARES *et al.*, 2005). Tendo em vista a função desempenhada pelo PPAR γ e a indicação neste estudo de um aumento na sua transcrição em jovens com maior aptidão cardiorrespiratória, coloca em destaque os efeitos exercidos pelo VO $_2$ máx, independentes da genética, na prevenção primária de DM2 via inibição indireta de citocinas inflamatórias.

No entanto, juntamente com informações provenientes de estudos que empregaram métodos tradicionais de pesquisas básicas e aplicadas (sem controle de efeitos genéticos), como os estudos supramencionados, os conhecimentos oriundos de estudos com gêmeos MZ, oferecem valiosa oportunidade para a discussão dos resultados encontrados no presente estudo. Neste sentido, a investigação de uma amostra de gêmeos MZ jovens (em média 25 anos) discordantes para obesidade (IMC) resultou em uma série de artigos de interesse. Em um destes estudos, foi investigada a expressão de diversos genes no tecido adiposo dos gêmeos. Os resultados mostraram que o co-gêmeo obeso apresentou significativamente menor expressão dos genes PPAR γ e AdipoQ e maior expressão dos genes LEPTINA e TNF (PIETILÄINEN *et al.*, 2006a). Em outros estudos, foram reveladas associações, independentes da genética, entre obesidade e alterações no metabolismo de lipídios envolvidas com a aterogênese, inflamação e resistência à insulina (PIETILÄINEN *et al.*, 2007) e com distúrbios no metabolismo de aminoácido mitocondrial responsáveis pelo acúmulo de gordura no fígado, resistência à insulina e hiperinsulinemia (PIETILÄINEN *et al.*, 2008). Ainda, foi demonstrado em outra publicação, que a deficiência na concentração de AdipoQ (discordância), preferivelmente a obesidade por si, apresenta correlação independente com disfunções endoteliais (PIETILÄINEN *et al.*, 2006b).

A atividade física estimada por questionário foi determinada em uma amostra de gêmeas MZ de meia idade. Os resultados revelaram que as gêmeas mais ativas fisicamente apresentaram menor

adiposidade central e total (DEXA – *dual-energy X-ray absorptiometry*) do que sua co-gêmea mais obesa. Os autores demonstraram que após controle de fatores genéticos e ambientais, a influência da atividade física na adiposidade central e total era maior do que outros fatores ambientais como dieta, condição econômica, cigarro e reposição hormonal (SAMARAS *et al.*, 1999). A distribuição de gordura intra-abdominal foi estimada em 23 pares de gêmeos MZ (14 mulheres e 9 homens; 33 a 59 anos de idade) que apresentavam em média 18 kg de diferença intra-par na massa corporal. Os gêmeos discordantes para a gordura visceral apresentaram significativas alterações na sensibilidade à insulina e na tolerância à glicose (RÖNNEMAA *et al.*, 1997a). Foi demonstrado com essa mesma amostra que os níveis de leptina plasmática estavam aumentados nos gêmeos obesos independente de efeitos genéticos (RÖNNEMAA *et al.*, 1997b).

Apesar do significativo número de estudos que analisaram os efeitos da obesidade em fatores de risco, independentes da genética, a utilização do modelo de gêmeos MZ discordantes para o exercício ou aptidão cardiorrespiratória ainda é raro. Em um destes, a análise de 35 pares de gêmeos MZ (10 mulheres e 25 homens/40,5±6,8 anos), discordantes para prática de exercício físico vigoroso (mais ativo corria em média 63 km e o menos ativo, 7 km/semana) revelou que a comportamento mais ativo pode atenuar a influência genética sobre o IMC (WILLIAMS *et al.*, 2005). Em outro, 14 pares de gêmeos MZ discordantes e 10 concordantes para obesidade (\neq IMC de $5,2 \pm 1,8$ kg/m²) foram investigados (24 a 27 anos). Os obesos eram menos ativos e também menos aptos do que os não obesos ($50,6 \pm 6,5$ vs $54,2 \pm 6,4$ ml·kg⁻¹·MM⁻¹·min⁻¹). Os resultados demonstraram que a menor aptidão cardiorrespiratória apresentou associação significativa com defeitos na expressão de genes que codificam componentes da fosforilação oxidativa mitocondrial no tecido adiposo. É interessante destacar que defeitos na fosforilação mitocondrial são considerados como características patofisiológicas importantes no desenvolvimento da resistência à insulina (MUSTELIN *et al.*, 2008). Em outra pesquisa foi investigado os efeitos da atividade física e da aptidão cardiorrespiratória sobre a captação de AGL no músculo esquelético, miocárdio e no fígado, independente da genética em 9 pares de gêmeos MZ saudáveis com média de idade de $25,9 \pm 1,7$ anos. Os resultados revelaram que o co-gêmeo mais apto apresentou significativamente menor captação de AGL hepático (33%) do que seu irmão menos ativo (HANNUKAINEN *et al.*, 2007).

Também foi demonstrado no presente estudo uma menor concentração de glicose em jejum e um aumento na expressão do gene PPAR γ em células sanguíneas de co-gêmeos MZ com maior aptidão cardiorrespiratória (VO₂máx). Juntamente com as evidências de que o VO₂máx pode atenuar a influência genética sobre o IMC (indicador de obesidade) (WILLIAMS *et al.*, 2005), influenciar a expressão de genes da fosforilação oxidativa mitocondrial no tecido adiposo (MUSTELIN *et al.*, 2008) e reduzir a captação de AGL hepático (HANNUKAINEN *et al.*, 2007), sugere-se que uma maior aptidão

cardiorrespiratória seja capaz de exercer efeitos primários e independentes de fatores genéticos, em doenças e distúrbios metabólicos como o DM2. Já havia evidências de que anormalidades na taxa de utilização de glicose em crianças com parentes de primeiro grau com DM2 (predispostos ao DM2) pode ser melhorada com aumento da aptidão cardiorrespiratória (AHN *et al.*, 2004). No entanto, é importante destacar e justificar algumas limitações para este estudo.

A primeira, diz respeito ao uso de células sanguíneas ao invés de tecido adiposo ou muscular para identificar a expressão dos genes. É indiscutível que a expressão dos genes aos quais verificamos é determinada, na grande maioria dos estudos, diretamente a partir de biópsias nos tecidos muscular (LING *et al.*, 2004), adiposo (MAEDA *et al.*, 2001; MALLON *et al.*, 2008; ZAMBONI *et al.*, 2007; IGLESIAS *et al.*, 2006) e pancreático (HUSSAIN *et al.*, 2005). Deve-se aproveitar a oportunidade para destacar também que as amostras utilizadas nestes experimentos são pequenas e constituídas fundamentalmente por indivíduos adultos, seja em boas condições de saúde ou mesmo enfermos. Há evidências mostrando que as células sanguíneas podem se tornar um método substituto para se averiguar a expressão de genes associadas a diversas doenças (FINNSTRÖM *et al.*, 2001). A expressão de mRNA no sangue fornece condições de detectar infecções e outros tipos de doenças uma vez que existe uma ampla variação de genes expressos nas células sanguíneas (WHITNEY *et al.*, 2003; TANG *et al.*, 2001). Recentemente foram confirmadas a presença de mRNA circulante que sugere a possibilidade de ampliar estudos de expressão de genes de forma não invasiva (TSUI *et al.*, 2002). O mRNA em leucócitos sanguíneos já é utilizado como marcador clínico para se investigar o risco ou diagnóstico de câncer (NG *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2000), para avaliar a ocorrência de lesão cerebral, enfermidades neurológicas e outras formas de doenças (TANG *et al.*, 2003; SHARP *et al.*, 2006). Também, apesar da localização tecidual, demonstrou-se que uma variedade de genes que desempenham papel determinante na insuficiência cardíaca (excitação e contração) são expressos também nas células sanguíneas (SEILER *et al.*, 2004).

Considerando as dificuldades inerentes da faixa etária a qual este estudo investigou seria eticamente e operacionalmente difícil justificar a realização de biópsias em tecidos de crianças e adolescentes saudáveis. Esta questão determinou nossas ações no sentido de optarmos em verificar a expressão destes genes no sangue periférico e não nos tecidos. Embora seja um tema importante, poucos estudos procuraram comparar a expressão dos genes que participam da regulação da secreção e a sensibilidade a insulina, como o SUR1, KIR6.2, IL6, LEPTINA e PPAR γ , entre sangue periférico (leucócitos) e os tecidos adiposo e muscular. Em uma revisão foram reunidos estudos que abordavam a função e distribuição das isoformas do SUR (SHI *et al.*, 2005). Os pesquisadores demonstraram que o transcrito SUR-1 está presente no músculo esquelético e cardíaco, porém é mais abundante nos neurônios do cérebro e nas células β do pâncreas. O transcrito SUR-2A é

primariamente detectado no coração enquanto o transcrito SUR-2B, apesar de estar presente em todos os tecidos, exceto no músculo esquelético, é detectado principalmente no músculo liso, cardíaco e nervoso. No tecido adiposo, a isoforma SUR-2B foi detectada, mas a SUR-2A não. Por sua vez, a isoforma SUR1 não foi determinada no tecido adiposo em nenhum dos estudos consultados na revisão (SHI *et al.*, 2005). Em um trabalho de dissertação de Mestrado foi demonstrado diferença na expressão do SUR1 e do PPARg, mas não do KIR6.2, entre os leucócitos sanguíneos totais e o tecido adiposo. A expressão do SUR1 e do PPARg foi maior no tecido adiposo do que no sangue periférico em pacientes adultos diabéticos (MARQUES, 2008). Todavia, independente da diferença apresentada na expressão dos genes SUR1 e do PPARg circulantes e no tecido adiposo, a notícia da presença destes transcritos no sangue é no mínimo animadora.

Os dados na literatura não permitem concluir que a expressão de RNAm para os genes SUR1, KIR6.2, PPARg, LEPTINA e IL6 nos tecidos e sangue periférico são distintas, uma vez que o tema carece de maiores investigações. Contribuindo para melhorar os esclarecimentos a respeito da falta de estudos neste tema, identificamos a presença de mRNA dos genes SUR1, KIR6.2, IL6, LEPTINA e PPARg em leucócitos sanguíneos de jovens. Como observado outros estudos já evidenciaram a presença da transcrição de genes de diversos tecidos no sangue periférico. Talvez se deva pelo fato de que muitas doenças ou distúrbios refletem no sangue o que ocorre nos órgãos. Devido à fácil acessibilidade e ao menor impacto causado na colheita de sangue do que de uma biópsia, o perfil de expressão de genes no sangue periférico pode se tornar uma ferramenta promissora no diagnóstico molecular e na pesquisa clínica (BYE *et al.*, 2009).

Outra limitação que podemos abordar se refere ao estabelecimento de discordância a partir da aptidão cardiorrespiratória. Neste sentido, como a aptidão cardiorrespiratória apresenta efeitos genéticos significativos (50 a 67%) (MAES *et al.*, 1996; BOUCHARD *et al.*, 1999) nossos resultados precisam ser interpretados com cautela. A estimativa da influência genética para o VO_2 máx é fundamentada em estudos de agregação familiar e de gêmeos (BOUCHARD; MALINA & PÉRUSSE, 1997). Entre as suposições do estudo com gêmeos, uma admite que um fenótipo transporta maior efeito genético quando apresenta baixa variância entre gêmeos MZ. Em estudos clássicos com gêmeos MZ, a discordância é definida a partir de critérios bem fundamentados na literatura onde o fenótipo é uma condição geralmente adquirida (VAAG *et al.*, 1995). No entanto, mesmo em estudos no qual a variância permite estabelecer discordância entre gêmeos idênticos (p. ex: um dos gêmeos é diabético/obeso/hipertenso/sedentário e o outro não), o fator genético ou ambiental que pode ter influenciado de maneira mais significativa essa discordância ainda é questionado (GUO, 2001; HAWKES, 1997). Adicionalmente, observa-se que o comportamento da aptidão cardiorrespiratória é inconstante durante a vida e recebe influências de fatores dos mais diversos, como idade, sexo e nível

de atividade física. Importa ressaltar ainda que, além do aprimoramento promovido pela prática de exercícios físicos no $VO_2máx$, o período correspondente a infância e adolescência é marcado pelo crescimento e desenvolvimento progressivo de componentes do sistema cardiorrespiratório que determinam o $VO_2máx$ (pulmões, coração, músculos) (ROWLAND, 2008). Neste sentido, uma possível discordância (diferença) no $VO_2máx$ nesta faixa etária em indivíduos geneticamente idênticos seria mais provável devido a efeitos ambientais (atividade física e/ou exercício físico). Em outras palavras, os determinantes que distinguem a aptidão aeróbia de um gêmeo MZ em relação a seu irmão poderiam ser creditados ao ambiente, pois, neste modelo, as alterações observadas no $VO_2máx$ em função do próprio crescimento e desenvolvimento dos diversos sistemas estariam sob controle genético. Considerando o aumento no $VO_2máx$ provocado pelo crescimento, reduzir (perder) capacidade aeróbia nessa fase é menos provável do que aumentá-la. Dessa forma, desconsiderando os erros provenientes do avaliador, do avaliador e do equipamento de medida, é possível que o co-gêmeo do par discordante que demonstrou maior $VO_2máx$ neste estudo seja realmente mais ativo do que seu irmão correspondente.

Por fim, em relação às limitações do estudo, é interessante abordar a respeito do corte de $10 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ adotado para estabelecer discordância entre os gêmeos MZ neste estudo. Em um estudo longitudinal com gêmeos MZ e DZ discordantes para aptidão cardiorrespiratória ($VO_2pico \text{ } 26.4 \pm 4.9 \text{ vs } 32.5 \pm 5.5 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) os pesquisadores utilizaram valor de corte menor e enfatizaram que as diferenças dentro dos pares foram suficientes para identificar distúrbios metabólicos (LESKINEN *et al.*, 2009). Em outro, os pesquisadores adotaram 9% como valor de corte para determinar discordância (média de $18 \pm 10\%$) no $VO_2máx$ de gêmeos MZ. Os gêmeos mais e menos aptos apresentaram, respectivamente, valores de $VO_2máx$ de $50,9 \pm 5,1 \text{ vs } 43,4 \pm 6,7 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ (HANNUKAINEN *et al.*, 2007). Vale destacar que a diferença relativa entre o gêmeo com maior e menor $VO_2máx$ (discordantes) no presente estudo variou de 16,9 a 42,1%, com média de $30,6 \pm 9,5\%$ (dados não apresentados). Outra informação que vale destacar é que a média absoluta dessas diferenças foi de $13,5 \pm 3,7 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ para os pares discordantes (Tabela 7) e de aproximadamente $7,5 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ para o estudo de Hannukainen *et al.* (2007).

Considerando, portanto, as limitações do estudo e os resultados encontrados, é possível sugerir que o modelo de estudo controle de casos empregado (gêmeos MZ discordantes), sustenta a hipótese de que a aptidão cardiorrespiratória pode modular a sensibilidade à insulina na infância e adolescência mediante efeitos na expressão do PPAR γ independente de fatores genéticos. O gêmeo mais apto ainda apresentou significativamente menor concentração de glicose em jejum quando comparados ao seu irmão com menor $VO_2máx$. Outros resultados corroboram com a literatura que vem enfaticamente relatando uma forte associação direta entre menor aptidão cardiorrespiratória (todas as

idades) com adiposidade corporal (espessura de dobras, IMC), citocinas pró-inflamatórias, expressão de genes, metabolismo de glicose e de lipídios (BOOTH *et al.*, 1998).

Quanto à expressão dos outros genes associados à resistência à insulina (LEPTINA e IL6) o número de participantes certamente comprometeu a análise destes dados. No entanto, em relação aos genes relacionados à secreção de insulina (SUR1, KIR6.2) é importante ressaltar que os resultados encontrados são compatíveis com o bom funcionamento das células beta. Em outras palavras, a expressão aumentada de SUR1 e KIR6.2, representaria um acréscimo do número de canais, e isso resultaria em uma possibilidade maior na liberação de insulina. Esta condição poderia descrever um estado de resistência a insulina, pois o pâncreas na tentativa de reverter uma provável resistência à insulina iria liberar mais hormônio; isso indiretamente poderia estar relacionado à maior expressão dos canais.

7. CONCLUSÃO

Nós concluímos que quando os fatores genéticos são controlados, crianças e adolescentes com baixa aptidão cardiorrespiratória são suscetíveis a apresentar maior concentração de glicose em jejum e menor expressão do mRNA do gene PPAR γ . Contudo, independente do controle genético, as meninas apresentaram significativamente maior adiposidade corporal, índice HOMA (RI e β), concentração sanguínea de leptina, insulina em jejum e pós-carga (2 h) do que os meninos, que por sua vez, demonstraram maior VO₂máx. Analisando a amostra total, observamos correlação negativa entre o VO₂máx com indicadores de obesidade (IMC, CC e adiposidade), índice HOMA (RI e β) e concentração sanguínea de leptina, insulina em jejum e pós-carga (2 h) e, correlação positiva com a expressão do mRNA do gene PPAR γ . Considerando que variações indesejadas nas concentrações sanguíneas de leptina e insulina, indicadores de obesidade, índices HOMA e menor expressão do mRNA do gene PPAR γ são fatores de risco bem estabelecidos para resistência à insulina e diabetes tipo 2 este estudo evidencia que um aumento na aptidão cardiorrespiratória pode exercer efeitos determinantes no metabolismo de glicose de crianças e adolescentes. Porém, a importância da aptidão cardiorrespiratória observada nesta amostra não se restringe apenas a associações e relações com fatores de risco metabólicos, implica também em provocar mudanças moleculares e bioquímicas (genótipo e fenótipo) independentes de efeitos genéticos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHIMA, R. S.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Trends Endocrinol Metab**, New York, v. 11, n. 8, p. 327-32, 2000.
- AHN, C. W. et al. Insulin sensitivity in physically fit and unfit children of parents with Type 2 diabetes. **Diabet Med**, Chichester, v. 21, p. 59-63, 2004.
- AKHMETOV, II. et al. Association of regulatory genes polymorphisms with aerobic and anaerobic performance of athletes. **Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova**, v. 93, n. 8, p. 837-43, 2007.
- ALLEN, T.L.; FEBBRAIO, M.A. IL6 as a mediator of insulin resistance: fat or fiction? **Diabetologia**, New York, v. 53, n. 3, p. 399-402, 2010.
- AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE - ACSM. **Manual do ACSM para teste de esforço e prescrição de exercício**. 5. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2000.
- ANDREASEN, C. H. et al. Low physical activity accentuates the effect of the FTO rs9939609 polymorphism on body fat accumulation. **Diabetes**, New York, v. 57, n. 1, p. 95-101, 2008.
- ARSLANIAN, S. et al. Plasma leptin in children: relationship to puberty, gender, body composition, insulin sensitivity, and energy expenditure. **Metabolism**, Philadelphia, v. 47, n. 3, p. 309-12, 1998.
- ARSLANIAN, S. Type 2 diabetes in children: clinical aspects and risk factors. **Horm Res.**, n. 57 (Suppl 1), p. 19-28, 2002.
- ASHCROFT, F. M.; GRIBBLE, F. M. ATP-sensitive K⁺ channels and insulin secretion: their role in health and disease. **Diabetologia**, New York, v. 42, n. 8, p. 903-19, 1999.
- ASTRAND, P-O, RODAHL, K. **Tratado de fisiologia do exercício**. Rio de Janeiro, 2^a Ed, Guanabara Koogan, 1987.
- BAIER, L. J.; HANSON, R.L. Genetic Studies of the Etiology of Type 2 Diabetes in Pima Indians. Hunting for Pieces to a Complicated Puzzle. **Diabetes**, New York, v. 53, p. 1181-1186, 2004.
- BAIRD, J. et al. Testing the fetal origins hypothesis in twins: the Birmingham twin study. **Diabetologia**, New York, v. 44, n. 1, p. 33-9, 2001.
- BALKAU, B.; CHARLES, M. A. Comments on the provisional report from the WHO consultation: European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). **Diabetic Medicine**, Chichester, v. 16, p. 442-443, 1999.
- BARKER, D. J. The fetal origins of diseases of old age. **Eur J Clin Nutr.**, London, v. 46, Suppl 3: S3-9, 1992.
- BARNETT, A. H. et al. Diabetes in identical twins. A study of 200 pairs. **Diabetologia**, New York, v. 20, p. 2, p. 87-93, 1981.
- BARROSO, J. et al. Dominant negative mutations in human PPAR γ associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension [letter]. **Nature**, London, v. 402, p. 880-3, 1999.

- BECK-NIELSEN, H. et al. Metabolic and genetic influence on glucose metabolism in type 2 diabetic subjects - experiences from relatives and twin studies. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.**, London, v. 17, n. 3, p. 445-67, 2003.
- BECK-NIELSEN, H.; GROOP, L. Metabolic and genetic characterization of prediabetic states. Sequence of events leading to non-insulin-dependent diabetes mellitus. **J Clin Invest.**, New Haven, v. 94, p. 1714-21, 1994.
- BEIGUELMAN, B. **O estudo de gêmeos**. Ribeirão Preto: Editora SBG, 2008.
- BENATTI, F. B.; LANCHÁ JUNIOR, A. H. Leptina e exercício físico aeróbio: implicações da adiposidade corporal e insulina. **Rev Bras Med Esporte**, v. 13, n. 4, p. 263-9, 2007.
- BERGER, J.; MOLLER, D. E. The mechanisms of action of PPARs. **Annu Rev Med.**, Palo Alto, v.53, p. 409-435, 2002.
- BERTHOUZE, S. E. et al. Relationship between mean habitual daily energy expenditure and maximal oxygen uptake. **Med Sci Sports Exerc.**, Hagerstown, v. 27, n. 8, p. 1170-9, 1995.
- BISHOP-BAILEY, D. Peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system. **Br J Pharmacol**, London, v. 129, n. 5, p. 823-34, 2000.
- BLAIR, S. N. et al. Physical fitness and all-cause mortality. A prospective study of healthy men and women. **JAMA**, Chicago, v. 262, n. 17, p. 2395-401, 1989.
- BLÜHER, M. et al. Circulating adiponectin and expression of adiponectin receptors in human skeletal muscle: associations with metabolic parameters and insulin resistance and regulation by physical training. **J Clin Endocrinol Metab.**, Baltimore, v. 91, n. 6, p. 2310-6, 2006.
- BOOMSMA, D. et al. Classical twin studies and beyond. **Nat Rev Genet.**, London, v. 3, n. 11, p. 872-882, 2002.
- BOOTH, F. W. et al. Molecular and cellular adaptation of muscle in response to physical training. **Acta Physiol Scand.**, v. 162, n. 3, p. 343-50, 1998.
- BOOTH, F. W.; LEES, S. J. Fundamental questions about genes, inactivity, and chronic diseases. **Physiol Genomics**, v. 28, n. 2, p. 146-57, 2007.
- BOOTH, F.W.; NEUFER, P.D. Exercise Controls Gene Expression. **American Scientist**, New Haven, v. 93, n. 1, p. 28-35, 2005.
- BORG, G. A. V. Psychophysical bases of perceived exertion. **Med. Sci. Sports Exercise**, v. 14, n. 5, p. 377-381, 1982.
- BOUCHARD, C. et al. Familial aggregation of VO₂ max response to exercise training: results from the HERITAGE Family Study. **J Appl Physiol.**, Bethesda, v. 87, p. 1003-1008, 1999.
- BOUCHARD, C. et al. Using MZ twins in experimental research to test for the presence of a genotype-environment interaction effect. **Acta Genet Med Gemellol.**, Roma, v. 39, p. 85-9, 1990.
- BOUCHARD, C.; MALINA, R. M.; PÉRUSSE, L. **Genetics of fitness and physical performance**. Human Kinetics, Champaign, 1997.

BUFORD, T. W. et al. Resistance exercise-induced changes of inflammatory gene expression within human skeletal muscle. **Eur J Appl Physiol.**, v. 107, n. 4, p. 463-71, 2009.

BUNT, J. C. et al. Weight, adiposity, and physical activity as determinants of an insulin sensitivity index in pima Indian children. **Diabetes Care**, v. 26, n. 9, p. 2524-30, 2003.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **J Mol Endocrinol.**, v. 25, n. 2, p. 169-93, 2000.

BYE, A. et al. Transcriptional changes in blood after aerobic interval training in patients with the metabolic syndrome. **Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.**, v. 16, n. 1, p. 47-52, 2009.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). **Physical activity levels among children aged 9-13 years**: United States, 2002. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention; 2002.

CHEN, X. Q. et al. Telomerase RNA as a detection marker in the serum of breast cancer patients. **Clin Cancer Res.**, Denville, v. 6, p. 3823-26, 2000.

CHIASSON, J. L.; RABASA-LHORET, R. Prevention of type 2 diabetes: insulin resistance and beta-cell function. **Diabetes**, New York, v. 53, (Suppl 3), p. S34-S38, 2004.

CHRIST-ROBERTS, C. Y. et al. Exercise training increases glycogen synthase activity and GLUT4 expression but not insulin signaling in overweight nondiabetic and type 2 diabetic subjects. **Metabolism**, Philadelphia, v. 53, n. 9, p. 1233-42, 2004.

CLAUSELL, N.; TAVARES, A. M. V. O papel dos PPARs nas doenças cardiovasculares. Aspectos patogênicos na aterosclerose e insuficiência cardíaca e suas implicações clínicas. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul**, n. 03, p. 1-4, 2004.

CLAYTON, P. E.; TILLMANN, V. Advances in endocrinology. **Arch Dis Child.**, London, v. 78, n. 3, p. 278-84, 1998.

COKER, R. H. et al. Exercise-induced changes in insulin action and glycogen metabolism in elderly adults. **Med Sci Sports Exerc.**, Hagerstown, v. 38, n. 3, p. 433-8, 2006.

COUILLARD, C. et al. Hyperleptinemia is more closely associated with adipose cell hypertrophy than with adipose tissue hyperplasia. **Int J Obes Relat Metab Disord.**, Hampshire, v. 24, n. 6, p. 782-8, 2000.

CRUZ FERNANDES, S. C. T.; MAIA, J. A. R. (Org). **O código relacional na atividade física e aptidão associada à saúde. Efeitos genéticos e ambientais**. Porto-PT, Artes gráficas, 2006.

CURETON, K. J.; WARREN, G. L. Criterion-Referenced Standards for Youth Health-Related Fitness Tests: A Tutorial. **Res Q Exerc Sport**, Reston, v. 61, n. 1, p. 7-19, 1990.

De BACKER, G. et al. European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. Third joint task force of European and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice. **Eur J Cardiovasc Prev Rehabil**, London, v. 10, n. (Suppl 1), p. S1-S78, 2003.

de CARVALHO, M. H. et al. Cytokines, endothelial dysfunction, and insulin resistance. **Arq Bras Endocrinol Metabol.**, v. 50, n. 2, p. 304-12, 2006.

- DeFRONZO, R. A. The triumvirate: β -cell, muscle or liver. A collusion responsible for NIDDM. **Diabetes**, New York, v. 37, p. 667-87, 1988.
- DELA, F. et al. Physical training may enhance β -cell function in type 2 diabetes. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, Bethesda, v. 287, p. E1024-E1031, 2004.
- ERIKSSON, J. et al. Early metabolic defects in persons at increased risk for non-insulin-dependent diabetes mellitus. **N Engl J Med.**, v. 321, p. 337-43, 1989.
- FAGOT-CAMPAGNA, A. et al. Type 2 diabetes in children: Exemplifies the growing problem of chronic diseases. **Br J Nutr.**, London, v. 322, p. 377-78, 2001.
- FAJAS, L. et al. PPAR γ 3 mRNA: a distinct PPAR γ mRNA subtype transcribed from an independent promoter. **FEBS Lett.**, v. 438, n. 1-2, p. 55-60, 1998.
- FEBBRAIO, M. A.; PEDERSEN, B. K. Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. **FASEB J.**, v. 16, p. 1335-1347, 2002.
- FINNSTRÖM, N. et al. Independent patterns of cytochrome P450 gene expression in liver and blood in patients with suspected liver disease. **Eur J Clin Pharmacol.**, Berlin, v. 57, n. 5, p. 403-9, 2001.
- FONSECA-ALANIZ, M. H. et al. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. **J Pediatr.**, Rio de Janeiro, v. 83, n. (5 Suppl), p. S192-203, 2007.
- FRANCAUX, M. Toll-like receptor signalling induced by endurance exercise. **Appl Physiol Nutr Metab.**, v.34, n.3, p.454-8, 2009.
- FREEMAN, H.; COX, R. D. Type-2 diabetes: a cocktail of genetic discovery. **Hum Mol Genet.**, Oxford, v. 15, n. 2, p. R202-R209, 2006.
- FRENCH, S.; CASTIGLIONE, K. Recent advances in the physiology of eating. **Proc Nutr Soc.**, v. 61, n. 4, p. 489-96, 2002.
- FRIEDEWALD, W. T. et al. Estimation of the concentration of low density lipoproteins cholesterol in plasma without use of the ultracentrifuge. **Clin Chem.**, v. 18, p. 499-502, 1972.
- FRIEDMAN, J. M.; HALAAS, J. L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. **Nature**, London, v. 395, n. 6704, p. 763-70, 1998.
- FRITZ, T. et al. Low-intensity exercise increases skeletal muscle protein expression of PPAR δ and UCP3 in type 2 diabetic patients. **Diabetes Metab Res Rev.**, v. 22, n. 6, p. 492-8, 2006.
- FROTA-PESSOA, O. et al. **Genética Humana**. Rio de Janeiro: Francisco Alves, 300p., 1976.
- GABAY, C. Interleukin-6 and chronic inflammation. **Arthritis Res Ther.**, v. 8 (Suppl 2), p. 1-6, 2006.
- GELMAN, L. et al. Molecular basis of selective PPAR γ modulation for the treatment of type 2 diabetes. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v. 1771, n. 8, p. 1094-107, 2007.
- GILL, J. M. Physical activity, cardiorespiratory fitness and insulin resistance: a short update. **Curr Opin Lipidol.**, London, v. 18, n. 1, p. 47-52, 2007.

- GOLDSTEIN, B. J. Insulin resistance as the core defect in type 2 diabetes mellitus. **Am J Cardiol.**, New York, v. 90, (suppl), p. 3G-10G, 2002.
- GOMEZ-MERINO, D. et al. Decrease in serum leptin after prolonged physical activity in men. **Med Sci Sports Exerc.**, Hagerstown, v. 34, p. 1594-99, 2002.
- GOODYEAR, L. J.; KAHN, B. B. Exercise, glucose transport, and insulin sensitivity. **Annu Rev Med.**, v. 49, p. 235-61, 1998.
- GORDON, C. C. et al. Stature, recumbent length, and weight. In: LOHMAN, T. G; ROCHE, A. F; MARTORELL, R. **Anthropometric standardization reference manual**. Champaign: Human kinetics, p.39-54, 1991.
- GORDON-LARSEN, P. et al. Longitudinal physical activity and sedentary behavior trends: adolescence to adulthood. **Am J Prev Med.**, v. 27, p. 277-83, 2004.
- GREENFIELD, J. R. et al. Physical activity reduces genetic susceptibility to increased central systolic pressure augmentation: a study of female twins. **J Am Coll Cardiol.**, New York, v. 42, n. 2, p. 264-70, 2003.
- GUEDES, D. P.; GUEDES J. E. R. P. **Crescimento, composição corporal e desempenho motor de crianças e adolescentes**. São Paulo: Baliero, 1997.
- GUERRE-MILLO, M. Adiponectin: An update. **Diabetes Metab.**, Paris, v. 34, p. 12-18, 2008.
- GUERRE-MILLO, M. Adipose tissue and adipokines: for better or worse. **Diabetes Metab.**, Paris, v. 30, n. 1, p. 13-9, 2004.
- GUO, S-W. Does higher concordance in monozygotic twins than in dizygotic twins suggest a genetic component? **Hum Hered.**, Basel, v. 51, n. 3, p. 121-32, 2001.
- HAFFNER, S. M. et al. Leptin levels are increased in non-diabetic subjects with increased insulin and proinsulin concentrations. **Diabetologia**, New York, v. 39 (Suppl. 1), p. A14, 1996.
- HANNUKAINEN, J.C. et al. Increased physical activity decreases hepatic free fatty acid uptake: a study in human monozygotic twins. **J Physiol.**, London, v. 578 (Pt 1), p. 347-58, 2007.
- HATHOUT, E. H. et al. Changes in plasma leptin during the treatment of diabetic ketoacidosis. **J Clin Endocrinol Metab.**, Baltimore, v. 84, n. 12, p. 4545-8, 1999.
- HAUTALA, A. J. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-delta polymorphisms are associated with physical performance and plasma lipids: the HERITAGE Family Study. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, Bethesda, v. 292, n. 5, p. H2498-505, 2007.
- HAVEL, P. J. Mechanisms regulating leptin production: implications for control of energy balance. **Am J Clin Nutr.**, Bethesda, v.70, n. 3, p. 305-6, 1999.
- HAWKES, C. H. Twin studies in medicine--what do they tell us? **Q J Med.**, Oxford, v. 90, n. 5, p. 311-21, 1997.
- HAWLEY, J. A.; LESSARD, S. J. Exercise training-induced improvements in insulin action. **Acta Physiol.**, Oxford, v. 192, n. 1, p. 127-35, 2008.

HENRIKSEN, E. J. Invited review: Effects of acute exercise and exercise training on insulin resistance. **J Appl Physiol.**, Bethesda, v. 93, p. 788-96, 2002.

HERMSDORFF, H. H.; MONTEIRO, J. B. Visceral, subcutaneous or intramuscular fat: where is the problem? **Arq Bras Endocrinol Metabol.**, São Paulo, v. 48, n. 6, p. 803-11, 2004.

HILL, A. V, JEFFREYS, A. J. Use of minisatellite DNA probes for determination of twin zygoty at birth. **Lancet**, Minneapolis, v. 2, n. 8469-70, p. 1394-5, 1985.

HILL, J. O.; PETERS, J. C. Environmental contributions to the obesity epidemic. **Science**, Washington, v. 29, n. 280 (5368), 1371-4, 1998.

HISCOCK, N. et al. Skeletal myocytes are a source of interleukin-6 mRNA expression and protein release during contraction: evidence of fiber type specificity. **FASEB J.**, v. 18, p. 992-994, 2004.

HOKANSON, J. E. et al. Effects of the hepatic lipase gene and physical activity on coronary heart disease risk. **Am J Epidemiol.**, Baltimore, v. 158, n. 9, p. 836-43, 2003.

HOUMARD, J. A. et al. Elevated skeletal muscle glucose transporter levels in exercise-trained middle-aged men. **Am J Physiol.**, Baltimore, v. 261, p. E437-43, 1991.

HUSSAIN, K. et al. Hyperinsulinemic hypoglycemia in Beckwith-Wiedemann syndrome due to defects in the function of pancreatic beta-cell adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. **J Clin Endocrinol Metab.**, Baltimore, v. 90, n. 7, p. 4376-82, 2005.

IGLESIAS, M. J. et al. Gender differences in adiponectin and leptin expression in epicardial and subcutaneous adipose tissue. Findings in patients undergoing cardiac surgery. **Rev Esp Cardiol.**, Madrid, v. 59, n. 12, p. 1252-60, 2006.

IMPERATORE, G. et al. Physical activity, cardiovascular fitness, and insulin sensitivity among U.S. adolescents: the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2002. **Diabetes Care**, Alexandria, v. 29, n. 7, p.1567-72, 2006.

ISSEMAN, I.; GREEN, S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. **Nature**, London, v. 347, p. 645-9, 1990.

JIANG, C. et al. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. **Nature**, London, v. 391, n. (6662), p. 82-6, 1998.

KANG, H. S. et al. Physical training improves insulin resistance syndrome markers in obese adolescents. **Med Sci Sports Exerc.**, Hagerstown, v. 34, n. 12, p. 1920-1927, 2002.

KANUNFRE, C. C. PPAR - receptor ativado por proliferadores de peroxissoma. Um receptor nuclear para ácidos graxos. In: CURTI, R. et al. **Entendendo a gordura. Os ácidos graxos.** São Paulo: Editora Manole, p. 228-248, 2002.

KASA-VUBU, J. Z. et al. Cardiovascular fitness and exercise as determinants of insulin resistance in postpubertal adolescent females. **J Clin Endocrinol Metab.**, Baltimore, v. 90, n. 2, p. 849-54, 2005.

KELLER, C. et al. IL6 gene expression in human adipose tissue in response to exercise--effect of carbohydrate ingestion. **J Physiol.**, London, v. 550, (Pt 3), p. 927-31, 2003.

KETTANEH, A. et al. High plasma leptin predicts an increase in subcutaneous adiposity in children and adults. **Eur J Clin Nutr.**, London, v. 61, n. 6, p. 719-26, 2007.

KILPELÄINEN, T. O. et al. Physical activity modifies the effect of SNPs in the SLC2A2 (GLUT2) and ABCC8 (SUR1) genes on the risk of developing type 2 diabetes. **Physiol Genomics**, Bethesda, v. 31, n. 2, p. 264-72, 2007.

KILPELÄINEN, T. O. et al. SNPs in PPARG associate with type 2 diabetes and interact with physical activity. **Med Sci Sports Exerc.**, Hagerstown, v. 40, n. 1, p. 25-33, 2008.

KIMM, S. Y. et al. Decline in physical activity in black girls and white girls during adolescence. **N Engl J Med.**, Waltham, v. 347, p. 709-15, 2002.

KIMM, S. Y. et al. Relation between the changes in physical activity and bodymass index during adolescence: a multicentre longitudinal study. **Lancet**, Minneapolis, v. 366, p. 301-7, 2005.

KING, M. C. et al. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. **Science**, Washington, v. 302, n. 5645, p. 643-6, 2003.

KLESGES, R. C. et al. A longitudinal analysis of the impact of dietary intake and physical activity on weight change in adults. **Am J Clin Nutr.**, Bethesda, v. 55, n. 4, p. 818-22, 1992.

KNOWLER, W. C. et al. Diabetes Prevention Program Research Group. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. **N Engl J Med.**, Waltham, v. 346, p. 393-403, 2002.

KOHL, H. W. et al. Cardiorespiratory fitness, glycemic status, and mortality risk in men. **Diabetes Care**, Alexandria, v. 15, n. 2, p. 184-92, 1992.

KRAUS, W. E. et al. Effects of the amount and intensity of exercise on plasma lipoproteins. **N Engl J Med.**, Waltham, v. 347, n. 19, p. 1483-92, 2002.

LAAKSONEN, D. E. et al. Low levels of leisure-time physical activity and cardiorespiratory fitness predict development of the metabolic syndrome. **Diabetes Care**, Alexandria, v. 25, p. 1612-18, 2002.

LAKKA, T. A. et al. Leptin and leptin receptor gene polymorphisms and changes in glucose homeostasis in response to regular exercise in nondiabetic individuals: the HERITAGE family study. **Diabetes**, New York, v. 53, n. 6, p. 1603-8, 2004.

LAMBERT, C. P. et al. Exercise but not diet-induced weight loss decreases skeletal muscle inflammatory gene expression in frail obese elderly persons. **J Appl Physiol.**, Bethesda, v. 105, n. 2, p. 473-8, 2008.

LATINI, G. et al. Influence of environment on insulin sensitivity. **Environ Int.**, New York, v.35, n.6, p.987-93, 2009.

LEHTOVRTA, M. et al. Heritability of model-derived parameters of beta cell secretion during intravenous and oral glucose tolerance tests: a study of twins. **Diabetologia**, New York, v. 48, n. 8, p. 1604-13, 2005.

LEHTOVRTA, M. et al. Insulin sensitivity and insulin secretion in monozygotic and dizygotic twins. **Diabetologia**, New York, v. 43, p. 285-93, 2000.

- LESKINEN, T. et al. Effects of 32-year leisure time physical activity discordance in twin pairs on health (TWINACTIVE study): aims, design and results for physical fitness. **Twin Res Hum Genet.**, Austrália, v. 12, n. 1, p. 108-17, 2009.
- LING, C. et al. Multiple environmental and genetic factors influence skeletal muscle PGC-1alpha and PGC-1beta gene expression in twins. **J Clin Invest.**, New Haven, v. 114, n. 10, p. 1518-26, 2004.
- LOFTIN, M. et. Comparison and Relationship of VO₂peak and Physical Activity Patterns in Elementary and High School Females. **Pediatric Exerc Sci.**, Champaign, v. 10, n. 2, p. 153-63, 1998.
- LOOS, R. J. et al. Twin studies and estimates of heritability. **Lancet**, Minneapolis, v. 357, n. 9266, p. 1445, 2001.
- LUQUET, S. et al. Roles of PPAR delta in lipid absorption and metabolism: a new target for the treatment of type 2 diabetes. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v. 1740, v. 2, p. 313-7, 2005.
- LYNCH, J. et al. Moderately intense physical activities and high levels of cardiorespiratory fitness reduce the risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus in middle-aged men. **Arch Intern Med.**, v. 156, n. 12, p. 1307-14, 1996.
- LYON, C. J. et al. Minireview: adiposity, inflammation, and atherogenesis. **Endocrinology**, Chevy Chase, v. 144, n. 6, p. 2195-200, 2003.
- MacGREGOR, A. J. et al. Twins. Novel uses to study complex traits and genetic diseases. **Trends Genet.**, Amsterdam, v. 16, n. 3, p. 131-4, 2000.
- MAEDA N, et al. PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. **Diabetes**, New York, v. 50, n. 9, p. 2094-9, 2001.
- MAES, H. H. et al. Inheritance of physical fitness in 10-yr-old twins and their parents. **Med Sci Sports Exerc.**, Hagerstown, v. 28, p. 1479-91, 1996.
- MALLON, P. W. et al. Effect of rosiglitazone on peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene expression in human adipose tissue is limited by antiretroviral drug-induced mitochondrial dysfunction. **J Infect Dis.**, Chicago, v. 198, n. 12, p. 1794-803, 2008.
- MANSON, J. E. et al. Walking compared with vigorous exercise for the prevention of cardiovascular events in women. **N Engl J Med.**, Waltham, v. 347, p. 716-25, 2002.
- MARQUES, M. F. S. F. **Caracterização de genes e proteínas plasmáticas relacionadas ao diabetes melito do tipo 2 em indivíduos tratados com pioglitazona.** 2008. 126 f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo - USP, São Paulo, 2008. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9136/tde-16092008-151426/>. Acesso maio de 2009.
- MARTIN, G. M. Epigenetic drift in aging identical twins. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 102, n. 30, p. 10413-4, 2005.
- MARTIN, N. et al. A twin-pronged attack on complex traits. **Nat Genet.**, New York, v. 17, p. 387-92, 1997.

- MATTHEWS, D. R. H. J. et al. Homeostasis model assessment, insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentration in man. **Diabetologia**, New York, v. 28, p. 412-19, 1985.
- McARDLE, W. D. et al. **Fisiologia do exercício. Energia, nutrição e desempenho humano**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 5ª edição, 2003.
- MEIER, U.; GRESSNER, A. M. Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. **Clin Chem.**, Baltimore, v. 50, n. 9, p. 1511-25, 2004.
- MEIRHAEGHE, A. et al. A genetic polymorphism of the peroxisome proliferators-activated receptor γ gene influences plasma leptin levels in obese humans. **Hum Mol Genet.**, Oxford, v. 7, n. 3, p. 435-40, 1998.
- MEIRHAEGHE, A. et al. Impact of the peroxisome proliferator activated receptor γ 2 Pro12Ala polymorphism on adiposity, lipids and non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Int J Obes Relat Metab Disord.**, Hampshire, v. 24, n. 2, p. 195-9, 2000.
- MIKINES, J. K. et al. Effects of training on the dose-response relationship for insulin action in men. **J Appl Physiol.**, Bethesda, v. 66, p. 695-703, 1989.
- MOHAMED-ALI, V. et al. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. **Int J Obes Relat Metab Disord.**, Hampshire, v. 22, n. 12, p. 1145-58, 1998.
- MOKDAD, A. H. et al. Diabetes trends in the U.S.: 1990-1998. **Diabetes Care**, Alexandria, v. 23, p. 1278-1283, 2000.
- MOLDOVEANU, A. I. et al. Exercise elevates plasma levels but not gene expression of IL-1 β , IL-6, and TNF- α in blood mononuclear cells. **J Appl Physiol.**, Bethesda, v.89, n. 4, p. 1499-504, 2000.
- MOONEY, R. A. Counterpoint: Interleukin-6 does not have a beneficial role in insulin sensitivity and glucose homeostasis. **J Appl Physiol.**, Bethesda, v. 102, n. 2, p. 816-8, 2007.
- MOOTHA, V. K, et al. PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. **Nat Genet.**, New York, v. 34, n. 3, p. 267-73, 2003.
- MUOIO, D. M. et al. Fatty acid homeostasis and induction of lipid regulatory genes in skeletal muscles of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α knock-out mice. Evidence for compensatory regulation by PPAR δ . **J Biol Chem.**, Baltimore, v. 277, n. 29, p. 26089-97, 2002.
- MUSTELIN, L. et al. Acquired obesity and poor physical fitness impair expression of genes of mitochondrial oxidative phosphorylation in monozygotic twins discordant for obesity. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, Bethesda, v. 295, n. 1, p. E148-54, 2008.
- NARKIEWICZ, K. et al. Genetic influences on insulinemia in normotensive twins. **Am J Hypertens.**, New York, n. 10, p. 467-70, 1997.
- NATIONAL CENTER FOR HEALTH STATISTICS - NCHS. **The NHANES Cardiovascular Fitness Procedure Manual**. Hyattsville, MD: National Center for Health Statistics, 2004. Disponível: <http://www.cdc.gov/nchs/data/nhanes/cv.pdf>. Acesso maio de 2009.

NG, E. K. et al. Presence of filterable and nonfilterable RNAm in the plasma of cancer patients and healthy individuals. **Clin Chem.**, Baltimore, v. 48, p. 1212-17, 2002.

NYHOLM, B. et al. Evidence of increased visceral obesity and reduced physical fitness in healthy insulin-resistant first-degree relatives of type 2 diabetic patients. **Eur J Endocrinol.**, Bristol, v. 150, n. 2, p. 207-14, 2004.

NYHOLM, B. et al. Insulin resistance in relatives of NIDDM patients: the role of physical fitness and muscle metabolism. **Diabetologia**, New York, v. 39, p. 813-822, 1996.

O'GORMAN, D. J. et al. Exercise training increases insulin-stimulated glucose disposal and GLUT4 (SLC2A4) protein content in patients with type 2 diabetes. **Diabetologia**, New York, v. 49, n. 12, p. 2983-92, 2006.

OPPERT, J. M. et al. Plasma glucose, insulin, and glucagon before and after long-term overfeeding in identical twins. **Metabolism**, Philadelphia, v. 44, n. 1, p. 96-105, 1995.

PARSONS, T. J. et al. Childhood predictors of adult obesity: a systematic review. **Int J Obes Relat Metab Disord.**, Hampshire, v. 23 (Suppl 8), p. S1-107, 1999.

PATTI, M. E. et al. Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 100, n. 14, p. 8466-71, 2003.

PEDERSEN, B. K.; FEBBRAIO, M. A. Point: Interleukin-6 does have a beneficial role in insulin sensitivity and glucose homeostasis. **J Appl Physiol.**, Bethesda, v. 102, n. 2, p. 814-6, 2007.

PEELMAN, F. et al. Leptin: linking adipocyte metabolism with cardiovascular and autoimmune diseases. **Prog Lipid Res.**, Oxford, v. 43, n. 4, p. 283-301, 2004.

PETERSEN, A. M.; PEDERSEN, B. K. The role of IL-6 in mediating the anti-inflammatory effects of exercise. **J Physiol Pharmacol.**, Krakow, v. 57 (Suppl 10), p. 43-51, 2006.

PHILLIPS, D. I. Twin studies in medical research: can they tell us whether diseases are genetically determined? **Lancet**, Minneapolis, v. 341, n. 8851, p. 1008-9, 1993.

PICKUP, J. C.; CROOK, M. A. Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? **Diabetologia**, New York, v. 41, p. 1241-8, 1998.

PIETILÄINEN, K. H. et al. Acquired obesity increases CD68 and tumor necrosis factor-alpha and decreases adiponectin gene expression in adipose tissue: a study in monozygotic twins. **J Clin Endocrinol Metab.**, Baltimore, v. 91, n. 7, p. 2776-81, 2006a.

PIETILÄINEN, K. H. et al. Acquired obesity is associated with changes in the serum lipidomic profile independent of genetic effects--a monozygotic twin study. **PLoS One**, New York, v. 2, n. 2, p. e218, 2007.

PIETILÄINEN, K. H. et al. Acquired obesity is associated with increased liver fat, intra-abdominal fat, and insulin resistance in young adult monozygotic twins. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, Bethesda, v. 288, n. 4, p. E768-74, 2005.

PIETILÄINEN, K. H. et al. Effects of acquired obesity on endothelial function in monozygotic twins. **Obesity** (Silver Spring), v. 14, n. 5, p. 826-37, 2006b.

PIETILÄINEN, K. H. et al. Global transcript profiles of fat in monozygotic twins discordant for BMI: pathways behind acquired obesity. **PLoS Med.**, New York, v. 5, n. 3, p. e51, 2008.

PINHAS-HAMIEL, O. L. et al. Increased incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus among adolescents. **J Pediatr.**, Saint Louis, v. 128, p. 608-615, 1996.

POLAK, J. et al. Effect of aerobic training on plasma levels and subcutaneous abdominal adipose tissue gene expression of adiponectin, leptin, interleukin 6, and tumor necrosis factor alpha in obese women. **Metabolism**, Philadelphia, v. 55, n. 10, p. 1375-81, 2006.

PUNTHAKEE, Z. et al. Adiponectin, adiposity, and insulin resistance in children and adolescents. **J Clin Endocrinol Metab.**, Baltimore, v.91, n. 6, p. 2119-25, 2006.

QI, L. et al. Genes, environment, and interactions in prevention of type 2 diabetes: a focus on physical activity and lifestyle changes. **Curr Mol Med.**, v. 8, n. 6, p. 519-32, 2008.

QUEIROGA, M. R. **Testes e medidas para avaliação da aptidão física relacionada à saúde em adultos**. Rio Janeiro: Guanabara Koogan, 202 p., 2005.

RAJALA, M. W.; SCHERER, P. E. Minireview: the adipocyte-at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. **Endocrinology**, Chevy Chase, v. 144, n. 9, p. 3765-73, 2003.

RAMACHANDRAN, A. et al. Type 2 diabetes in Asian-Indian urban children. **Diabetes Care**, Alexandria, v. 26, n. 4, p. 1022-5, 2003.

RAMOS-ARROYO, M. A. et al. Twin study: relationship between birth weight, zygosity, placentation, and pathologic placental changes. **Acta Genet Med Gemellol.**, Roma, v. 37, n. 3-4, p. 229-238, 1988.

RANDLE, P. J. et al. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. **Lancet**, Minneapolis, v. 1, n. 7285, p. 785-9, 1963.

RANKINEN, T. et al. Effect of endothelin 1 genotype on blood pressure is dependent on physical activity or fitness levels. **Hypertension**, Dallas, v. 50, p. 1120-25, 2007.

REAVEN, G. M. Insulin secretion and insulin action in non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Diabetes Care**, Alexandria, v. 7, (Suppl.1), p. 17-24, 1984.

REAVEN, G. M. Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes**, New York, v. 37, n. 12, p. 1595-1607, 1988.

REIS, A. F.; VELHO, G. Patologia molecular do receptor de sulfoniluréia (SUR1). **Arq Bras Endocrinol Metab.**, São Paulo, v. 44, n. 5, p. 382-9, 2004.

REIS, A. F.; VELHO, G. Sulfonylurea receptor-1 (SUR1): Genetic and metabolic evidences for a role in the susceptibility to type 2 diabetes mellitus. **Diabetes Metab.**, Paris, v. 28, p. 14-19, 2002.

REUSCH, J. E. B. Current concepts in insulin resistance, type 2 diabetes mellitus, and the metabolic syndrome. **Am J Cardiol.**, New York, v. 90, (suppl), p. 19G-26G, 2002.

- RIDDOCH, C. J. et al. Physical activity levels and patterns of 9- and 15-yr-old European children. **Med Sci Sports Exerc.**, Hagerstown, v. 36, n. 1, p. 86-92, 2004.
- RODRIGUES, A. N. et al. Maximum oxygen uptake in adolescents as measured by cardiopulmonary exercise testing: a classification proposal. **J Pediatr.**, Rio Janeiro, v. 82, n.6, p. 426-30, 2006.
- RÖNNEMAA, T. et al. Glucose metabolism in identical twins discordant for obesity. The critical role of visceral fat. **J Clin Endocrinol Metab.**, Baltimore, v. 82, n. 2, p. 383-7, 1997a.
- RÖNNEMAA, T. et al. Relation between plasma leptin levels and measures of body fat in identical twins discordant for obesity. **Ann Intern Med.**, Philadelphia, v. 126, n. 1, p. 26-31, 1997b.
- ROSEMBLOOM, A. L. et al. Emerging epidemic of type 2 diabetes in youth. **Diabetes Care**, Alexandria, v. 22, n. 2, p. 345-54, 1999.
- ROSS, C. N. Twins and the fetal origins hypothesis. Fetal insult may cause vascular changes and growth retardation. **Br J Nutr.**, London, v. 319, n. 7208, p. 517-8, 1999.
- ROWLAND, T. W. **Fisiologia do exercício na criança**. São Paulo: Editora Manole, 2008.
- SADAGURSKI, M. et al. Human IL6 enhances leptin action in mice. **Diabetologia**, New York, v. 53, n. 3, p. 525-35, 2010.
- SALDANHA, P. H. **Gêmeos: hereditariedade versus ambiência**. São Paulo: UCITEC - USP: 1980.
- SAMARAS, K. et al. Genes versus environment: the relationship between dietary fat and total and central abdominal fat. **Diabetes Care**, Alexandria, v. 21, p. 2069-76, 1998.
- SAMARAS, K. et al. Genetic and environmental influences on total-body and central abdominal fat: the effect of physical activity in female twins. **Ann Intern Med.**, Philadelphia, v. 130, p. 873-82, 1999.
- SCHMITZ, K. H. et al. Association of physical activity with insulin sensitivity in children. **Int J Obes Relat Metab Disord.**, Hampshire, v. 26, n. 10, p. 1310-6, 2002.
- SEILER, P. U. et al. Real-time RT-PCR for gene expression profiling in blood of heart failure patients-a pilot study: gene expression in blood of heart failure patients. **Basic Res Cardiol.**, Darmstadt, v. 99, n. 3, p. 230-8, 2004.
- SEUFERT, J. et al. Leptin suppression of insulin secretion and gene expression in human pancreatic islets: implications for the development of adipogenic diabetes mellitus. **J Clin Endocrinol Metab.**, Baltimore, v. 84, n. 2, p. 670-6, 1999.
- SHARP, F. R. et al. The future of genomic profiling of neurological diseases using blood. **Arch Neurol.**, Chicago, v. 63, n. 11, p. 1529-36, 2006.
- SHI, N. Q. et al. Function and distribution of the SUR isoforms and splice variants. **J Mol Cell Cardiol.**, London, v. 39, n. 1, p. 51-60, 2005.
- SHIMABUKURO, M. et al. Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 94, n. 9, p. 4637-41, 1997.
- SHULMAN, G. I. Cellular mechanisms of insulin resistance. **J Clin Invest.**, New Haven, v. 106, p. 171-6, 2000.

SINAIKO, A. R. et al. Insulin resistance syndrome in childhood: associations of the euglycemic insulin clamp and fasting insulin with fatness and other risk factors. **J Pediatr.**, New York, v. 139, n. 5, p. 700-7, 2001.

SIVAPRASADARAO, A. et al. Trafficking of ATP-sensitive potassium channels in health and disease. **Biochem Soc Trans.**, London, v. 35, (Pt 5), p. 1055-9, 2007.

SMITH, A. J. et al. Molecular cell biology of KATP channels: implications for neonatal diabetes. **Expert Rev Mol Med.**, Cambridge, v. 9, n. 21, p. 1-17, 2007.

SNIEDER, H. et al. The age dependency of gene expression for plasma lipids, lipoproteins, and apolipoproteins. **Am J Hum Genet.**, Chicago, v. 60, n. 3, p. 638-50, 1997.

STEFAN, N. et al. Genetic variations in PPARD and PPARGC1A determine mitochondrial function and change in aerobic physical fitness and insulin sensitivity during lifestyle intervention. **J Clin Endocrinol Metab.**, Baltimore, v. 92, n. 5, p. 1827-33, 2007.

STEINBERGER, J. et al. Relation of leptin to insulin resistance syndrome in children. **Obes Res.**, Baton Rouge, v. 11, n. 9, p. 1124-30, 2003.

ST-PIERRE, J. et al. Bioenergetic analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivators 1alpha and 1beta (PGC-1alpha and PGC-1beta) in muscle cells. **J Biol Chem.**, Bethesda, v. 278, n. 29, p. 26597-603, 2003.

TANG, Y. et al. Blood genomic expression profile for neuronal injury. **J Cereb Blood Flow Metab.**, New York, v. 23, n. 3, p. 310-9, 2003.

TANG, Y. et al. Blood genomic responses differ after stroke, seizures, hypoglycemia, and hypoxia: blood genomic fingerprints of disease. **Ann Neurol.**, Boston, v. 50, p. 699-707, 2001.

TAVARES, V. et al. Association between Pro12Ala polymorphism of the PPAR-gamma2 gene and insulin sensitivity in Brazilian patients with type-2 diabetes mellitus. **Diabetes Obes Metab.**, Oxford, v. 7, n. 5, p. 605-11, 2005.

TAVARES, V.; HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma): molecular study in glucose homeostasis, lipid metabolism and therapeutic approach. **Arq Bras Endocrinol Metabol.**, São Paulo, v. 51, n. 4, p. 526-33, 2007.

TERAN-GARCIA, M. et al. Endurance training-induced changes in insulin sensitivity and gene expression. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, Bethesda, v. 288, p. E1168-E1178, 2005.

THOMAS, P. et al. Mutation of the pancreatic islet inward rectifier kir6.2 also leads to familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. **Hum Mol Genet.**, Oxford, v. 5, p. 1809-12, 1996.

TONTONOZ, P. et al. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. **Cell**, Cambridge, v. 79, n. 7, p. 1147-56, 1994.

TRAYHURN, P.; BEATTIE, J. H. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. **Proc Nutr Soc.**, London, v. 60, n. 3, p. 329-39, 2001.

TSUI, N. et al. Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma. **Clin Chem.**, Baltimore, v. 48, p. 1647-53, 2002.

TUOMILEHTO, J. et al. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. **N Engl J Med.**, Waltham, v. 344, n. 18, p. 1343-50, 2001.

VAAG, A. et al. Insulin secretion, insulin action, and hepatic glucose production in identical twins discordant for non-insulin-dependent diabetes mellitus. **J Clin Invest.**, New Haven, v. 95, n. 2, p. 690-8, 1995.

van HALL, G. et al. Interleukin-6 stimulates lipolysis and fat oxidation in humans. **J Clin Endocrinol Metab.**, Baltimore, v. 88, n. 7, p. 3005-10, 2003.

VOZAROVA, B. et al. Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion. **Obes Res.**, Baton Rouge, v. 9, n. 7, p. 414-7, 2001.

WANG, Y. X. et al. Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. **Cell**, Cambridge, v. 113, p. 159-70, 2003.

WEI, M. et al. The association between cardiorespiratory fitness and impaired fasting glucose and type 2 diabetes mellitus in men. **Ann Intern Med.**, Philadelphia, v. 130, n. 2, p. 89-96, 1999.

WEYER, C. et al. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. **J Clin Endocrinol Metab.**, Baltimore, v. 86, p. 1930-35, 2001.

WHITNEY, A. R. et al. Individuality and variation in gene expression patterns in human blood. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 100, p. 1896-1901, 2003.

WILD, S. et al. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, Alexandria, v. 27, n.5, p. 1047-53, 2004.

WILLIAMS, P. T. et al. Behavioral versus genetic correlates of lipoproteins and adiposity in identical twins discordant for exercise. **Circulation**, Baltimore, v. 112, n. 3, p. 350-6, 2005.

WILLIAMS, S.; POULTON, R. Twins and maternal smoking: ordeals for the fetal origins hypothesis? A cohort study. **Br J Nutr.**, London, v. 318, n. 7188, p. 897-900, 1999.

WOJTASZEWSKI, J. F. et al. Insulin signalling: effects of prior exercise. **Acta Physiol Scand.**, Oxford, v. 178, p. 321-328, 2003.

YUDKIN, J. S. Adipose tissue, insulin action and vascular disease: inflammatory signals. **Int J Obes Relat Metab Disord.**, Londres, v. 27 (Suppl 3), p. S25-8, 2003.

ZACHAROVA, J. et al. Leptin receptor gene variation predicts weight change in subjects with impaired glucose tolerance. **Obes Res.**, Baton Rouge, v. 13, n. 3, p. 501-6, 2005.

ZAMBONI, M. et al. Adiponectin gene expression and adipocyte NF-kappaB transcriptional activity in elderly overweight and obese women: inter-relationships with fat distribution, hs-CRP, leptin and insulin resistance. **Int J Obes.**, Londres, v. 31, n. 7, p. 1104-9, 2007.

ANEXO. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa**unesp** UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Rio ClaroCOMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
CEP-IB-UNESP- RIO CLARO**Protocolo nº: 5093 (20-08-09)****Data Registro CEP: 21-08-2009**

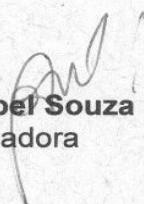
Rio Claro, 1º de setembro de 2009.

Ofício CEP 110/2009

Prezado Senhor,

Aprovo "ad referendum" do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Rio Claro (CEP-IB-UNESP), o projeto de pesquisa intitulado "*Interações entre atividade física e aptidão física na herdabilidade de marcadores moleculares e bioquímicos relacionados à sensibilidade à insulina: estudo em gêmeos*", sob sua responsabilidade –colaboradores: Mário Hiroyuki Hirata; Marcos Roberto Queiroga e Ricardo Augusto Barbieri, protocolo 5093 de 20.08.2009, data de registro CEP 21.08.2009.

Atenciosamente,


Prof. Dra. **Maria Izabel Souza Camargo**
Coordenadora

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. EDUARDO KOKUBUN

DD. Docente do Departamento de Educação Física – I.B.

UNESP - CRC

APÊNDICE. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - Conselho Nacional de Saúde, Resolução 196/96

Os professores Marcos Roberto Queiroga e Ricardo Augusto Barbieri estão desenvolvendo estudos que visam identificar a **Interações entre atividade física e aptidão física na herdabilidade de marcadores moleculares e bioquímicos relacionados à sensibilidade à insulina: estudo em gêmeos**. Para tanto, convidam seus filhos(as) gêmeos(as) _____ e _____

a participarem mediante vossa autorização (Pai/Mãe ou responsável maior de 18 anos) _____ . O objetivo dessas pesquisas são o de verificar o quanto a prática de atividade física pode reduzir o risco de desenvolver doenças associadas com o metabolismo da glicose, como o diabetes tipo 2. A rotina de avaliações constará das seguintes medidas:

- 1) Medidas de pressão arterial, massa corporal, estatura e dobras cutâneas.
- 2) Coleta de sangue em jejum e após duas horas para análises bioquímicas (teores de glicose, insulina, lipídios, GH, leptina, adiponectina, peptídeo C, cortisol e glucagon) e de expressão de genes e polimorfismos genéticos.
- 3) Questionários de identificação sobre prática de atividades física e de zigosidade.
- 4) Avaliação do estágio maturacional mediante características sexuais secundárias a partir da observação uma ficha contendo fotos com diversos estágios de desenvolvimento dos pêlos pubianos e genitálias para os meninos enquanto as meninas relatarão a presença ou ausência de menarca e estágios desenvolvimento mamário.
- 5) Por fim, os gêmeos(as) realizarão uma bateria de testes para determinar seus índices de aptidão física.

Os desconfortos e riscos dos testes são aqueles associados com a uma prática esportiva regular ou coleta de sangue tradicional. Durante a realização do exercício os avaliados poderão sentir-se ofegantes, com a respiração e o coração em ritmo acelerado. Havendo qualquer desconforto que impossibilite a realização dos testes ou das medidas poderá ser solicitado a interrupção em qualquer das etapas. Após a coleta de sangue poderá surgir discretos hematomas decorrentes da perfuração. A participação na pesquisa é voluntária e seus filhos(as) poderão abandoná-la de acordo com seus desejos sem qualquer tipo de prejuízo ou punição.

As informações coletadas nas avaliações serão confidencialmente estudadas e serão utilizadas somente para fins de pesquisa científica. Após as explicações e leitura deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, se alguma dúvida ainda persistir ou se você julgar necessárias informações adicionais sobre qualquer aspecto deste projeto de pesquisa sinta-se à vontade para que possa esclarecer de forma satisfatória.

Eu _____ RG _____ gênero _____

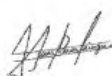
Nascido(a) ____/____/____ residente a Rua/AV _____ nº _____

Bairro _____ CEP _____ Telefone () _____ recebi cópia do presente

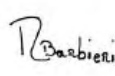
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e permito meus filhos(as) participarem da pesquisa realizada pelo Doutorando Marcos Roberto Queiroga, RG 4.209.962-7 e o mestrando Ricardo Augusto Barbieri, RG 32.829.917-0 pertencentes a Universidade Estadual Paulista - Campus de Rio Claro do Instituto de Biociências. Endereço: Av: 10 A, 336, Bela Vista: CEP: 13.506-731. Telefone: 19-3525-6264/3526-4307 orientados pelo Prof. Dr. Eduardo Kokubun.

Rio Claro, _____ de _____ de 2009

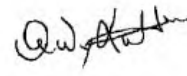
Assinatura do responsável



Marcos Roberto Queiroga



Ricardo Augusto Barbieri



Dr. Eduardo Kokubun