

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA
CAMPUS DE BOTUCATU**

**POLIMORFISMOS GÊNICOS E DANOS NO DNA EM INDIVÍDUOS
COM OBESIDADE MÓRBIDA**

BRUNO CESAR OTTOBONI LUPERINI

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Patologia da
Faculdade de Medicina de Botucatu,
Universidade Estadual Paulista – UNESP,
para obtenção do título de mestre em
Patologia

**BOTUCATU – SP
2012**

**“UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA
CAMPUS DE BOTUCATU**

**POLIMORFISMOS GÊNICOS E DANOS NO DNA EM INDIVÍDUOS
COM OBESIDADE MÓRBIDA**

BRUNO CESAR OTTOBONI LUPERINI

ORIENTADORA: DAISY MARIA FAVERO SALVADORI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP, para obtenção do título de mestre em Patologia.

**BOTUCATU – SP
2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Luperini, Bruno Cesar Ottoboni.

Polimorfismos genicos e danos no DNA em indivíduos com obesidade
mórbida / Bruno Cesra Ottoboni Luperini. – Botucatu : [s.n.], 2012

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade
Estadual Paulista, 2012

Orientador: Daisy Maria Favero Salvadori

Capes: 20206003

1. Polimorfismo (Genética). 2. DNA. 3. Obesidade mórbida.

Palavras-chave: Adiponectina; APM1; FTO; Epidemiologia molecular;
Genotoxicidade; Obesidade.

“Sou o que quero ser, porque possuo apenas uma vida e nela, só tenho uma chance de fazer o que quero. Tenho felicidade o bastante para fazê-la doce, dificuldades para fazê-la forte, tristeza para fazê-la humana e esperança suficiente para fazê-la feliz. As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas, elas sabem fazer o melhor das oportunidades que aparecem em seus caminhos.”

Clarice Lispector

Dedicatória

Dedico esse trabalho, assim como dedico cada passo que dei para chegar até aqui. Meus pais Cristino Luperini e Marcia Ottoboni Luperini e meu irmão Ricardo Luperini, meu alicerce, minha razão de querer seguir em frente, de conquistar o mundo, de ser motivo de orgulho para vocês. Obrigado por acreditar em mim e pelo apoio incondicional em cada escolha que fiz em minha vida. Obrigado por me ensinar que tempestades passam e que obstáculos nos fazem crescer. Vocês são meus exemplos de vida, de caráter, o melhor significado da palavra família. Obrigado por serem assim, simplesmente os melhores pais que alguém poderia ter.

Amo vocês...

Também dedico à vocês, Olivio Ottoboni e Cláudia Ottoboni meus avós que tanto torceram por mim, me apoiando e desejando sempre o melhor. À Beatriz Luperini, que sempre se preocupou comigo e acreditou em mim. Obrigado por serem grandes exemplos de vida!

Não poderia deixar de dedicar esse trabalho ao meu avô, Juvenal Luperini. É com todo o carinho do mundo que dedico essa conquista à uma pessoa tão querida, que esteja onde estiver, está olhando por nós... Espero te encontrar um dia vó, e receber o abraço que sei que receberia se estivesse com a gente...

Saudade!

“Ainda que eu caminhe pelo vale da sombra da morte, não temerei mal nenhum, porque Tú estás comigo”

Salmo 23.4

Agradecimentos

Finalmente apresento a vocês os frutos do trabalho de dois anos, e ao apresentá-los sinto um sentimento de felicidade como há tempos não sentia. Brincar com a imaginação, com o conhecimento e a capacidade de experimentar, não foi fácil. Com toda minha impaciência e com a certeza de ser alguém que não consegue ver o significado da palavra "esperar", posso dizer que tive muitos momentos difíceis até chegar aqui. Nesse meio tempo, me aventurei em uma nova cidade, um novo trabalho, até em novos amigos, mas nunca me esqueci de onde vim e de todos os ensinamentos valiosos que recebi dos meus pais. Aprendi que a pesquisa é difícil, que as coisas nem sempre saem como planejamos, mas que com certeza o esforço vale a pena!

Trabalho difícil este de agradecer a todos, descrevendo sentimentos em palavras. A todos que me ajudaram a ser quem eu sou, que depositaram confiança em mim e para os quais sou uma esperança, resta-me apenas agradecer.

Muito obrigado...

Apesar do sufoco, do nó na garganta e do aperto no coração, insisto em escrever, porque quero compartilhar algumas palavras com vocês. A verdade é que eu tenho tantas coisas por dizer e palavra alguma traduziria isso tudo...

Nunca estive tão próximo de Deus como estive nesses últimos anos. Agradeço a Ti Senhor por todas as glórias e todas as graças. Sem Ti jamais chegaria até aqui!

“Sonda-me, ó Deus, e conhece o meu coração; prova-me, e conhece os meus pensamentos. E vê se há em mim algum caminho mau, e guia-me pelo caminho eterno”

Salmos 139:23-24

Daisy Maria Fávero Salvadori, eu jamais poderia começar meus agradecimentos senão por você. Embora eu não saiba muito bem o porquê, agradeço por ter acreditado naquele moço que veio de longe, meio perdido, meio assustado e que não tinha idéia do que o aguardava. Você acreditou em mim e abriu a primeira porta na minha vida de pesquisador. Graças a você, amo o que eu faço, e continuarei batalhando, pois tenho o maior exemplo que poderia ter, um espelho, um norte para o qual sempre procuro seguir. Obrigado por ser essa pessoa tão especial que muitas vezes nos trata como uma mãe e acolhe seus filhos com palavras de incentivo, apoiando e impulsionando a todos, palavras essas que às vezes são firmes, porém sempre fundamentais.

À todas as mulheres que participaram desse estudo e tornaram esse projeto possível. À vocês, desejo toda a sorte do mundo.

Ao Dr Irineu Rasera Junior, Dra Elisabete Cristina Shiraga, Patrícia Fátima Sousa Novais, Noa Pereira Prada de Souza e a toda equipe da Clínica Bariátrica, pela participação essencial na coleta de material e informações clínicas, pela parceria e disponibilidade que contribuíram para a execução desse trabalho.

Ao Dr Celso Vieira de Souza Leite e à Prof Dra Maria Rita Marques de Oliveira, pela colaboração no trabalho.

Ao Departamento de Patologia e à Vânia Soler pela competência, profissionalismo e apoio em todo esse processo.

À Prof Dra Debora Damasceno e à Prof Dra Raquel Alves dos Santos pelas valiosas contribuições no exame de qualificação.

Ao Grupo de Apoio à Pesquisa e ao José Eduardo Corrente por todo suporte para a conclusão desse trabalho.

À CAPES e ao CNPQ por acreditarem no potencial do nosso estudo e pelo suporte financeiro.

"Escolho meus amigos não pela pele ou outro arquétipo qualquer, mas pela pupila. Tem que ter brilho questionador e tonalidade inquietante. A mim não interessam os bons de espírito nem os maus de hábitos. Fico com aqueles que fazem de mim louco e santo. Deles não quero resposta, quero meu aresso. Que me tragam dúvidas e angústias e aguentem o que há de pior em mim. Para isso, só sendo louco. Quero os santos, para que não duvidem das diferenças e peçam perdão pelas injustiças. Escolho meus amigos pela alma lavada e pela cara exposta. Não quero só o ombro e o colo, quero também sua maior alegria. Amigo que não ri junto, não sabe sofrer junto. Meus amigos são todos assim: metade bobeira, metade seriedade. Não quero risos previsíveis, nem choros piedosos. Quero amigos sérios, daqueles que fazem da realidade sua fonte de aprendizagem, mas lutam para que a fantasia não desapareça. Não quero amigos adultos nem chatos. Quero-os metade infância e outra metade velhice! Crianças, para que não esqueçam o valor do vento no rosto; e velhos, para que nunca tenham pressa. Tenho amigos para saber quem eu sou. Pois os vendo loucos e santos, bobos e sérios, crianças e velhos, nunca me esquecerei de que "normalidade" é uma ilusão imbecil e estéril."

Oscar Wilde

Agradeço à Bruna Viana, outra metade de mim que encontrei a pouco tempo, mas que me fortalece e me faz acreditar que juntos podemos ir muito mais longe.

À Francieli Costa Machado, que nunca me abandonou e nunca deixou de lado esse sentimento puro de nossa longa amizade.

Ao Evandro Vagner Tambarussi por ter estado sempre presente ao longo desse tempo, pelo companheirismo, pela paciência e por acreditar que eu era capaz.

À Daiane Nunes, por ser tão querida e me fazer tão bem.

À Celina Oliveira, uma pessoa especial que tem um lugar reservado no meu coração.

Aos amigos de faculdade: Carina, Carolina, Fernanda, Diego, Danilo, Belini, Andiara, Gustavo e Laís. Acredito que a presença na maioria das vezes se vai, mas lembranças jamais deixarão de existir. Obrigado por dividirem comigo uma das melhores fases da minha vida.

À Paula Correa Dias, uma amiga mais do que especial, uma irmã que conquistei há tempos, com quem divido alegrias e tristezas, mas sem a qual não consigo mais viver.

À Marília de Paula Porto por dividir o dia se tornando noite, e o sol dando lugar à lua. Obrigado por dividir a chuva que caía e a neblina que tomava conta de tudo. Obrigado por ser essa pessoa iluminada e que me ensinou que as pessoas são diferentes, cada uma a seu modo, e que aceitar essas diferenças é o que nos faz crescer.

Obrigado à Danielle Almeida por dividir comigo as alegrias, os percalços e as glórias desse projeto.

Ao João Paulo de Castro Marcondes, por estar presente em todos os momentos, fossem eles bons ou ruins, orientando e compartilhando seu conhecimento.

Ao Renato Paschoal Prado, por toda a ajuda e pela companhia sempre.

À Elaine Aparecida de Camargo por toda doçura e paciência incondicional.

À Juliana Lara Padovani, prestativa e atenciosa. Obrigado por todo o apoio e ensinamentos tão valiosos.

À Camila Gobete e à Amanda de Camargo por todo o apoio e competência.

Ao André Savio por toda a ajuda no processo de coleta de material.

À Mariana Gobbo Braz por ser um exemplo de competência e pelos incentivos.

À Glenda Nicioli pelos conhecimentos transmitidos e disposição em ajudar.

À Luciana Feliciano pela amizade e companhia.

À Vanessa Lorenço Peresi pelo entusiasmo e pelas conversas sempre produtivas.

À Cristiana Murbachi pela força e companheirismo.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Resumo

A obesidade é uma desordem multifatorial que envolve fatores hereditários, ambiente e estilo de vida, e suas consequências não são apenas sociais ou psicológicas, mas estão também relacionadas à presença de co-morbididades como a hipertensão arterial, diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e vários tipos de câncer. Sabe-se, hoje, que há genes relacionados ao peso corporal, embora as relações entre genética e obesidade sejam ainda questões de muito debate. Portanto, o presente estudo teve como objetivos avaliar os níveis de danos no DNA (teste cometa) em linfócitos de pacientes obesas (n=300) e mulheres eutróficas (n=300); a frequência de polimorfismos dos genes *FTO* (rs9939609) e *APM1*: 45T/G (rs2241766) e a existência de associação entre essas variantes gênicas e a incidência de lesões genotóxicas nessas populações. Os dados obtidos evidenciaram que as mulheres obesas possuem maiores níveis de lesões primárias no DNA de linfócitos, incluindo purinas e pirimidinas oxidadas, independentemente de seus genótipos para os genes *FTO* e *APM1*. A avaliação das variantes do gene *FTO* mostrou que os genótipos AA e TT foram, respectivamente, mais e menos frequentes nas pacientes obesas do que nas mulheres do grupo controle e que aquelas com a variante AA em ambos os grupos apresentaram maiores níveis de lesões nos DNA. Para o gene *APM1*, o genótipo TT foi o mais frequente em ambos os grupos, mas as mulheres com as variantes TG+GG foram as que apresentaram níveis mais elevados de lesões genotóxicas. Esses resultados indicaram, portanto, que a obesidade está relacionada a níveis mais altos de lesões genotóxicas em linfócitos de sangue periférico e que o genótipo AA do gene *FTO*, além de ser mais frequente em mulheres com obesidade mórbida está associado a maiores níveis de danos no DNA, assim como o alelo G do gene *APM1*. Assim sendo, pode-se concluir que pacientes obesos apresentam maiores riscos para o desenvolvimento de doenças relacionadas a danos genéticos.

Palavras-chave: adiponectina, *APM1*, *FTO*, epidemiologia molecular; genotoxicidade, obesidade.

Abstract

Obesity is a multifactorial disorder which involves heredity, environment and lifestyle. Its consequences are not just social or psychological, but also related to the presence of comorbidities such as hypertension, type 2 diabetes, cardiovascular disease and various types of cancer. Although some genes have been associated to body weight, the relationship between genetics and obesity are still object of debate. Therefore, this study aimed to assess the level of DNA damage (comet assay) in lymphocytes from morbid obese patients (n=300) and normal weight women (n=300); the frequencies of *FTO* (rs9939609) and *APM1*: 45T/G (rs2241766) gene polymorphisms and the relationship between these gene variants and the amount of genotoxic damage were also investigated. Data showed higher level of DNA primary lesions, including oxidized purines and pyrimidines, in lymphocytes of obese than in eutrophic women, regardless their *FTO* and *APM1* genotypes. The AA and TT *FTO* genotypes were respectively more and less frequent in obese patients than in the control population. Those women with the AA variant, in both groups, presented the highest levels of DNA damage. For *APM1* gene, TT genotype was the most frequent in both groups, however women with the allele G (TG+GG variants) presented the highest levels of genotoxic damage. These results indicated that obesity is associated to high levels of genotoxic damage in peripheral blood lymphocytes, and that the AA genotype of the *FTO* gene is related to morbid obesity and to the highest levels of DNA damage, as well as the G allele of the *APM1* gene. In conclusion, obese patients with *FTO* AA genotypes are at higher risk for developing diseases related to genetic damage.

Keywords: adiponectin, *APM1*, *FTO*, molecular epidemiology, genotoxicity, obesity.

Índice

Capítulo I

1. Revisão da Literatura	1
2. Objetivos	13
3. Referências Bibliográficas	15

Capítulo II

1. Manuscrito para publicação	21
2. Conclusões	41
3. Referências Bibliográficas	42

Anexos	47
---------------------	-----------

Revisão da Literatura

Considerações iniciais

A obesidade é uma doença crônica multifatorial, caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal, decorrente da hiperplasia e/ou hipertrofia dos adipócitos derivada do desequilíbrio entre o consumo e o gasto energético (Repetto *et al.*, 2003; Marti *et al.*, 2004). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde a obesidade atingiu proporções epidêmicas em todo o mundo, com pelo menos 2,6 milhões de mortes a cada ano como resultado do excesso de peso. Antes associada a países desenvolvidos, a obesidade é agora também prevalente em países em desenvolvimento, se tornando um problema de saúde pública (WHO, 2010). O Índice de Massa Corporal (IMC) é comumente utilizado para classificar o nível de obesidade individual. O cálculo leva em conta o peso e a altura (kg/m^2), assim, indivíduos com IMC entre 18,5 e 24,9 kg/m^2 são considerados eutróficos; entre 25 e 29,9 kg/m^2 são classificados com sobrepeso e aqueles com IMC maior ou igual a 30 kg/m^2 são considerados obesos. O aumento na prevalência de indivíduos obesos nas últimas três décadas parece ter sido impulsionado por mudanças ambientais, as quais são principalmente caracterizadas pela ingestão de calorias em excesso e diminuição dos níveis de atividade física (Abelson & Kennedy, 2004; Keith *et al.*, 2006). Além disso, hábitos alimentares, fatores sociológicos, alterações metabólicas e neuroendócrinas, bem como componentes hereditários estão também relacionados ao sobrepeso (Martínez, 2000). A obesidade surge quando a ingestão excede os gastos energéticos. O mundo atual dispõe de fonte essencialmente ilimitada, relativamente barata e altamente atrativa de alimentos com alta densidade energética, além de um estilo de vida exigindo apenas baixos níveis de atividade física. Nestas circunstâncias, a obesidade ocorre mais frequentemente porque, enquanto o organismo tem excelentes mecanismos de defesa fisiológica contra a

depleção dos estoques de energia, não dispõe dos mesmos contra o acúmulo de reservas em excesso quando o alimento é abundante (Hill & Peters, 1998).

Muitos fatores biológicos, psicossociais e comportamentais afetam o equilíbrio energético, levando ao ganho de peso já na infância. O consumo dos chamados “*junk food*”, associados à falta de oportunidades para recreações fisicamente ativas e outros aspectos da sociedade moderna, promovem estilos de vida considerados insalubres do ponto de vista nutricional. Além disso, o estresse emocional, a depressão ou outros problemas psicológicos decorrentes de abuso e negligência, podem agravar esta situação, levando a transtornos alimentares, falta de práticas esportivas e outras atividades sociais (Murtagh *et al.*, 2011). Considerando que uma criança eutrófica consome cerca de 100 kcal (quilocalorias) a mais do que o necessário, o desequilíbrio energético para crianças gravemente obesas pode exceder 1000 kcal por dia, sugerindo haver uma profunda disfunção alimentar e nos hábitos de vida (Wang *et al.*, 2006). Obesidade nesse nível pode provocar consequências imediatas e potencialmente irreversíveis. Tais complicações, refletidas em anos de progressiva deterioração metabólica, vislumbram um prognóstico preocupante (Pinhas-Hamiel & Zeitler, 2007).

Considerada séria ameaça à saúde, a obesidade está associada a um risco aumentado para o desenvolvimento de diversas comorbidades, como o diabetes tipo 2, doenças cardíacas, síndrome metabólica, hipertensão, infarto e até mesmo vários tipos de câncer (Frayling *et al.*, 2007). A obesidade tem sido caracterizada como um estado inflamatório de baixa intensidade, responsável pela produção de diversas citocinas, ou como são chamadas, adipocitocinas, pelo tecido adiposo (Lopes, 2007). Além das adipocinas, o estado inflamatório existente na obesidade induz uma superprodução de espécies reativas de oxigênio, as quais danificam estruturas celulares e podem culminar no desenvolvimento de comorbidades

(Fernández-Sánchez *et al.*, 2011). Já é de amplo conhecimento que os radicais livres são moléculas muito reativas, com capacidade, por exemplo, de interagir com o DNA e induzir lesões genotóxicas ou mutações capazes de provocar importantes alterações fenotípicas em nível celular, tecidual ou do organismo (Sahaf *et al.*, 2005).

O tecido adiposo, que pode ser definido como um órgão endócrino, é o primeiro local de armazenamento do excesso energético em forma de triglicérides, além disso, também é considerado um sistema de auto defesa essencial para a sobrevivência durante períodos de inanição (Matsuzawaa *et al.*, 2003). É a hipertrofia e a hiperplasia do tecido adiposo que se caracterizam como lesões patológicas na obesidade (Bray, 2004). Segundo Trayhurn & Wood (2004), níveis circulantes elevados de citocinas inflamatórias e proteínas de fase aguda são resultado do excesso de adipocinas no tecido adiposo, caracterizando, assim, o estado inflamatório observado na obesidade. Com a progressão da obesidade e o aumento dos adipócitos, o fornecimento de sangue para o tecido adiposo pode ser reduzido. Resultados de estudo *in vitro* mostram que a indução de hipóxia nos adipócitos, também é um fator que leva a expressão aumentada de citocinas inflamatórias (Rausch *et al.*, 2008).

Os hormônios secretados pelo tecido adiposo interferem na homeostase energética, no metabolismo lipídico e da glicose, na homeostase vascular, na resposta imune e em funções reprodutivas. Recentemente, foi descoberto que no tecido adiposo há produção das citocinas IL-6, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e leptina, as quais desempenham papel decisivo no desenvolvimento da obesidade e resistência à insulina. Assim, o aumento do tecido adiposo tem efeitos pleiotrópicos nos eventos endócrinos e metabólicos, que podem contribuir para a patogênese das comorbidades associadas à obesidade (Singla *et al.*, 2010).

Atualmente, a obesidade vem sendo considerada um grande desafio para a manutenção da saúde humana, tendo atraído o interesse de diversos pesquisadores que buscam o entendimento dos mecanismos de gênese e desenvolvimento da doença e métodos terapêuticos e de prevenção que sejam eficazes e com menores efeitos colaterais (Channa *et al.*, 2008). Embora os medicamentos antiobesidade sejam efetivos, seu uso pode induzir importantes efeitos adversos. Assim, a cirurgia bariátrica, na qual o paciente perde de 30% a 40% do peso corporal, tem sido considerada uma alternativa relevante para o tratamento da obesidade mórbida (Adams *et al.*, 2007). Além da efetiva perda de peso, a maioria dos pacientes com diabetes, hiperlipidemia, hipertensão, apresenta melhora substancial dessas comorbidades após a cirurgia, embora o método cirúrgico *per se* possa desencadear problemas nutricionais e metabólicos. As técnicas utilizadas nas cirúrgicas bariátricas têm efeitos diferentes sobre a perda de peso e as possíveis complicações associadas. As mesmas alterações de anatomia e fisiologia gastrointestinal que reverterem a obesidade, ocasionalmente podem provocar desequilíbrios devido à ingestão diminuída ou perdas excessivas secundárias à reconfiguração da motilidade gastrointestinal, espaço de armazenamento, pH e perfil enzimático (Dalcanale *et al.*, 2009; Buchwald *et al.*, 2011). No entanto, a cirurgia bariátrica leva, a longo prazo, à melhoria da qualidade de vida e estado funcional dos pacientes com obesidade (Batsis *et al.*, 2009).

Genética da obesidade

A obesidade é uma desordem multifatorial, que inclui componentes genéticos e ambientais. Considerando que sua prevenção e tratamento são geralmente caros e difíceis, esforços poderiam ser direcionados para a identificação e aconselhamento

dos indivíduos mais suscetíveis. Esta situação reforça a necessidade de uma maior compreensão das interações genes/dieta e estilo de vida (Qi & Cho, 2008).

O envolvimento de genes e estilo de vida na manutenção do peso corporal está bem estabelecido, mas a participação de cada um desses fatores para a crescente epidemia de obesidade ainda é uma questão de muito debate (Marti *et al.*, 2004). Há pesquisas mostrando que componentes genéticos desempenham ação direta e importante sobre o desenvolvimento da obesidade (Bray, 2006). Em 2003, Loos e Bouchard descreveram que o risco de obesidade é duas a três vezes maior em indivíduos com histórico de obesidade na família. Além disso, o Índice de Massa Corporal é descrito como uma característica altamente hereditária (O'Rahilly & Farooqi, 2006). Diferenças individuais quanto à susceptibilidade à obesidade, refletem em grande parte, as constituições genéticas individuais (Speakman, 2008). Wardle *et al.* (2001) mostraram que em famílias nas quais os pais eram obesos, os filhos, mesmo não sendo obesos, tinham uma tendência à alimentação não saudável, e na grande maioria, eram sedentários. Alguns estudos têm indicado que populações geneticamente mais susceptíveis ao ganho de peso podem tornar-se excessivamente obesas devido ao estilo de vida e ambiente em que vivem (Friedman, 2003). Em 1962, Neel apresentou a idéia de que genes relacionados à predisposição à obesidade teriam “vantagem seletiva” em populações nas quais seus ancestrais experimentaram períodos de fome. Portanto, os indivíduos que herdaram tais genes apresentariam expressão aumentada de elementos relacionados à fome, não apenas ganhando peso, mas se tornando extremamente obesos. Essa teoria foi comprovada por estudo realizado nos Estados Unidos, em que se observou a desproporção entre afro-americanos e hispano-americanos obesos em relação a caucasianos (Cossrow & Falkner, 2004).

A variação genética individual que influencia o comportamento alimentar e a saciedade podem influenciar também processos de intervenções. Portanto, uma abordagem única para todos os indivíduos poderia ser ineficaz na prevenção ou tratamento da obesidade (Newell *et al.*, 2007). São inúmeros os estudos que buscam identificar genes associados a doenças, dentre as quais à obesidade mórbida. Uma das grandes vantagens advindas do uso de técnicas de biologia molecular foi a possibilidade de se caracterizar as variações genéticas individuais envolvidas na predisposição à determinada enfermidade. Os estudos moleculares que muitas vezes utilizam biomarcadores permitem avaliação mais detalhada do evento biológico, e até mesmo do efeito fisiológico, na etiologia de inúmeras doenças (Cortelli *et al.*, 2007).

O gene FTO e sua relação com a obesidade

O gene *FTO* (*fat-mass and obesity associated gene*), localizado no cromossomo 16q12.2 (Figura 1) e fortemente conservado em várias espécies de vertebrados, possui nove exons que se estendem por mais de 400 kb. Tendo surgido há cerca 450 milhões de anos, este gene possui variantes que parecem estar fortemente associadas à obesidade (Fredriksson *et al.*, 2008). O *FTO* codifica uma proteína de fita dupla, homóloga a Fe (II) e a 2-oxoglutarato oxigenase, que está envolvida em processos como reparo do DNA, metabolismo de ácidos graxos e modificações proteicas pós-transducionais, incluindo hidroxilação e demetilação de aminoácidos (Valegard *et al.*, 1998; Aravind & Koonin 2001; Hausinger, 2004; Clifton *et al.*, 2006;). Além disso, o gene *FTO* pode desempenhar funções importantes que são conhecidas há muito tempo, como a manutenção da homeostase energética e regulação da lipólise da gordura corporal (Herbert *et al.*, 2006; Qi & Cho, 2008). Recentemente Boissel *et al.* (2009), demonstraram que o gene *FTO* é essencial para

o desenvolvimento normal do sistema nervoso central e sistema cardiovascular, e que mutações nesse gene podem resultar em síndromes de malformação.

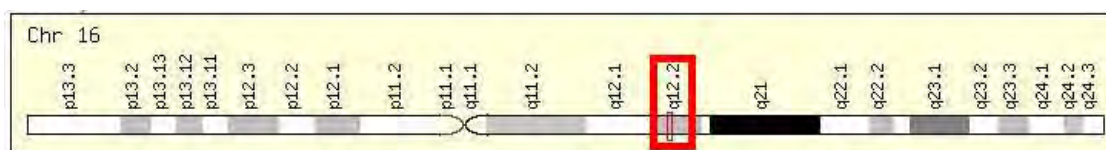


Figura 1. Cromossomo 16q12.2 e localização do gene *FTO*. Adaptado de: <http://www.genecards.org>

Embora vários investigadores continuem buscando relações entre o gene *FTO* e parâmetros relacionados à obesidade, a função dos produtos desse gene e as vias biológicas envolvidas ainda não estão completamente elucidadas (Terra *et al.*, 2010). Em 2007, Frayling *et al.*, em uma pesquisa que buscava uma possível relação entre o gene *FTO* e o diabetes tipo 2, encontraram que indivíduos com duas cópias do alelo A, tinham maior chance de manifestar a doença, no entanto, após efetuar ajuste estatístico do Índice de Massa Corporal (IMC) a associação entre diabetes tipo 2 e o *FTO* foi eliminada, sugerindo que esta relação ocorrera devido à presença de sobrepeso ou obesidade. Assim, novas pesquisas foram desenvolvidas buscando avaliar a relação entre o gene *FTO*, o acúmulo excessivo de gordura corporal e fatores ambientais. Hunt *et al.* (2008), observaram forte associação entre a frequência do alelo A do *FTO* e o aumento do IMC em populações dos Estados Unidos, fornecendo evidências consistentes do envolvimento desse gene com a obesidade. Na mesma época, Grant *et al.* (2008) descreveram que variações no gene *FTO* conferiam risco similar ao desenvolvimento de obesidade tanto para crianças como para seus pais. Em estudo realizado na Espanha, com 732 indivíduos, Gonzáles-Sanches *et al.* (2009), examinaram a associação entre o *SNP* rs9939609 do gene *FTO* e parâmetros relacionados à obesidade. Os autores observaram que o genótipo AA foi significativamente mais frequente em indivíduos obesos ($\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$), do que em indivíduos não obesos. Além disso, os

indivíduos homozigotos AA apresentaram maior circunferência de cintura que os portadores dos genótipos AT e TT. Estudo, como o de Andreasen *et al.* (2008), além de também demonstrar correlação positiva entre variações do gene *FTO* e o aumento de gordura corporal, peso e circunferência de cintura, mostrou que em indivíduos de meia idade o *SNP* rs9939609 pode estar associado a um declínio na taxa de sensibilidade à insulina.

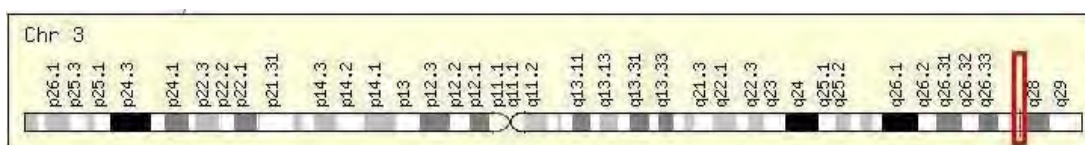
Recentemente, Zabena *et al.* (2009), observaram que, além da forte associação entre a frequência do alelo A do gene *FTO* e a obesidade, altos níveis de RNAm do gene estavam presentes no tecido adiposo subcutâneo de indivíduos com obesidade mórbida, sugerindo seu envolvimento na regulação da lipólise e na distribuição da gordura corporal. Anteriormente, Wardle *et al.* (2008) mostraram que indivíduos com dois alelos A do gene *FTO* tem menor capacidade de resposta aos sinais de saciedade, apoiando a hipótese de que a associação entre obesidade e o gene *FTO* envolve efeitos sobre o apetite.

Adiponectina e obesidade

Sabe-se que vários hormônios e citocinas são secretados pelo tecido adiposo, dentre eles, a adiponectina (Gable *et al.*, 2005). Esta é uma importante adipocina secretada pelos adipócitos e desempenha papel relevante na regulação da homeostase da glicose (Scherer *et al.*, 1995). A adiponectina é uma proteína que exerce efeitos importantes em diversos processos metabólicos e vasculares, pois apresenta propriedades antiinflamatórias e antiaterogênicas. Sua concentração plasmática é inversamente proporcional à massa de tecido adiposo e está intimamente relacionada ao desenvolvimento de Síndrome Metabólica (SM) e Resistência à Insulina (Arita *et al.*, 1999; Okamoto *et al.*, 2006).

Como descrito anteriormente, o tecido adiposo é considerado um órgão endócrino, que produz diversas citocinas inflamatórias, hormônios e ácidos graxos livres. Em processos como a obesidade, ocorre sua expansão e consequente aumento na produção dessas substâncias, embora as concentrações séricas de adiponectina diminuam consideravelmente (Spiegelman, 1993). Além de melhorar a sensibilidade à insulina e elevar o colesterol HDL (*high density lipoprotein*) em indivíduos obesos, a adiponectina possui ação antiinflamatória na parede vascular, inibe a proliferação celular no músculo liso vascular e protege o endotélio da adesão de macrófagos e das possíveis lesões induzidas por essas células (Fruebis, 2001; Stefan, 2002). Segundo Chen *et al.* (2006), o efeito anti inflamatório da adiponectina se deve à sua capacidade de inibir a proliferação de células do músculo liso, a formação de células espumosas, a adesão de monócitos e a absorção de colesterol LDL (*low density lipoprotein*) pelos macrófagos. Também foram descritos os efeitos protetores da adiponectina no fígado, os quais incluem a diminuição da produção de glicose, do acúmulo de gordura e inflamação, e aumento na captação da glicose e do gasto energético, e da oxidação lipídica no pâncreas (Namvaran *et al.*, 2011). No entanto, recentemente, foi demonstrado que pacientes com vários tipos de câncer, incluindo gástrico, de próstata, endométrio e câncer de mama, têm baixos níveis de circulação de adiponectina (Goktas *et al.*, 2005; Ishikawa *et al.*, 2005).

O gene da adiponectina (*ADIPOQ*) contém 3 exons e abrange 16 kb do cromossomo 3q27 (Figura 2). Este gene tem mais de dez polimorfismos de base única (*SNPs* - *Single Nucleotide Polymorphism*), com *SNPs* nas regiões exônica, intrônica e promotora do gene (Hara *et al.*, 2002; Vasseur *et al.*, 2002; Vasseur *et al.*, 2006).



Uma das variantes do gene da adiponectina, também chamadas de *APM1* (*adipose most abundant gene transcript 1*), mais comumente estudadas é a T45G no exon 2 (Figura 3). Esse polimorfismo já foi associado à obesidade em populações da Alemanha (Stumvoll *et al.*, 2002) e de Taiwan (Yang *et al.*, 2003); à síndrome de resistência à insulina em brancos italianos (Menzaghi *et al.*, 2002) e japoneses (Populaire *et al.*, 2003); e à diabetes tipo 2 em brancos franceses (Vasseur *et al.*, 2002).

Embora alguns dos polimorfismos do gene da adiponectina tenham sido associados a diferentes níveis de expressão de proteínas plasmáticas ou RNAm, nenhum deles foi amplamente estudado a nível molecular na tentativa de elucidar os mecanismos indutores das desordens associadas. Alguns dos polimorfismos do gene *APM1* podem ter efeito direto sobre a expressão do gene; outros podem simplesmente estar em desequilíbrio de ligação. Isso poderia explicar porque em

certas populações ou grupos étnicos os fenótipos da doença tenham sido associados a determinado alelo, enquanto que em outras, a outro alelo do mesmo polimorfismo (Vasseur *et al.*, 2006).

Objetivos

Embora já tenham sido realizadas centenas de estudos relacionando estresse oxidativo, danos no DNA e diversas enfermidades, são raras, ou praticamente inexistentes, as avaliações sobre a frequência ou níveis de lesões genotóxicas em indivíduos com obesidade mórbida. Nesse sentido, a identificação de variantes genéticas em indivíduos obesos pode fornecer informações relevantes sobre a complexa rede de eventos moleculares associados a essa disfunção. Portanto, o presente estudo tem como principal objetivo a avaliação genética de pacientes obesos, com ênfase nos polimorfismos gênicos e à análise de lesões genotóxicas.

O presente estudo teve como objetivos específicos avaliar:

- ✓ a relação entre os polimorfismos do gene *FTO* (rs9939609) e do gene *APM1* (rs2241766) e a obesidade mórbida;
- ✓ a presença de lesões genotóxicas em linfócitos de mulheres com obesidade mórbida;
- ✓ a relação entre os níveis de danos genotóxicos e os polimorfismos do gene *FTO* e *APM1*.

Referências Bibliográficas

- Abelson P, Kennedy D. The obesity epidemic. *Science*. 2004;304:1413.
- Adams TD, Gress RE, Smith SC. Long-term mortality after gastric bypass surgery. *New Engl J Med*. 2007;357:753-61.
- Andreasen CH, Stender-Petersen KL, Mogensen MS, Torekov S., Wegner L, Andersen G, et al. Low Physical Activity Accentuates the Effect of the FTO rs9939609 Polymorphism on Body Fat Accumulation. *Diabetes*. 2008;57:95-101.
- Aravind L, Koonin EV. The DNA-repair protein AlkB, EGL-9, and leprecan define new families of 2-oxoglutarate- and iron-dependent dioxygenases. *Genome Biol*. 2001;2(3):RESEARCH000.
- Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;257:79-83.
- Batsis JA, Lopez-Jimenez F, Collazo-Clavell ML, Clark MM, Somers VK, Sarr MG. Quality of Life after Bariatric Surgery: A Populationbased Cohort Study. *The American Journal of Medicine*. 2009;122:1055.e1-1055.e11.
- Bray GA. Medical Consequences of Obesity. *The J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(6):2583-89.
- Bray GA. Obesity: the disease. *J Med Chem*. 2006;49(14):4001-7.
- Boissel S, Reish O, Proulx K, Kawagoe-Takaki H, Sedgwick B, Yeo GSH. Loss-of-Function Mutation in the Dioxygenase-Encoding FTO Gene Causes Severe Growth Retardation and Multiple Malformations. *The American Journal of Human Genetics* 2009;85:106–111.
- Buchwald H, Avidor Y, Braunwald E, Jensen MD, Pories W, Fahrbach K, Schoelles K. Bariatric Surgery A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA*. 2004; 292:1724-28.
- Channa N, Jayasena MA, Bchir MRCP, Steve R, Bloom MA. Role of Gut Hormones in Obesity. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2008;37:769-87.
- Chen DC, Chung YF, Yeh YT, Chaung HC, Kuo FC, Fu OY, et al. Serum adiponectin and leptin levels in Taiwanese breast cancer patients. *Cancer Letters*. 2006;237:109-11.
- Clifton I.J., McDonough M.A., Ehrismann D., Kershaw N.J., Granatino N., Schofield C.J. Structural studies on 2-oxoglutarate oxygenases and related double-stranded β -helix fold proteins. *J. Inorg. Biochem* 2006;100 644–69.
- Cossrow N, Falkner B. Race/ethnic issues in obesity and obesity-related comorbidities. *J Clin Endocrinol Metabol*. 2004;89:2590-4.
- Dalcanale L, Oliveira CPMS, Faintuch J, Nogueira MA, Rondó P, Lima VMR, Mendonça S, Pajecki D, Mancini M, Carrilho FJ. Long-Term Nutritional Outcome After Gastric Bypass. *Obes Surg*. 2010;20:181-87.

Demirbag R, Yilmaz R, Gur M, Celik H, Guzel S, Selek S, Kocyigit A. DNA damage in metabolic syndrome and its association with antioxidative and oxidative measurements. *Int J Clin Pract.* 2006;60(10):1187-93.

Farooqi IS, O'Rahilly S. Monogenic Obesity In Humans. *Annu. Rev. Med.* 2005;56:443–58.

Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González A, Esquivel-Chirino C. Inflammation, Oxidative Stress, and Obesity. *Int J Mol Sci.* 2011;12:3117-32.

Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, et al. A Common Variant in the FTO Gene Is Associated with Body Mass Index and Predisposes to Childhood and Adult Obesity. *Science.* 2007; 316(5826):889-94.

Fredriksson R, Häggglund M, Olszewski PK, Stephansson O, Jacobsson JA, Olszewska AM et al. The obesity gene, FTO, is of ancient origin, up-regulated during food deprivation and expressed in neurons of feeding-related nuclei of the brain. *Endocrinology* 2008;149(5):2062-71.

Friedman JM. Modern science versus the stigma of Obesity. *Nat Med.* 2004; 10(6):563-69.

Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, et al. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:2005-10.

Gable DR, Stephens JW, Humphries SE, Hurel SJ. The +276G>T adiponectin gene SNP is associated with cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia.* 2005;48(suppl.1):A131.

Goktas, S. et al. Prostate cancer and adiponectin. *Urology.* 2005;65:1168-72.

González-Sánchez JL, Zabena C, Martínez-Larrad MT, Martínez-Calatrava MJ, Pérez-Barba M, Serrano-Ríos M. Variant rs9939609 in the FTO gene is associated with obesity in an adult population from Spain. *Clin Endocrinol.* 2009;70:390-93.

Grant SFA, Li M, Bradfield JP, Kim CE, Annaiah K, Santa E, et al. Association Analysis of the FTO Gene with Obesity in Children of Caucasian and African Ancestry Reveals a Common Tagging SNP. *PLoS ONE.* 2008;3(3):e1746.

Hara K, Boutin P, Mori Y et al (2002) Genetic variation in the gene encoding adiponectin is associated with an increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetes.* 51:536-40.

Hausinger RP. Fatty acid α -ketoglutarate-dependent hydroxylases and related enzymes. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2004;39(1):21-68.

- Herbert, A., Gerry, N. P., McQueen, M. B., Heid, I. M., Pfeufer, A., Illig, T. A common genetic variant is associated with adult and childhood obesity. *Science* 2006;312, 279–283.
- Hill JO, Peters JC. Environmental Contributions to the Obesity Epidemic. *Science*. 1998; 280:1371-74.
- Hunt SC, Stone S, Xin Y, Scherer CA, Magness CL, Iadonato SP, et al. Association of the FTO gene with BMI. *Obesity*. 2008;16:902-04.
- Ishikawa, M. et al. Plasma adiponectin and gastric cancer. *Clin Cancer Res*. 2005;11:466-72.
- Keith SW, Redden DT, Katzmarzyk PT, Boggiano MM, Hanlon EC, Benca RM, et al. Putative contributors to the secular increase in obesity: exploring the roads less traveled. *Int J Obesity* 2006;30:1585-94.
- Loos RJ, Bouchard C. Obesity: is it a genetic disorder? *Journal of International Medicine*. 2003;254:971-977.
- Lopes HF. Hipertensão e inflamação: papel da obesidade. *Rev Bras Hipertens*. 2007;14(4):239-44.
- Maes HHM, Neale MC, Eaves LJ. Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity. *Behav. Genet*. 1997; 27:325-51.
- Marti A, Moreno-Aliaga MJ, Hebebrand J, Martínez JA. Genes, lifestyles and obesity. *Int J Obesity*. 2004;28:S29-S36.
- Martínez JA. Obesity in young Europeans: genetic and environmental influences. *Eur J Clin Nutr*. 2000;54:S56-S60.
- Matsuzawaa Y, Shimomuraa I, Kiharaa S, Funahashi T. Importance of Adipocytokines in Obesity-Related Diseases. *Horm Res*. 2003;60(suppl 3):56-9.
- Menzaghi C, Ercolino T, Di Paola R, Berg AH, Warram JH, Scherer PE, et al. A haplotype at the adiponectin locus is associated with obesity and other features of the insulin resistance syndrome. *Diabetes*. 2002;51:2306-12.
- Murtagh L, Ludwig DS. State Intervention in Life-Threatening Childhood Obesity. *JAMA*. 2011;306:206-7.
- Neel JV. Diabetes mellitus: a “thrifty” genotype rendered detrimental by progress? *Am J Hum Genetics*. 1962;14:353-62;
- Newell A, Zlot A, Silvey K, Ariail K. Addressing the obesity epidemic: a genomics perspective. *Prev Chronic Dis*. 2007;2(4):1-6.
- Okamoto Y, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y, Libby P. Adiponectin: a key adipocytokine in metabolic syndrome. *Clinical Science*. 2006;110:267-78.

- Pinhas-Hamiel O, Zeitler P. Acute and chronic complications of type 2 diabetes mellitus in children and adolescents. *Pediatric Endocrinol Diabetes*. 2007; 369:1823-31.
- Populaire, C. et al. Does the -11377 promoter variant of APM1 gene contribute to the genetic risk for Type 2 diabetes mellitus in Japanese families? *Diabetologia*. 2003;46:443-5.
- Qi L, Cho YA. Gene-environment interaction and obesity. *Nutr Rev*. 2008; 66(12):684-94.
- Rausch ME, Weisberg S, Vardhana P, Tortoriello DV. Obesity in C57BL/6J mice is characterized by adipose tissue hypoxia and cytotoxic T-cell infiltration. *Int J Obesity*. 2008;32:451-63.
- Repetto G, Rizzolli J, Bonatto C. Prevalência, Riscos e Soluções na Obesidade e Sobrepeso: Here, There, and Everywhere. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2003; 47(6):633-35.
- Rothkamm, K, Kruger, I, Thompson, LH, and Lobrich, M. Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol*. 2003;230:5706-15.
- Sahaf B, Heydari K, Herzenberg LA, Herzenberg LA. The extracellular microenvironment plays a key role in regulating the redox status of cell surface proteins in HIV-infected subjects. *Arch Biochem Biophys*. 2005;434:26-32.
- Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem*. 2005; 270:26746-9.
- Singla P, Bardoloi A, Parkash AA. Metabolic effects of obesity: A review. *World J Diabetes*. 2010;1(3):76-88.
- Spiegelman BM, Choy L, Hotamisligil GS, et al. Regulation of adipocyte gene expression in differentiation and syndromes of obesity/diabetes. *J Biol Chem*. 1993;268:6823- 682 – ver a página certa
- Stefan, N. et al. Polymorphisms in the gene encoding adiponectin receptor 1 are associated with insulin resistance and high liver fat. *Diabetologia*. 2005;48: 2282-91.
- Stumvoll M, Tschrötter O, Fritsche A, Staiger H, Renn W, Weisser M, et al. Association of the T-G polymorphism in adiponectin (exon 2) with obesity and insulin sensitivity: interaction with family history of type 2 diabetes. *Diabetes* 2002;51:37-41.
- Terra X, Auguet T, Porras JA, Quintero Y, Aguilar C, Luna AM et al. Anti-inflammatory Profile of FTO Gene Expression in Adipose Tissues From Morbidly Obese Women. *Cell Physiol Biochem* 2010;26:1041-50.
- Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *British J Nutr*. 2004;92:347-55.

- Valegård K, van Scheltinga AC, Lloyd MD, Hara T, Ramaswamy S, Perrakis A. Structure of a cephalosporin synthase. *Nature*. 1998;394(6695):805-9.
- Vasseur F, Meyre D, Froguel P. Adiponectin, type 2 diabetes and metabolic syndrome: lessons from human genetic studies. *Expert Rev Mol Med*. 2006;8:1-12.
- Vasseur, F. et al. Single-nucleotide polymorphism haplotypes in the both proximal promoter and exon 3 of the APM1 gene modulate adipocyte-secreted adiponectin hormone levels and contribute to the genetic risk for type 2 diabetes in French Caucasians. *Hum Mol Genet*. 2002;11:2607-14.
- Wang YC, Gortmaker SL, Sobol AM, Kuntz KM. Estimating the Energy Gap Among US Children: A Counterfactual Approach. *Pediatrics*. 2006;118:1721-33.
- Wardle W, Carnell S, Haworth CMA, Farooqi IS, O'Rahilly S, Plomin R. Obesity Associated Genetic Variation in FTO Is Associated with Diminished Satiety. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(9):3640-43.
- World Health Organization (WHO) [Internet]. Acessado em: 05 de janeiro de 2012. Disponível em: <http://www.who.int/features/factfiles/obesity/en/>.
- Yang, W.S. et al. Genetic epistasis of adiponectin and PPARgamma2 genotypes in modulation of insulin sensitivity: a family-based association study. *Diabetologia*. 2003;46:977-83.
- Zabena C, González-Sánchez JL, Martínez-Larrad MT, Torres-García A, Alvarez-Fernández-Represa J, Corbatón-Anchuelo A, et al. The FTO Obesity Gene. Genotyping and Gene Expression Analysis in Morbidly Obese Patients. *Obesity Surg*. 2009;19:87-95.

Manuscrito para publicação

Introdução

A obesidade é uma doença crônica multifatorial, caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal derivada do desequilíbrio entre o consumo e o gasto energético (Repetto *et al.*, 2003; Marti *et al.*, 2004). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde a obesidade atingiu proporções epidêmicas em todo o mundo, com pelo menos 2,6 milhões de mortes por ano, se tornando assim, um grave problema de saúde pública (WHO, 2010). A obesidade está associada a risco aumentado para o desenvolvimento de diversas comorbidades, como o diabetes tipo 2, doenças cardíacas, síndrome metabólica, hipertensão, infarto e vários tipos de câncer (Frayling *et al.*, 2007).

A obesidade tem sido caracterizada como um estado inflamatório de baixa intensidade, sendo o tecido adiposo responsável pela produção de diversos mediadores pró-inflamatórios, conhecidos como adipocinas (Lopes, 2007). Esse estado inflamatório leva a superprodução de espécies reativas de oxigênio, que danificam estruturas celulares (Fernández-Sánchez *et al.*, 2011) e são capazes de interagir com o DNA induzindo lesões genotóxicas ou mutações que podem provocar importantes alterações fenotípicas em nível celular, tecidual ou no organismo (Sahaf *et al.*, 2005).

A relação entre genoma, estilo de vida e peso corporal é ainda questão de muito debate (Marti *et al.*, 2004). Há pesquisas mostrando que componentes genéticos desempenham ação direta e importante sobre o desenvolvimento da obesidade (Speakman, 2008; Bray, 2006). O gene *FTO* (*fat-mass and obesity associated gene*), localizado no cromossomo 16q12.2, por exemplo, possui variantes que estão fortemente associadas à obesidade e que desempenham funções importantes na manutenção da homeostase energética e na regulação da lipólise da gordura corporal (Herbert *et al.*, 2006; Fredriksson *et al.*, 2008; Qi & Cho, 2008). No

entanto, a função dos produtos desse gene e suas vias biológicas ainda não estão completamente elucidadas (Terra *et al.*, 2010). O *APM1* (*adipose most abundant gene transcript 1*) é outro gene que está envolvido com eventos observados na obesidade. Sabe-se que vários hormônios e citocinas são secretados pelo tecido adiposo, dentre os quais a adiponectina que exerce efeitos importantes em diversos processos metabólicos e vasculares e cuja concentração plasmática é inversamente proporcional à massa de tecido adiposo (Arita *et al.*, 1999; Gable *et al.*, 2006; Okamoto *et al.*, 2006). Um dos polimorfismos mais comumente estudados no gene da adiponectina (*APM1*) é localizado no éxon 2. As variantes do gene *APM1* já foram associadas à obesidade em populações da Alemanha (Stumvoll *et al.*, 2002) e de Taiwan (Yang *et al.*, 2003).

Embora inúmeros estudos tenham relacionado estresse oxidativo e danos no DNA a diversas enfermidades, são raras as avaliações sobre os níveis de lesões genotóxicas em indivíduos com obesidade mórbida e sobre a relação desses eventos no DNA a polimorfismos de genes associados à obesidade. Assim sendo, o presente estudo teve como objetivos avaliar a relação entre os polimorfismos do gene *FTO* (rs9939609) e do gene *APM1* (45T/G rs 2241766) e a obesidade mórbida; a presença de lesões genotóxicas em linfócitos e a relação entre os níveis dessas lesões e os polimorfismos dos genes *FTO* e *APM* em mulheres com obesidade mórbida.

Material e métodos

Casuística

O estudo foi realizado em um grupo de 300 mulheres (Anexo IV) com idade entre 20 e 45 anos, que foram submetidas a cirurgia bariátrica sempre pela técnica

de DGYR por laparotomia ou laparoscopia com anel de contenção, e pela mesma equipe médica. Todas as participantes responderam a um questionário de triagem que tinha por objetivo obter informações referentes aos hábitos de vida, uso de medicamentos e suplementos alimentares, e histórico clínico (Anexo I). Foram utilizados como critério de exclusão: etilismo > 40 g/dia de álcool, presença de síndromes genéticas associadas com a obesidade; Síndrome de Cushing (quando do ponto de vista clínico houver sinais da doença, teste de depressão com dexametasona 1mg overnight será realizado, sendo afastada a síndrome de Cushing endógena quando níveis de cortisol forem menores que 1 micrograma/dL); hipotireoidismo; insuficiência renal ou hepática; neoplasias; infecção por HIV; uso de corticosteróides e mulheres no climatério em uso de reposição estrogênica. Foram incluídas no estudo as mulheres que satisfizerem os critérios de inclusão e concordarem em participar do estudo após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. As mulheres estudadas foram selecionadas entre os indivíduos na fila de espera do Sistema Único de Saúde (SUS), da Clínica Bariátrica - ICE (International Center of Excellence for Bariatric Surgery), vinculada ao Hospital dos Fornecedores de Cana de Piracicaba, na cidade Piracicaba – SP. Como grupo controle, foram recrutadas 300 mulheres saudáveis (Anexo V) da população das cidades de Botucatu e Piracicaba – SP, com IMC entre 18,5 e 24,4 kg/m² (eutróficas). Como critérios de inclusão no grupo, foram consideradas mulheres sem histórico familiar de obesidade mórbida; sem prática de exercícios físicos extenuantes, além dos critérios utilizados para exclusão no grupo de pacientes obesas.

Coleta de material biológico

Todas as mulheres que participaram do estudo foram esclarecidas quanto aos objetivos e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo II - Grupo Controle; Anexo III - Pacientes). As mulheres obesas autorizaram a utilização de parte do material biológico (sangue periférico) obtido por ocasião da entrevista para participação no Projeto de Pesquisa intitulado “Alterações Genéticas Relacionadas à Obesidade: danos no DNA e Perfil de Expressão e Polimorfismos Gênicos” (Protocolo CEP 3361-2009).

Das pacientes obesas, a amostra de 5 mL de sangue periférico foi coletada pelo menos um mês antes da cirurgia bariátrica para evitar a interferência do estresse pré-cirúrgico sobre os níveis de danos no DNA. A coleta de sangue, tanto das pacientes como das voluntárias do grupo controle, foi realizada por profissional habilitado, utilizando material descartável.

Extração de linfócitos

Para avaliação dos níveis de danos no DNA, foi realizado o isolamento de linfócitos do sangue periférico utilizando Ficoll-Paque® (Amersham Biosciences) e centrifugação. As amostras de sangue (3 ml) foram colocadas em tubos contendo 3 ml de meio RPMI 1640 e posteriormente colocadas, cuidadosamente, sobre 3 ml de Ficoll ®. Após centrifugação a 2500 rpm por 30 minutos, a 10°C, a camada de linfócitos foi removida e misturada a 3 ml de RPMI 1640 e novamente centrifugada a 1500 rpm durante 15 minutos. Após esse procedimento o sobrenadante foi descartado e os linfócitos ressuspensos para serem utilizados para a avaliação de danos no DNA pelo teste do cometa.

Teste do cometa

Para a realização do teste do cometa (*SCGE – Single Cell Gel Eletrophoresis*), lâminas limpas foram brevemente mergulhadas em um recipiente contendo agarose de ponto de fusão normal (Invitrogen) diluída em tampão de PBS (livre de Ca^{++} e Mg^{++}) a 1,5% (300 mg/20ml). Após esse procedimento as lâminas ficaram à temperatura ambiente para a secagem. No dia seguinte, alíquota de 10 μl de linfócitos foi adicionada a 120 μl de agarose de baixo ponto de fusão, diluída em tampão de PBS (livre de Ca^{++} e Mg^{++}) a 0,5% (100 mg/20 ml). Essa suspensão foi colocada sobre duas lâminas previamente preparadas e identificadas e, em seguida, foram cobertas com lamínula (24 x 60 mm) e colocadas a 4°C, durante 10 minutos, para solidificação da agarose. Após esse período as lamínulas foram removidas e as lâminas colocadas em recipientes contendo solução de lise gelada e recém preparada (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, Triton X-100 a 1% e DMSO a 10% com pH 10), onde permaneceram por um período de 24 horas, a 4°C, protegidas da luz.

A fim de aumentar a especificidade do teste para a detecção de danos oxidativos no DNA duas lâminas por indivíduo foram tratadas com as enzimas endonuclease III (ENDO III) e formamidopirimidina-DNA glicosilase (FPG) que permitem a detecção, respectivamente, de pirimidinas e purinas oxidadas (Dusinska & Collins 2008). Para isso, após a lise das células, as lâminas foram colocadas em recipiente contendo PBS (livre de Ca^{++} e Mg^{++}) durante 5 minutos e posteriormente transferidas para recipiente contendo tampão *Flare* 1x (Hepes 40mM, KCl 0,1M, BSA - *bovine serum albumine* - 0,2mg/ml e EDTA 0,5mM, com pH 8), por 5 minutos. Esse procedimento foi repetido 3 vezes para assegurar a preparação das lâminas para o tratamento enzimático. Após terem sido colocadas em câmara úmida, as lâminas foram tratadas com 50 μl do tampão de reação das enzimas (950 μl de H_2O

milique, 40 µl de Flare 10x e 10 µl de BSA; controle), ou com 50 µl de endo III (diluição 1:1000), ou 50 µl de FPG (diluição 1:1000), cobertas com lamínula e incubadas por 45 minutos a 37°C. Em seguida, as lâminas foram colocadas em geladeira por 10 minutos para solidificação da agarose. Após esse período, as lamínulas foram cuidadosamente removidas e as lâminas transferidas para cuba de eletroforese preenchida com tampão alcalino gelado e recém preparado (1mM EDTA e 300 mM NaOH, com pH>13. Após período de 40 minutos para a desespiralização do DNA, a eletroforese foi conduzida a 25 V e 300 mA por 30 minutos. Finalizada a eletroforese, as lâminas foram colocadas durante 15 minutos em solução de neutralização (0,4 M de Tris, com pH 7,5), fixadas com etanol 100% e deixadas a temperatura ambiente para secagem.

No momento da análise, as lâminas foram coradas com 70 µl de solução de Syber Gold – Invitrogen/USA (2:10000), cobertas com lamínula e os nucleóides visualizados em microscópio de fluorescência (aumento de 400X) acoplado a sistema de análise de imagem (*Comet Assay II - Perceptive Instruments, UK*). Foram analisados 50 nucleóides por lâmina (Figura 1) e como parâmetro para avaliação dos níveis de danos no DNA foi considerado o *tail intensity* (intensidade de DNA na cauda). O teste foi realizado em duplicata, com lâminas codificadas e analisadas em teste cego.

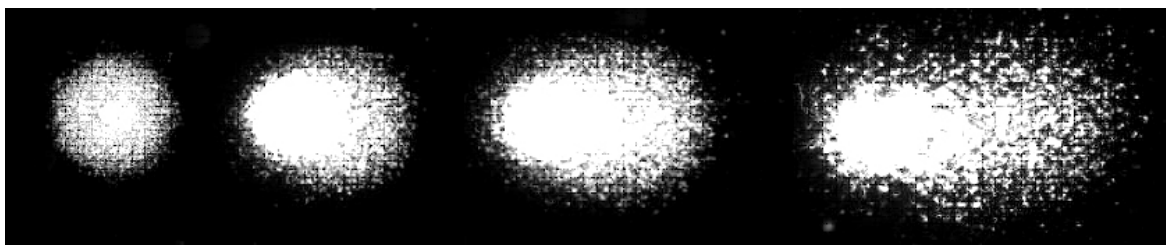


Figura 1. Nucleóides de linfócitos do sangue periférico após lise e coloração com Syber Gold. Imagens obtidas pelo software Comet Assay IV (Perceptive Instruments), Aumento de 400x.

Genotipagem

Para a extração de DNA foi utilizado o kit *Illustra Genomic Prep Blood DNA Isolation* (Amersham Pharmacia Biotech Inc, USA), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. Os DNAs extraídos foram mantidos a -80° C até o momento da genotipagem. As análises para a identificação dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) do gene *FTO* (rs9939609) e do gene *APM1*: 45T/G (rs2241766) (Figura 2), foram realizadas utilizando o ensaio de genotipagem *TaqMan* (Applied Biosystems) segundo instruções do fabricante. Para a reação da PCR (Polymerase Chain Reaction) foram utilizadas alíquotas de 10 µl sendo 3 µl de DNA, 1,75 µl de H₂O ultrapura autoclavada, 5 µl de master mix (TaqMan® SNP Genotyping Master Mix – Applied Biosystems/USA) e 0,25 µl de *primers* (TaqMan® SNP Genotyping Assays – Applied Biosystems/USA). As amostras de DNA foram amplificadas por meio da reação em cadeia da polimerase em tempo real (*ABI 7500 fast Applied Biosystems*). A reação da PCR foi conduzida em 40 ciclos, sendo: 60°C durante 1 minuto, 95°C durante 10 minutos, 95°C durante 5 segundos, 60°C durante 1 minuto e mais 60°C durante 1 minuto. Para avaliar a reprodutibilidade da genotipagem, uma seleção aleatória de 10% das amostras foram novamente genotipada com concordância de 100%.



Figura 2. Polimorfismos de base única (SNPs - *Single Nucleotide Polymorphism*), dos genes *FTO* (rs9939609) e *APM1*: 45T/G (rs2241766).

Análise estatística

Inicialmente, foi verificado se a distribuição dos dados utilizados para o teste do cometa seguia padrão de distribuição normal, a fim de verificar a necessidade de transformação dos dados. Assim, foi realizada uma análise seguindo o modelo linear generalizado, utilizando a distribuição gama para se obter a normalização necessária. Para isso, o procedimento utilizado foi o GENMOD do programa *SAS for Windows* v.9.2. Além disso, foi utilizado o Test t de *Student*, e Anova seguido de Tukey para avaliação dos dados demográficos, e o teste do qui-quadrado para comparação das proporções gênicas.

Resultados

1. Caracterização das pacientes obesas e do grupo controle

A Tabela 1 apresenta os dados referentes à caracterização das amostras populacionais (grupo controle e grupo de mulheres com obesidade mórbida, em lista de espera para a realização de cirurgia bariátrica), com as médias de idade, peso, altura e Índice de Massa Corporal (IMC). Os resultados mostraram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) entre os grupos, para todos os parâmetros avaliados.

Tabela 1. Características demográficas dos grupos populacionais amostradas

Grupo	Idade	Peso (Kg)	Altura (m)	Imc (Kg/m²)
Controle (n = 300)	27,93 ± 5,89	59,20 ± 6,71	1,64 ± 0,06 [#]	21,96 ± 1,85
Obeso (n = 300)	33,41 ± 6,51 [#]	119,05 ± 15,84 [#]	1,61 ± 0,06	45,69 ± 5,80 [#]

IMC: Índice de Massa Corporal. Os valores são expressos em média e desvio padrão; [#] p<0,01.

2. Lesões no DNA detectadas pelo teste do cometa

Os dados apresentados na Tabela 2 mostram que as pacientes obesas apresentaram maior quantidade de quebras de fitas simples, duplas e sítios álcali-lábeis no DNA do que as mulheres do grupo controle (p<0,01). Resultados similares foram encontrados quanto aos danos oxidativos em base púricas e pirimídicas do DNA (p<0,01).

Tabela 2. Níveis de danos no DNA (*tail intensity*) detectados pelo teste do cometa no grupo de mulheres obesas e controle

GRUPO	DANOS NO DNA¹	DANOS OXIDATIVOS EM PURINAS	DANOS OXIDATIVOS EM PIRIMIDINAS
Controle (n = 70)	16,94 ± 23,51	33,29 ± 33,46	29,79 ± 29,81
Obeso (n = 70)	28,96 ± 33,12 [#]	46,45 ± 37,06 [#]	44,74 ± 35,45 [#]

¹ Quebras de fitas simples, duplas e sítios álcali-lábeis no DNA. Os valores são expressos em média e desvio padrão. #: p<0,01 - diferença significativa entre os grupos (colunas).

3. Frequências genotípicas e alélicas dos genes *FTO* e *APM1*

As frequências genotípicas e alélicas do gene *FTO* são apresentadas na Tabela 3. Ambas as populações estudadas encontravam-se em Equilíbrio de Hardy–Weinberg. A avaliação da frequência genotípica mostrou que o genótipo AA foi mais frequente nas pacientes obesas do que no grupo controle. De maneira oposta, o genótipo TT foi menos frequente no grupo de pacientes obesas que no controle. Quanto à frequência alélica, no grupo de mulheres obesas observou-se maior frequência do alelo A; inversamente, no grupo controle o alelo T foi o mais frequente.

Tabela 3. Distribuição genotípica e alélica (polimorfismo de base única rs 9939609) para o gene *FTO* em mulheres obesas e eutróficas (controle)

	CONTROLE	OBESO
Frequência Genotípica		
TT	0,40 ^a	0,30 ^{A#}
AT	0,50 ^b	0,47 ^B
AA	0,10 ^c	0,23 ^{A#}
Frequência Alélica		
T	0,64 ^{a#}	0,53 ^A
A	0,36 ^b	0,46 ^{B#}

Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,01$) dentro do mesmo grupo (coluna); # $p < 0,01$ - diferença significativa entre os grupos (controle x obeso).

A Tabela 4 apresenta as frequências genotípicas e alélicas do gene *APM1*. As populações estudadas estavam em Equilíbrio de Hardy–Weinberg também para este gene. A avaliação da frequência genotípica mostra que o genótipo TT foi o mais frequente em ambos os grupos. As frequências dos alelos T e G foram estatisticamente diferentes ($p < 0,01$) dentro de cada grupo (o alelo T foi o mais frequente), mas não entre os grupos controle e de obesas

Tabela 4. Distribuição genotípica e alélica (polimorfismo de base única rs 9939609) para o gene *APM1* em mulheres obesas e eutróficas (controle)

	Controle	Obeso
Frequência Genotípica		
TT	0,69 ^a	0,75 ^A
TG + GG	0,31 ^b	0,25 ^B
Frequência Alélica		
T	0,83 ^a	0,87 ^A
G	0,17 ^b	0,13 ^B

Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,01$) dentro do mesmo grupo; #: $p < 0,01$ - diferença significativa entre os grupos.

4. Índice de Massa Corporal (IMC) de acordo com as variantes dos genes *FTO* e *APM1*

A Tabela 5 mostra os dados referentes ao IMC das amostras populacionais distribuídas de acordo com as variantes do gene *FTO* (AA, AT ou TT). Os resultados mostraram diferença significativa entre os grupos controle e de pacientes obesas para todos os genótipos. Além disso, no grupo de mulheres obesas o IMC foi significativamente maior naquelas com a variante AA do gene *FTO*.

Tabela 5. Índice de Massa Corporal de pacientes obesas e do grupo controle de acordo com as variantes do gene *FTO*

	AA	AT	TT
Controle	21,73 ± 2,11 ^a	21,94 ± 1,81 ^a	21,75 ± 1,85 ^a
	(n= 25)	(n= 114)	(n= 91)
Obeso	48,11 ± 7,82 ^{A#}	45,03 ± 5,36 ^{B#}	45,41 ± 5,67 ^{B#}
	(n= 68)	(n= 142)	(n= 90)

Os valores são expressos em média e desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,01$) dentro do mesmo grupo (linhas); #: $p < 0,01$ - diferença significativa entre os grupos (colunas).

A Tabela 6 apresenta os dados referentes ao IMC das amostras populacionais distribuídas de acordo com as variantes do gene *APM1*. Devido à baixa frequência do alelo G, os genótipos TG e GG foram agrupados. Os resultados mostraram diferença significativa ($p < 0,01$) entre as mulheres obesas e as controle para os dois grupos genotípicos. Não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os genótipos dentro de um mesmo grupo populacional.

Tabela 6. Índice de Massa Corporal de pacientes obesas e do grupo controle de acordo com as variantes do gene *APM1*

	<i>TT</i>	<i>TG + GG</i>
Controle	21,95 ± 1,77 (n= 208)	21,87 ± 2,0 (n= 95)
Obeso	45,63 ± 5,43 [#] (n= 226)	45,91 ± 6,85 [#] (n= 74)

Os valores são expressos em média e desvio padrão; #: $p < 0,01$ - diferença significativa entre os grupos (colunas).

5. Lesões no DNA detectadas pelo teste do cometa nos grupos populacionais distribuídos de acordo com as variantes do gene *FTO* e *APM1*

Para a avaliação do nível de lesões genotóxicas, foram selecionados aleatoriamente de cada grupo, no máximo 30 indivíduos com cada uma das variantes do gene *FTO*. A média de idade não diferia entre os grupos. Os dados da Tabela 7 mostram que as pacientes obesas apresentaram maior quantidade de danos no DNA que as mulheres do grupo controle, para todos os genótipos e todos os tipos de danos avaliados (quebras de fita simples e dupla, sítios álcali-lábeis e danos oxidativos em purinas e pirimidinas). Ainda no grupo de obesas, todos os

tipos de danos foram significativamente mais frequentes naquelas com o genótipo AA, seguido pelas de genótipo AT. No grupo controle, com exceção dos danos oxidativos nas bases púricas do DNA, os demais tipos de lesões genotóxicas foram também mais frequentes nas mulheres com o genótipo AA.

Tabela 7. Níveis de danos no DNA (*tail intensity*) detectados pelo teste do cometa e apresentados de acordo com as variantes do gene *FTO*

<i>Genótipo</i>	<i>Grupo</i>	<i>Danos no DNA¹</i>	<i>Danos oxidativos em purinas</i>	<i>Danos oxidativos em pirimidinas</i>
TT	Controle (n=30)	14,5 ± 22,84 ^a	27,8 ± 33,25 ^a	22,32 ± 27,54 ^a
	Obesas (n=30)	27,83 ± 29,45 ^{A**#}	44,88 ± 33,16 ^{A**#}	43,08 ± 33,01 ^{A**#}
AT	Controle (n=30)	14,76 ± 22,21 ^{ab}	26,98 ± 30,85 ^a	23,63 ± 27,48 ^a
	Obesas (n=30)	38,29 ± 34,36 ^{B**#}	49,37 ± 33,88 ^{B**#}	50,07 ± 32,53 ^{B**#}
AA	Controle (n=25)	16,49 ± 18,16 ^{b*}	28,59 ± 25,87 ^a	29,45 ± 25,99 ^{b**}
	Obesas (n=30)	46,41 ± 32,99 ^{C**#}	60,52 ± 31,52 ^{C**#}	61,53 ± 31,18 ^{C**#}

¹ Quebras de fitas simples, duplas e sítios álcali-lábeis no DNA; letras diferentes (minúsculas para o grupo controle e maiúscula para o grupo de obesas) indicam diferença significativa (*p <0,05; ** p <0,01) em relação aos demais genótipos no mesmo grupo (colunas); # p<0,01 - diferença significativa entre o grupo de obesas e o grupo controle.

A Tabela 8 apresenta os níveis de danos no DNA de acordo com as variantes do gene *APM1*. As pacientes obesas apresentaram níveis significativamente maiores de danos no DNA, incluindo as lesões oxidativas em purinas e pirimidinas, que as mulheres do grupo controle. No grupo de obesas, aquelas com o genótipo TG+GG apresentaram níveis mais elevados de danos no DNA, purinas e pirimidinas

oxidadas quando comparados ao TT. Os indivíduos do grupo controle com genótipo TG+GG apresentaram níveis elevados de danos no DNA e pirimidinas oxidadas, quando comparados aos indivíduos com a variante TT.

Tabela 8. Níveis de danos no DNA (tail intensity) detectados pelo teste do cometa e apresentados de acordo com as variantes do gene *APM1*

<i>Genótipo</i>	<i>Grupo</i>	<i>Danos no DNA¹</i>	<i>Danos oxidativos em purinas</i>	<i>Danos oxidativos em pirimidinas</i>
TT	Controle (n=30)	15,48 ± 22,07 ^a	31,49 ± 32,70 ^a	24,63 ± 26,74 ^a
	Obeso (n=30)	29.97 ± 32.8 ^{A#}	41.71 ± 35.41 ^{A**#}	42.29 ± 34.95 ^{A#}
TG+GG	Controle (n=30)	17,76 ± 22,15 ^{b**}	31,49 ± 31,17 ^a	31,24 ± 29,85 ^{b**}
	Obeso (n=30)	37,44 ± 32,12 ^{B#}	55,15 ± 33,59 ^{B**#}	54,07 ± 32,01 ^{B**#}

¹ Quebras de fitas simples, duplas e sítios álcali-lábeis no DNA; letras diferentes (minúsculas para o grupo controle e maiúscula para o grupo de obesas) indicam diferença significativa (**p <0,01) entre os genótipos no mesmo grupo (colunas); #: diferença significativa (**p <0,01) entre o grupo de obesas e o controle.

Discussão

A etiologia da obesidade está associada a uma interação complexa entre genética, dieta, metabolismo e níveis de atividade física (Das, 2001; Friedman, 2004; Lyon & Hirschhorn, 2005). No entanto, a participação de cada um desses fatores no desenvolvimento da obesidade ainda não foi totalmente esclarecida. Portanto, neste estudo propusemos investigar se lesões no DNA são mais frequentes em mulheres obesas e se variantes dos genes *FTO* e *APM1* estão relacionadas à enfermidade e também aos níveis de danos genotóxicos em linfócitos do sangue periférico.

A avaliação dos níveis de lesões genotóxicas revelou que mulheres obesas possuem níveis mais elevados de danos no DNA, incluindo purinas e pirimidinas oxidadas, que a população de mulheres eutróficas. Tal achado poderia ser explicado com base no fato da obesidade ser um estado inflamatório de baixa intensidade (Lopes, 2007) e, portanto, com produção de espécies reativas de oxigênio, as quais sabidamente podem danificar estruturas celulares, proteínas, lipídios e macromoléculas como o DNA (Fernández-Sánchez *et al.*, 2011; Seifried *et al.*, 2007). Recentemente, Oliver *et al.* (2010) observaram que crianças obesas apresentam além do quadro clínico de dislipidemia e metabolismo de glicose alterado, taxas elevadas de biomarcadores relacionados à inflamação e estresse oxidativo. Estudo recente realizado por Scarpato *et al.* (2011) demonstrou níveis elevados de danos cromossômicos (micronúcleos) em linfócitos de crianças obesas ou com sobrepeso. Segundo esses autores, o metabolismo basal aumentado e o processo inflamatório de baixo grau, podem ter amplificado o estresse oxidativo e estimulado a produção de moléculas que comprometeram a integridade do DNA. A associação entre a obesidade e o aumento do estresse oxidativo ocorre devido à presença excessiva de tecido adiposo, uma vez que adipócitos e pré-adipócitos são fontes de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-1 e IL-6.

O outro marcador avaliado no presente estudo mostrou que a variante AA do gene *FTO* foi mais frequente em pacientes obesas, e que por outro lado a variante TT foi menos frequente, do que na população de mulheres eutróficas. Na população de pacientes obesas, a frequência do alelo A foi de 0,46, concordando com relatos anteriores para populações de outros países (Dina *et al.*, 2007; Scott *et al.*, 2007; Wahlen *et al.*, 2007). Estudo realizado na França demonstrou que o alelo A está associado a um risco 30% maior para o desenvolvimento de obesidade (Legry *et al.*, 2009). De fato, Gonzáles-Sanches *et al.* (2009) observaram que o genótipo AA é

significativamente mais frequente em indivíduos obesos do que em indivíduos não-obesos. Em 2007, Andreasen *et al.* avaliando parâmetros metabólicos relacionados à obesidade em uma população da Dinamarca encontraram que a frequência do alelo A era de 41,6%, e que o peso corporal, a circunferência abdominal e a massa de gordura também eram significativamente mais altos em indivíduos com o genótipo AA.

O IMC, utilizado para classificar o nível de obesidade individual, parece estar efetivamente relacionado ao gene *FTO* (Scuteri *et al.*, 2007; Hunt *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2008; Cornes *et al.*, 2009; Legry *et al.*, 2009). Realmente, no presente estudo as pacientes obesas com genótipo AA apresentavam IMC mais elevado. Dados da literatura têm indicado forte ligação entre o gene *FTO* e o comportamento alimentar. Segundo alguns pesquisadores, crianças e adultos com pelo menos um alelo A do gene *FTO* consomem maior quantidade de alimentos com maior nível energético do que jovens com dois alelos TT e, conseqüentemente, apresentam maiores valores de IMC (Speakman *et al.*, 2008; Timpson *et al.*, 2008; Tanofsky-Kraff *et al.*, 2009). Resultado semelhante foi descrito por Mangge *et al.* (2011), quando avaliaram em população de jovens obesos a relação entre *FTO*, parâmetros metabólicos e risco para doenças cardiovasculares. De acordo com esses autores, o genótipo AA, além de mais frequente em indivíduos obesos, está associado a IMCs mais elevados. Maior susceptibilidade ao acúmulo excessivo de gordura corporal e diminuição na percepção da saciedade, também foram detectados em indivíduos caucasianos homozigotos para o alelo A (Lima *et al.*, 2010). Há relatos que mostram que o polimorfismo do gene *FTO* (rs9939609) está também associado a alterações significativas nos níveis plasmáticos de insulina e de resistência à insulina, bem como a maior pressão arterial, uma vez que essas alterações são reflexos de IMCs elevados (Andreasen *et al.*, 2008; Do *et al.*, 2008; Jacobsson *et al.*, 2008).

Levando-se em conta, ainda, as variantes do gene *FTO*, a análise dos danos genotóxicos mostrou que nas pacientes com obesidade mórbida todos os tipos de lesões no DNA foram mais abundantes naquelas com o genótipo AA, seguidas pelas de genótipo AT. De fato, o alelo A teve também relação com os níveis das lesões genotóxicas no grupo controle, pois, com exceção dos danos oxidativos em bases púricas, os demais tipos foram mais frequentes nas mulheres com o genótipo AA. Recentemente, Fisher *et al.*, (2009) mostraram que o alelo A do gene *FTO* (rs9939609) está associado a maiores níveis plasmáticos da proteína C-reativa (relacionada a processos inflamatórios e infecciosos). Portanto, segundo os autores, haveria um aumento no estado inflamatório observado no tecido adiposo com o consequente aumento da inflamação sistêmica. Essa condição de disfunção do tecido adiposo resultaria no aumento da produção de espécies reativas de oxigênio; em disfunção mitocondrial; e elevada taxa de mutagenese. Sabe-se que danos no DNA mitocondrial podem também induzir aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, pois interrompem a fosforilação oxidativa, que por sua vez pode levar à cetose, hiperlipidemia e aumento no armazenamento de gordura, afetando, negativamente, processos como aterosclerose e síndrome metabólica (Croteau *et al.*, 1990; Mercer *et al.*, 2011).

Dentre esses hormônios secretados pelos adipócitos, a adiponectina é uma das mais estudadas, pois desempenha papel importante principalmente na regulação da homeostase do organismo. O gene da adiponectina (*APM1* ou *ADIPOQ*) contém 3 exons e está localizado no cromossomo 3q27. O polimorfismo de uma das regiões desse gene (rs2241766) foi analisado em nosso estudo e os dados mostraram que o alelo T e o genótipo TT foram os mais frequentes em ambos os grupos, e que as frequências alélicas de T e G não diferiram entre as populações de mulheres com obesidade mórbida e eutróficas. Da mesma forma, não houve

associação entre essas variantes gênicas e o IMC. De maneira semelhante, Vendramini *et al.* (2010) observaram em população brasileira de diabéticos de origem japonesa, que a distribuição genotípica do *APM1* T45G foi de 46,5% para o genótipo TT, 47,5% para o TG, e 6% para o GG; e que também não há relação entre esses genótipos e o IMC. Resultados similares foram previamente apresentados por Schaffler *et al.* (2000), quando descreveram a ausência de associação entre o IMC e os polimorfismos desse gene da adiponectina em população da Alemanha, e por Takahashi *et al.* (2000) que demonstraram que a frequência alélica para o gene *APM1* entre pacientes obesos e não-obesos não era diferente. Inversamente, Hu *et al.* (2004) reportaram que a prevalência de obesidade foi menor entre os indivíduos com o alelo G em uma população de mulheres americanas, e Ukkola *et al.* (2003) demonstraram que o alelo G esteve associado a menor circunferência da cintura em mulheres suecas obesas e não obesas. No entanto, estudo realizado em populações da Alemanha mostrou que o alelo G do gene *APM1* esteve relacionado a um maior IMC, mas sem relação com histórico familiar de diabetes (Stumvoll *et al.*, 2002). Além disso, Sabouri *et al.* (2011) encontraram associação positiva entre doença arterial coronariana e o polimorfismo *APM1* T45G, embora o IMC desses pacientes não diferisse entre os genótipos.

Embora não tivéssemos encontrado nenhuma relação entre as variantes do gene *APM1* e a presença de obesidade, observamos associação entre os genótipos TG e GG e os níveis de lesões genotóxicas. Ou seja, tanto as mulheres obesas como as eutróficas com pelo menos uma cópia do alelo G apresentaram maiores quantidades de danos no DNA. Estudos anteriores mostraram que o alelo G do gene *APM1* está também associado a maiores níveis de adiponectina circulante (Menzaghi *et al.*, 2002; Vasseur *et al.*, 2002; Berthier *et al.*, 2005; Heid *et al.*, 2006), muito embora, Al-Daghri *et al.* (2012) não tivessem observado diferenças nos níveis

desse hormônio entre os indivíduos com os genótipos TT, TG e GG , em população da Arábia Saudita, resultados similares foram observados por Leu *et al.* (2011). De qualquer forma, relatos recentes demonstram que a diminuição da síntese de adiponectina, como observada em pessoas obesas, pode causar a desregulação de processos que inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias, levando, inversamente, à produção de quantidades exacerbadas desses mediadores pró-inflamatórios (Tilg & Moschen, 2006). Sabe-se que o estado inflamatório induz a produção de espécies reativas de oxigênio, que são moléculas altamente reativas com o DNA. Dessa forma, o aumento de lesões genotóxicas visualizado nos indivíduos com o alelo G do gene *APM1* poderia ser explicado pelo aumento dos mediadores pró-inflamatórios.

Concluindo, nossos resultados indicam que a obesidade está relacionada a níveis mais altos de lesões genotóxicas em linfócitos de sangue periférico e que o genótipo AA do gene *FTO*, além de ser mais freqüente em mulheres com obesidade mórbida está associado a maiores níveis de danos no DNA, assim como o alelo G do gene *APM1*. Assim sendo, pode-se sugerir que pacientes com obesidade mórbida apresentam maiores riscos para o desenvolvimento de doenças relacionadas a danos genéticos, e que mulheres com a variante AA do gene *FTO* são mais susceptíveis à obesidade.

Conclusões

Os resultados deste estudo, permitem as seguintes conclusões:

- mulheres com obesidade mórbida apresentam níveis mais elevados de lesões genotóxicas que as mulheres eutróficas;
- as variantes AA e TT do gene *FTO* (rs9939609) são, respectivamente, mais e menos frequentes em mulheres pacientes obesas que em eutróficas;
- a variante AA do gene *FTO* está relacionada a maior Índice de Massa Corporal;
- a presença de pelo menos um alelo A do gene *FTO* está relacionada a níveis mais elevados de lesões genotóxicas tanto em mulheres obesas como eutróficas;
- não há associação entre as variantes do gene *APM1* (rs2241766) e a obesidade mórbida, sendo o genótipo TT o mais frequente em ambos os grupos;
- não há associação entre as variantes genotípicas de *APM1* e o Índice de Massa Corporal;
- o alelo G (genótipos TG+GG) do gene *APM1* está relacionado a níveis elevados de lesões genotóxicas em mulheres com obesidade mórbida e eutróficas.

Referências Bibliográficas

Al-Daghri NM, Al-Attas OS, Alokail MS, Alkharfy KM, Hussain T, Yakout S, et al. Adiponectin gene polymorphisms (T45G and G276T), adiponectin levels and risk for metabolic diseases in an Arab population. *Gene*. 2012 ;493(1):142-7.

Andreasen CH, Stender-Petersen KL, Mogensen MS, Torekov S., Wegner L, Andersen G, et al. Low Physical Activity Accentuates the Effect of the *FTO* rs9939609 Polymorphism on Body Fat Accumulation. *Diabetes*. 2008;57:95-101.

Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;257:79-83.

Berthier MT, Houde A, Côté M, Paradis AM, Mauriège P, Bergeron J., et al. Impact of adiponectin gene polymorphisms on plasma lipoprotein and adiponectin concentrations of viscerally obese men. *J. Lipid Res*. 2005;46, 237–44.

Bray GA. Obesity: the disease. *J Med Chem*. 2006;49(14):4001-7.

Cornes BK, Lind PA, Medland SE, Montgomery GW, Nyholt DR, Martin NG. Replication of the association of common rs9939609 variant of *FTO* with increased BMI in an Australian adult twin population but no evidence for gene by environment (G x E) interaction. *Int J Obes (Lond)*. 2009;33(1):75-79.

Croteau DL, Stierum RH, Bohr VA. Mitochondrial DNA repair pathways. *Mutation Research* 1999;434:137–48.

Das UN. Is Obesity an Inflammatory Condition Nutrition. 2001; 17:953-66.

Dina C, Meyre D, Gallina S, Durand E, Korner A, Jacobson P, et al. Variation in *FTO* contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat Genet* 2007;39:724–26.

Do R, Bailey SD, Desbiens K, Belisle A, Montpetit A, Bouchard C, et al. Genetic variants of *FTO* influence adiposity, insulin sensitivity, leptin levels and resting metabolic rate in the Quebec Family Study. *Diabetes* 2008;57:1147–50.

Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González A, Esquivel-Chirino C. Inflammation, Oxidative Stress, and Obesity. *Int J Mol Sci*. 2011;12:3117-32.

Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González A, Esquivel-Chirino C. Inflammation, Oxidative Stress, and Obesity. *Int J Mol Sci*. 2011;12:3117-32.

Fisher E, Schulze MB, Stefan N, Haring HU, Doring F, Joost HG, Al-Hasani H, Boeing H & Pischon T. Association of the *FTO* rs9939609 single nucleotide polymorphism with C-reactive protein levels. *Obesity* 2009;17 330–34.

Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, et al. A Common Variant in the *FTO* Gene Is Associated with Body Mass Index and Predisposes to Childhood and Adult Obesity. *Science*. 2007; 316(5826):889-94.

Fredriksson R, Hägglund M, Olszewski PK, Stephansson O, Jacobsson JA, Olszewska AM et al. The obesity gene, *FTO*, is of ancient origin, up-regulated during

- food deprivation and expressed in neurons of feeding-related nuclei of the brain. *Endocrinology* 2008;149(5):2062-71.
- Friedman JM. Modern science versus the stigma of Obesity. *Nat Med.* 2004; 10(6):563-69.
- Gable DR, Stephens JW, Humphries SE, Hurel SJ. The +276G>T adiponectin gene SNP is associated with cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia.* 2005;48(suppl.1):A131.
- González-Sánchez JL, Zabena C, Martínez-Larrad MT, Martínez-Calatrava MJ, Pérez-Barba M, Serrano-Ríos M. Variant rs9939609 in the FTO gene is associated with obesity in an adult population from Spain. *Clin Endocrinol.* 2009; 70:390-93.
- Heid IM, Wagner SA, Gohlke H, Iglseder B, Mueller JC, Cip P, et al. Genetic Architecture of the APM1 Gene and Its Influence on Adiponectin Plasma Levels and Parameters of the Metabolic Syndrome in 1,727 Healthy Caucasians. *Diabetes* 2006; 55(2):375-84.
- Hu FB, Willett WC, Li T, Stampfer MJ, Colditz GA, Manson JE. Adiposity as compared with physical activity in predicting mortality among women. *N Engl J Med.* 2004;351(26):2694-703.
- Hunt SC, Stone S, Xin Y, Scherer CA, Magness CL, Iadonato SP, et al. Association of the FTO gene with BMI. *Obesity.* 2008; 16:902-04.
- Jacobsson JA, Klovins J, Kapa I, Danielsson P, Svensson V, Ridderstråle M, et al. Novel genetic variant in FTO influences insulin levels and insulin resistance in severely obese children and adolescents. *Int J Obes (Lond).* 2008;32(11):1730-5.
- Legry V, Cottel D, Ferrières J, Arveiler D, Andrieux N, Bingham A, et al. Effect of an FTO polymorphism on fat mass, obesity, and type 2 diabetes mellitus in the French MONICA Study. *Metabolism* 2009;58(7):971-75.
- Leu HB, Chung CM, Lin SJ, Jong YS, Pan WH, Chen JW. Adiponectin gene polymorphism is selectively associated with the concomitant presence of metabolic syndrome and essential hypertension. *PLoS One.* 2011;6(5):e19999.
- Lima WA, Glaner MF, Taylor AP. Fenótipo da gordura, fatores associados e o polimorfismo rs9939609 do gene *FTO*. *Rev Bras Cineantrop Desempenho Hum.* 2010; 12(2):164-72.
- Lopes HF. Hipertensão e inflamação: papel da obesidade. *Rev Bras Hipertens.* 2007;14(4):239-44.
- Lyon HN, Hirschhorn JN. Genetics of common forms of obesity: a brief overview. *Am J Clin Nutr.* 2005; 82(suppl):215S–7S.
- Mangge H, Renner W, Almer G, Weghuber D, Möller R, Horejsi R. Rs9939609 Variant of the Fat Mass and Obesity-Associated Gene and Trunk Obesity in Adolescents. *J Obesity.* 2011; 2011:1-4.
- Marti A, Moreno-Aliaga MJ, Hebebrand J, Martínez JA. Genes, lifestyles and obesity. *Int J Obesity.* 2004;28:S29-S36.

- Menzaghi C, Ercolino T, Di Paola R, Berg AH, Warram JH, Scherer PE, et al. A haplotype at the adiponectin locus is associated with obesity and other features of the insulin resistance syndrome. *Diabetes*. 2002;51:2306-12.
- Mercer JR, Cheng K, Figg N, Gorenne I, Mahmoudi M, Griffin J. et al. DNA Damage Links Mitochondrial Dysfunction to Atherosclerosis and the Metabolic Syndrome. *Circulation Research* 2010;107:1021-31.
- Okamoto Y, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y, Libby P. Adiponectin: a key adipocytokine in metabolic syndrome. *Clinical Science*.2006;110:267-78.
- Oliver SR, Rosa JS, Milne GL, Pontello AM, Borntrager HL, Heydari S. Increased Oxidative Stress and Altered Substrate Metabolism in Obese Children. *Int J Pediatr Obesity*. 2010; 5:436-44.
- Qi L, Cho YA. Gene-environment interaction and obesity. *Nutr Rev*. 2008; 66(12):684-94.
- Repetto G, Rizzolli J, Bonatto C. Prevalência, Riscos e Soluções na Obesidade e Sobrepeso: Here, There, and Everywhere. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2003; 47(6):633-35
- Sabouri S, Ghayour-Mobarhan M, Mouhebati M, Hassani M, Kassaeian J, Tatari J et al. Association between 45T/G Polymorphism of Adiponectin Gene and Coronary Artery Disease in an Iranian Population.. *TheScientificWorldJOURNAL* 2011;11:93–101.
- Sahaf B, Heydari K, Herzenberg LA, Herzenberg LA. The extracellular microenvironment plays a key role in regulating the redox status of cell surface proteins in HIV-infected subjects. *Arch Biochem Biophys*. 2005;434:26-32
- Scarpato R, Verola C, Fabiani B, Bianchi V, Saggese G, Federico G. Nuclear damage in peripheral lymphocytes of obese and overweight Italian children as evaluated by the γ -H2AX focus assay and micronucleus test. *FASEB J*. 2011; 25:685-93.
- Schaffler A, Barth N, Palitzsch KD, Drobnik W, Scholmerich J, Schmitz G: Mutation analysis of the human adipocyte-specific apM-1 gene. *Eur J Clin Invest* 2000;30:879–87.
- Scott LJ, Mohlke KL, Bonnycastle LL, Willer CJ, Li Y, Duren WL, Erdos MR, et al. A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science* 2007;316:1341–45.
- Scuteri A, Sanna S, Chen WM, Uda M, Albai G, Strait J, et al. Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesityrelated traits. *PLoS Genet* 2007;3:e115.
- Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutr Biochem*. 2007; 18:567-79.
- Speakman JR, Rance KA, Johnstone AM. Polymorphisms of the FTO gene are associated with variation in energy intake, but not energy expenditure. *Obesity (Silver Spring)*. 2008;16(8):1961-5.

- Stumvoll M, Tschrötter O, Fritsche A, Staiger H, Renn W, Weisser M, et al. Association of the T-G polymorphism in adiponectin (exon 2) with obesity and insulin sensitivity: interaction with family history of type 2 diabetes. *Diabetes* 2002;51:37-41.
- Takahashi M, Arita Y, Yamagata K, Matsukawa Y, Okutomi K, Horie M et al. Genomic structure and mutations in adipose-specific gene, adiponectin. *Int J of Obesity* 2000;24:861-68.
- Tan JT, Dorajoo R, Seielstad M, Sim X, Rick OT, Seng CK, Yin WT, Saw SM, Kai CS, Aung T, Tai ES. FTO variants are associated with obesity in the Chinese and Malay populations in Singapore. *Diabetes* 2008;57(10):2851-7.
- Tanofsky-Kraff M, Han JC, Anandalingam K, Shomaker LB, Columbo KM, et al. The FTO gene rs9939609 obesity-risk allele and loss of control over eating. *Am J Clin Nutr* 2009;90:1483–88.
- Terra X, Auguet T, Porras JA, Quintero Y, Aguilar C, Luna AM et al. Anti-inflammatory Profile of FTO Gene Expression in Adipose Tissues From Morbidly Obese Women. *Cell Physiol Biochem* 2010;26:1041-50.
- Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nature Reviews Immunology* 2006;6, 772-83.
- Timpson NJ, Emmett PM, Frayling TM, Rogers I, Hattersley AT, McCarthy MI & Davey Smith G. The fat mass- and obesity-associated locus and dietary intake in children. *American Journal of Clinical Nutrition* 2008;88 971–78.
- Ukkola O, Ravussin E, Jacobson P, Sjöström L, Bouchard C. Mutations in the adiponectin gene in lean and obese subjects from the Swedish obese subjects cohort. *Metabolism* 2003;52:881–84.
- Vasseur F, Helbecque N, Dina C, Lobbens S, Delannoy V, Gaget S. et al. Single-nucleotide polymorphism haplotypes in the both proximal promoter and exon 3 of the APM1 gene modulate adipocyte-secreted adiponectin hormone levels and contribute to the genetic risk for type 2 diabetes in French Caucasians. *Hum Mol Genet.* 2002;11:2607-14.
- Vendramini MF, Pereira AC, Ferreira SR, Kasamatsu TS, Moisés RS. Association of genetic variants in the adiponectin encoding gene (ADIPOQ) with type 2 diabetes in Japanese Brazilians. *J Diabetes Complications.* 2010;24(2):115-20.
- Wahlen, K., E. Sjölin, J. Hoffstedt. The common rs9939609 gene variant of the fat mass- and obesity-associated gene FTO is related to fat cell lipolysis. *J. Lipid Res.* 2008;49: 607–11.

Ficha de triagem

--

Nome: _____ Sexo: M () F () Data: ____/____/____

Data de nascimento: ____/____/____

Etnia _____ Cor da pele _____

Local do nascimento: _____

Fones para contato _____

2) Problemas de saúde

	Colesterol elevado		Problema cardíaco
	Triglicérides elevado		Problemas com a tireóide
	Ácido úrico alto		Depressão
	Pressão alta		Outros: _____
	Diabetes		

Observações:

3) Medicamentos que está usando:

4) Assinale quais destas doenças seus pais, tios ou irmãos têm:

	Diabetes		Pressão Alta		Obesidade		Problema no coração	
	P	M	P	M	P	M	P	M
Pai/mãe								
Avo(a)								
Tio(a)								
Irmã(o)								

P = paterno M = materno

Peso - Kg	Altura - m	IMC – Kg/m ²

5) História do peso

5.1. Há quanto tempo está com esse peso? _____

5.2. Qual foi o seu maior peso? _____ Há quanto tempo? _____

5.3. Qual foi o seu menor peso? _____ Há quanto tempo? _____

5.4. Faz algum controle alimentar para a manutenção do peso atual ?

() sim () Não

5.5. Faz exercícios físicos para controlar o peso ?

() sim () Não

5.6. Já fez uso de medicamento para controlar o peso?

() sim () Não

6.6. Já fez dieta para controlar peso?

() sim () Não

Linha do tempo:

Como você caracteriza o seu peso corporal nas seguintes fases?

	Baixo peso	Peso normal	Excesso de peso	Obeso	Muito obeso
Bebe					
Criança					
Adolescente					
Jovem					
Adulto					

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**EXPLICAÇÃO PARA O PACIENTE**

A incidência de indivíduos obesos vem aumentando muito. Hoje, a obesidade é considerada pela Organização Mundial da Saúde como uma epidemia mundial. A obesidade é uma desordem que envolve fatores hereditários, ambientais e de estilo de vida, e suas conseqüências não são apenas sociais ou psicológicas, mas estão também associadas à presença de outros problemas de saúde como a hipertensão arterial, diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e vários tipos de câncer. Com isso, a obesidade tornou-se um desafio para a medicina na busca da manutenção da saúde humana, atraindo o interesse de vários pesquisadores que buscam novos métodos terapêuticos e de prevenção. Portanto, este estudo tem por objetivo a avaliação genética de indivíduos obesos, com especial ênfase na identificação de genes ou alterações no material genético que possam favorecer o surgimento da obesidade. Espera-se, com isso, que os resultados tragam informações que venham contribuir para a identificação precoce de indivíduos com maior chance de obesidade e para o estabelecimento de estratégias de prevenção de outros problemas associados a essa disfunção do organismo.

I. DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. **Título do Projeto de Pesquisa:** “ POLIMORFISMOS GÊNICOS E DANOS NO DNA EM INDIVÍDUOS COM OBESIDADE MÓRBIDA ”
2. **Pesquisadores Responsáveis:** Bruno Cesar Ottoboni Luperini e Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori, Departamento de Patologia – Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Botucatu – SP.
3. **Avaliação do Risco da Pesquisa:** Sem risco

4 .Duração Prevista da Participação do Paciente Durante a Coleta e Entrevista: dez minutos.

II. EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO SUJEITO SOBRE A PESQUISA

1. Justificativa e Objetivos da pesquisa: Avaliar se existe componente genético associado à obesidade.

2. Procedimentos utilizados: Serão utilizados material biológico (sangue) e os dados obtidos de questionário aplicado anteriomente, por ocasião da entrevista para participação no Projeto de Pesquisa intitulado “Alterações Genéticas Relacionadas à Obesidade: danos no DNA e Perfil de Expressão e Polimorfismos Gênicos”, sob a responsabilidade de Danielle Cristina de Almeida (Protocolo CEP 3361-2009). Tanto o sangue como os dados pessoais estão armazenados no Laboratório de Toxicogenômica e Nutrigenômica do Depto. de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, conforme autorizado pelo participante da pesquisa.

3. Benefícios que poderão ser obtidos: Não haverá benefício imediato ao participante do estudo. Contudo, os resultados contribuirão para se conhecer os fatores que predisõem à obesidade.

4. Procedimentos vantajosos para o indivíduo: O participante do estudo não terá vantagens imediatas. Sua participação contribuirá para o entendimento das causas da obesidade e, conseqüentemente, para futura prevenção dessa disfunção em outros indivíduos.

III. Identificação do paciente

Eu _____
_____, RG _____, Estado Civil _____,
Idade _____ anos, Residente _____ na
_____, nº _____,
Complemento _____, Bairro _____, Cidade
_____, Telefone (____) _____,

Declaro ter sido esclarecido sobre os seguintes pontos:

1. o presente estudo tem por finalidade avaliar a herança genética de pessoas com obesidade mórbida candidatas à cirurgia bariátrica em comparação a de pessoas que apresentam peso corporal dentro de valores considerados normais;
2. ao participar deste estudo como indivíduo do grupo controle (dentro dos parâmetros considerados normais) estarei contribuindo para esclarecer os resultados da cirurgia sobre o estado nutricional, doenças associadas e qualidade de vida de indivíduos após a cirurgia bariátrica;
3. para a realização desta pesquisa, autorizo os pesquisadores a utilizarem as informações que foram anteriormente coletadas por meio de um questionário e com o meu consentimento para o estudo intitulado “Alterações genéticas relacionadas à obesidade: danos no DNA e perfil de expressão e polimorfismo gênicos”. É do meu conhecimento que esses dados estão arquivados no Laboratório de Toxicogenômica e Nutrigenômica do Depto de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP;
4. que autorizo, também, a utilização de parte da amostra do material biológico que foi também previamente coletada para o estudo citado acima, e que se encontra armazenada no mesmo Laboratório;
5. a minha participação como voluntário deverá ter a duração máxima de 10 minutos, apenas para os esclarecimentos necessários;
6. terei a liberdade de responder ou não a qualquer pergunta;
7. não haverá a necessidade de ser indenizado por parte da equipe responsável por este estudo ou da Instituição (UNESP);
8. meu nome será mantido em sigilo, assegurando, assim, a minha privacidade e se desejar, deverei ser informado sobre os resultados dessa pesquisa;

9. poderei me recusar a participar ou mesmo retirar meu consentimento a qualquer momento da realização dessa pesquisa, sem nenhum prejuízo ou penalização.
10. qualquer dúvida ou solicitação de esclarecimentos, poderei entrar em contato com a equipe científica da Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori, pelo telefone (14) 3811-7210 Ramal 220;
11. para notificação de qualquer situação, relacionada com a ética, que não puder ser resolvida pelos pesquisadores deverei entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, pelo telefone (0XX14) 3811-6143.

Diante dos esclarecimentos prestados, concordo em participar, como voluntária(o), do estudo “ Polimorfismos Gênicos e Danos no DNA em indivíduos com Obesidade Mórbida”.

Botucatu, _____/_____/_____

Assinatura do Voluntário

Assinatura do Pesquisador

Nome do Pesquisador: Bruno Cesar Ottoboni Luperini
Endereço: Rua Humberto Milanesi Nº 159 Pq. Res. Primavera Botucatu - SP
Telefone: (18)81163739 (14) 3811-7210
E-mail: bruno_luperini@yahoo.com.br

Nome da Orientadora: Profª Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori
Endereço: R. Antonio Sabino Santa Rosa, 70, ap 34C – Vila Santana – Botucatu - SP
Telefone: (14) 3811-7263
E-mail: dfavero@fmb.unesp.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

EXPLICAÇÃO PARA O PACIENTE

A incidência de indivíduos obesos vem aumentando muito. Hoje, a obesidade é considerada pela Organização Mundial da Saúde como uma epidemia mundial. A obesidade é uma desordem que envolve fatores hereditários, ambientais e de estilo de vida, e suas conseqüências não são apenas sociais ou psicológicas, mas estão também associadas à presença de outros problemas de saúde como a hipertensão arterial, diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e vários tipos de câncer. Com isso, a obesidade tornou-se um desafio para a medicina na busca da manutenção da saúde humana, atraindo o interesse de vários pesquisadores que buscam novos métodos terapêuticos e de prevenção. Portanto, este estudo tem por objetivo a avaliação genética de indivíduos obesos, com especial ênfase na identificação de genes ou alterações no material genético que possam favorecer o surgimento da obesidade. Espera-se, com isso, que os resultados tragam informações que venham contribuir para a identificação precoce de indivíduos com maior chance de obesidade e para o estabelecimento de estratégias de prevenção de outros problemas associados a essa disfunção do organismo.

I. DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. **Título do Projeto de Pesquisa:** “POLIMORFISMOS GÊNICOS E DANOS NO DNA EM INDIVÍDUOS COM OBESIDADE MÓRBIDA”
2. **Pesquisadores Responsáveis:** Bruno Cesar Ottoboni Luperini e Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori, Departamento de Patologia – Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Botucatu – SP.

3. Avaliação do Risco da Pesquisa: Sem risco

4. Duração Prevista da Participação do Paciente Durante a Coleta e Entrevista:
dez minutos.

II. EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE SOBRE A PESQUISA

1. Justificativa e Objetivos da pesquisa: Avaliar se existe componente genético associado à obesidade.

2. Procedimentos utilizados: Serão utilizados material biológico (sangue) e os dados obtidos de questionário aplicado anteriormente, por ocasião da entrevista para participação no Projeto de Pesquisa intitulado “Alterações Genéticas Relacionadas à Obesidade: danos no DNA e Perfil de Expressão e Polimorfismos Gênicos”, sob a responsabilidade de Danielle Cristina de Almeida (Protocolo CEP 3361-2009). Tanto o sangue como os dados pessoais estão armazenados no Laboratório de Toxicogenômica e Nutrigenômica do Depto. de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, conforme autorizado pelo participante da pesquisa.

3. Benefícios que poderão ser obtidos: Não haverá benefício imediato ao participante do estudo. Contudo, os resultados contribuirão para se conhecer os fatores que predispõem à obesidade.

4. Procedimentos vantajosos para o indivíduo: O participante do estudo não terá vantagens imediatas. Sua participação contribuirá para o entendimento das causas da obesidade e, conseqüentemente, para futura prevenção dessa disfunção em outros indivíduos.

III. Identificação do paciente

Eu _____,
RG _____, Estado Civil _____, Idade _____ anos, Residente
na _____, nº _____,
Complemento _____, Bairro _____,
Cidade _____, Telefone (____) _____,

Declaro ter sido esclarecido sobre os seguintes pontos:

1. este estudo é continuação de outro para o qual cedi amostra de sangue e respondi a um questionário sobre meus hábitos de vida;
2. no momento terei, apenas, que assinar uma autorização para o uso da amostra do meu sangue que restou do estudo anterior e das minhas informações pessoais que foram arquivadas;
3. a minha participação como voluntário deverá ter a duração de, no máximo, 10 minutos para os esclarecimentos;
4. terei a liberdade de responder ou não qualquer pergunta.
5. não haverá necessidade de ser indenizado pela equipe responsável ou pela Instituição (Faculdade de Medicina de Botucatu - FMB) por minha participação nesta pesquisa.
6. fui esclarecido que não receberei qualquer remuneração financeira por participar desta pesquisa.
7. meu nome será mantido em sigilo, assegurando, assim, a minha privacidade. Se desejar, deverei ser informado sobre os resultados da pesquisa e ter acesso, a qualquer momento, às informações sobre procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa, a fim de esclarecer eventuais dúvidas.
8. fui esclarecido sobre a disponibilidade de assistência no HCFMUNESP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.
9. Poderei me recusar a participar ou mesmo retirar meu consentimento a qualquer momento da realização da pesquisa, sem nenhum prejuízo ou penalização.
10. Fui informado que os pesquisadores que participam desta pesquisa estarão à minha disposição para esclarecimento de qualquer questão relacionada ao estudo.

11. Qualquer dúvida ou solicitação de esclarecimentos poderei entrar em contato com a equipe científica da Profª Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori pelo telefone (14) 3811-7210 Ramal 220.

12. Qualquer dúvida adicional, poderei entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, através do fone: (14) 3811-6143."

Diante dos esclarecimentos prestados, concordo em participar, como voluntária(o), do estudo "**Polimorfismos gênicos e danos no DNA em indivíduos com obesidade mórbida**".

Botucatu, ____/____/____

Assinatura do Voluntário

Assinatura do Pesquisador

Nome do Pesquisador: Bruno Cesar Ottoboni Luperini
Endereço: Rua Humberto Milanesi Nº 159 Pq. Res. Primavera Botucatu - SP
Telefone: (18)81163739 (18) 37051775
E-mail: bruno_luperini@yahoo.com.br

Nome da Orientadora: Profª Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori
Endereço: R. Antonio Sabino Santa Rosa, 70, ap 34C – Vila Santana – Botucatu - SP
Telefone: (14) 3811-7263
E-mail: dfavero@fmb.unesp.br

Anexo IV

Código	Idade	Peso (kg)	Altura (m)	IMC (kg/m2)
944	22	125,4	1,66	45,5
4120	34	116,2	1,78	36,7
5897	31	91,1	1,59	36,0
6490	30	130,2	1,59	51,5
7038	33	113,6	1,68	40,2
7153	35	141,2	1,57	57,3
7238	28	125	1,74	41,3
7328	28	108	1,56	44,4
7453	30	139,6	1,68	49,5
7575	45	121,6	1,58	48,7
7592	38	102,2	1,59	40,4
7608	33	130,6	1,61	50,4
7615	27	99,2	1,57	40,2
7632	38	111	1,59	43,9
7642	24	133,6	1,62	50,9
7645	31	96,8	1,56	39,8
7647	23	104,5	1,62	39,8
7649	31	125,6	1,59	49,7
7699	43	93,6	1,56	38,5
7757	25	137,2	1,62	52,3
7767	39	137,8	1,66	50,0
7775	28	118,4	1,57	48,0
7777	34	97	1,58	38,9
7792	26	120,4	1,55	50,1
7889	28	130,6	1,67	46,8
7912	25	135	1,66	49,0
7914	27	112	1,63	42,2
7938	34	104	1,55	43,3
7943	20	149,9	1,81	45,8
7975	23	122,2	1,54	51,5
7997	28	123,6	1,63	46,5
7999	32	111,7	1,58	44,7
8000	34	108,3	1,64	40,3
8001	26	107,2	1,51	47,0
8002	34	113,6	1,57	46,1
8004	34	113,1	1,64	42,1
8006	35	100,2	1,42	49,7
8033	40	110,2	1,63	41,5
8036	28	115,1	1,65	42,3
8042	43	105,9	1,61	40,9
8043	37	102	1,62	38,9
8064	36	115,6	1,64	43,0
8072	36	145,3	1,63	54,7
8104	39	107,2	1,59	42,4

8109	53	79,6	1,42	39,5
8114	32	120,7	1,68	42,8
8118	35	114,2	1,57	46,3
8130	30	120,9	1,58	48,4
8131	45	114,8	1,55	47,8
8133	37	125,2	1,62	47,7
8152	45	160,4	1,63	60,4
8169	40	108,8	1,57	44,1
8170	28	120,9	1,63	45,5
8190	45	132,8	1,64	49,4
8211	42	104,4	1,65	38,3
8217	30	131,6	1,54	55,5
8225	34	103,1	1,64	38,3
8233	34	122,3	1,58	49,0
8264	26	126,6	1,67	45,4
8266	37	106,8	1,61	41,2
8269	40	96	1,6	37,5
8272	36	130,4	1,66	47,3
8276	33	116,6	1,67	41,8
8286	33	136,7	1,58	54,8
8302	36	119,3	1,56	49,0
8312	40	134,6	1,66	48,8
8316	32	129,9	1,6	50,7
8318	41	114,5	1,55	47,7
8322	44	158	1,69	55,3
8333	27	117,1	1,64	43,5
8337	25	120,8	1,68	42,8
8347	30	108,8	1,66	39,5
8370	41	99,6	1,55	41,5
8375	37	171	1,6	66,8
8380	30	109,7	1,57	44,5
8381	41	132,6	1,67	47,5
8394	36	135,7	1,64	50,5
8398	38	134	1,59	53,0
8402	40	128	1,58	51,3
8404	36	114,6	1,62	43,7
8408	38	100,1	1,61	38,6
8419	34	126,1	1,71	43,1
8423	20	120,6	1,63	45,4
8424	38	104,3	1,58	41,8
8427	45	93	1,58	37,3
8436	44	100,6	1,58	40,3
8442	31	131,9	1,67	47,3
8458	33	100	1,54	42,2
8489	31	121,1	1,61	46,7
8493	30	126,6	1,54	53,4
8513	39	116,7	1,66	42,4
8518	27	131,9	1,71	45,1
8521	38	157,8	1,65	58,0

8533	36	107,4	1,55	44,7
8536	42	108,7	1,53	46,4
8541	41	139,9	1,6	54,6
8558	38	108,6	1,54	45,8
8567	45	142,2	1,59	56,2
8569	30	106,2	1,61	41,0
8572	26	115,4	1,64	42,9
8575	36	102	1,62	38,9
8576	35	128	1,68	45,4
8577	42	156	1,47	72,2
8579	42	134,2	1,63	50,5
8594	35	104,4	1,57	42,4
8603	21	141,2	1,62	53,8
8604	27	108	1,62	41,2
8609	42	113,6	1,51	49,8
8610	40	100,3	1,55	41,7
8614	35	115,3	1,54	48,6
8621	32	105,4	1,57	42,8
8622	32	137,4	1,56	56,5
8639	42	128,8	1,53	55,0
8640	30	108	1,63	40,6
8642	40	108,5	1,7	37,5
8644	34	120	1,65	44,1
8645	44	132,3	1,68	46,9
8651	29	129,7	1,69	45,4
8659	43	103,6	1,63	39,0
8663	43	111,6	1,55	46,5
8664	25	123	1,63	46,3
8665	30	107,8	1,57	43,7
8674	38	112,5	1,64	41,8
8675	23	119,6	1,66	43,4
8683	31	125,7	1,69	44,0
8684	28	105,2	1,66	38,2
8690	33	146,5	1,74	48,4
8703	26	113,7	1,65	41,8
8704	29	112,5	1,59	44,5
8706	40	132,5	1,63	49,9
8734	22	149,9	1,59	59,3
8757	38	127,8	1,64	47,5
8758	38	100	1,62	38,1
8762	24	103,8	1,49	46,8
8763	27	104,8	1,58	42,0
8771	31	139,7	1,66	50,7
8773	44	110,4	1,49	49,7
8776	36	125,1	1,63	47,1
8779	26	108	1,6	42,2
8802	45	130,1	1,63	49,0
8804	25	129,6	1,62	49,4
8827	28	131	1,67	47,0

8831	37	94,4	1,53	40,3
8832	33	143,8	1,58	57,6
8840	32	133,8	1,6	52,3
8863	33	137,5	1,65	50,5
8889	29	145,8	1,61	56,2
8890	33	132,6	1,65	48,7
8894	38	95,1	1,62	36,2
8896	28	158,2	1,66	57,4
8899	32	157,5	1,58	63,1
8916	39	134	1,54	56,5
8917	22	91,3	1,58	36,6
8918	31	108,1	1,62	41,2
8958	29	131	1,6	51,2
8969	38	106,5	1,61	41,1
8979	18	114,4	1,62	43,6
8984	28	101,4	1,64	37,7
8985	28	100,4	1,62	38,3
8993	32	121,6	1,57	49,3
8994	32	144	1,62	54,9
9009	24	128,8	1,7	44,6
9010	28	101,6	1,59	40,2
9011	26	135,6	1,64	50,4
9014	42	134,4	1,66	48,8
9017	43	118,2	1,66	42,9
9018	31	103,2	1,58	41,3
9037	42	127,6	1,64	47,4
9048	44	119,6	1,57	48,5
9055	31	146,8	1,66	53,3
9069	34	147,6	1,65	54,2
9152	35	123,5	1,71	42,2
9162	36	126	1,64	46,8
9164	31	112,1	1,59	44,3
9167	20	148,9	1,72	50,3
9171	25	129,9	1,61	50,1
9176	29	103,9	1,6	40,6
9177	39	100	1,66	36,3
9179	36	100,2	1,63	37,7
9190	44	112,3	1,56	46,1
9193	39	115,5	1,75	37,7
9195	44	74	1,45	35,2
9200	28	142,1	1,58	56,9
9201	30	112,8	1,64	41,9
9218	28	116,9	1,63	44,0
9220	40	98,9	1,56	40,6
9226	35	108,1	1,6	42,2
9244	45	103,1	1,54	43,5
9249	33	150,2	1,68	53,2
9252	40	91,6	1,51	40,2
9256	37	139,4	1,56	57,3

9261	35	119,2	1,6	46,6
9262	28	136,4	1,7	47,2
9264	38	108	1,59	42,7
9269	26	108,8	1,62	41,5
9275	30	106,1	1,54	44,7
9283	23	124,2	1,61	47,9
9323	43	126,2	1,58	50,6
9330	35	107	1,62	40,8
9391	40	109,6	1,57	44,5
9416	28	126,2	1,58	50,6
9425	28	116,1	1,65	42,6
9427	43	94,1	1,49	42,4
9435	27	108,1	1,61	41,7
9520	38	125,1	1,63	47,1
9563	39	120,1	1,67	43,1
9588	35	112	1,52	48,5
9590	27	148	1,7	51,2
9598	29	121,1	1,67	43,4
9599	39	116,4	1,61	44,9
9614	30	133,5	1,68	47,3
9615	32	106	1,64	39,4
9616	45	111,9	1,59	44,3
9620	26	110,1	1,64	40,9
9626	34	108,7	1,63	40,9
9628	34	137,2	1,63	51,6
9631	22	128,8	1,63	48,5
9643	35	98,6	1,57	40,0
9645	40	116,6	1,63	43,9
9648	32	133,1	1,58	53,3
9650	33	111,8	1,51	49,0
9652	28	106,8	1,65	39,2
9669	38	122,7	1,71	42,0
9731	43	123,6	1,65	45,4
9734	39	110,8	1,58	44,4
9778	28	128	1,62	48,8
9780	40	134,4	1,62	51,2
9782	35	124,4	1,69	43,6
10030	24	115,2	1,66	41,8
10036	45	104	1,56	42,7
10037	38	119,2	1,62	45,4
10038	29	103	1,59	40,7
10042	23	125,5	1,64	46,7
10046	43	102,8	1,56	42,2
10047	41	99,6	1,69	34,9
10048	38	115,2	1,64	42,8
10094	33	124	1,73	41,4
10100	34	112,7	1,61	43,5
10106	40	100	1,61	38,6
10108	40	123,1	1,63	46,3

10110	41	94,2	1,59	37,3
10112	40	129,5	1,51	56,8
10135	39	116,3	1,59	46,0
10149	27	109,3	1,57	44,3
10170	44	101,5	1,6	39,6
10171	21	135,8	1,72	45,9
10174	26	121,9	1,62	46,4
10176	34	115,6	1,76	37,3
10178	28	136,6	1,61	52,7
10182	31	107,6	1,53	46,0
10198	33	109,9	1,56	45,2
10212	44	116,4	1,57	47,2
10415	38	103	1,57	41,8
10460	28	123,4	1,65	45,3
10570	42	107,2	1,61	41,4
10582	43	105,2	1,63	39,6
10585	45	108,4	1,7	37,5
10586	33	102,4	1,56	42,1
10587	29	124,8	1,73	41,7
10592	20	119,2	1,64	44,3
10594	45	91,6	1,59	36,2
10642	33	107,2	1,64	39,9
10644	40	152,2	1,67	54,6
10645	25	99,6	1,62	38,0
10651	25	116	1,54	48,9
10652	28	102	1,68	36,1
10654	39	96,8	1,6	37,8
10655	34	114	1,59	45,1
10656	41	114,2	1,71	39,1
10657	21	107,4	1,56	44,1
10659	30	115,8	1,66	42,0
10663	36	98,8	1,45	47,0
10664	31	112,6	1,56	46,3
10667	42	116,6	1,64	43,4
10669	42	115	1,63	43,3
10677	36	118,8	1,61	45,8
10680	19	109,8	1,65	40,3
10681	22	112,4	1,67	40,3
10687	41	97	1,51	42,5
10689	45	111,4	1,59	44,1
10690	46	133,2	1,63	50,1
10692	33	138,6	1,61	53,5
10693	33	126,6	1,71	43,3
10694	40	146,8	1,64	54,6
10695	29	149,2	1,59	59,0
10697	26	119,6	1,7	41,4
10702	40	96	1,46	45,0
10703	30	100,6	1,63	37,9
10705	20	123	1,71	42,1

10706	40	96	1,62	36,6
10707	32	131,4	1,6	51,3
10708	24	105	1,63	39,5
10709	37	109,8	1,59	43,4
10715	30	115,2	1,68	40,8
10726	39	120,4	1,69	42,2
10730	28	121,4	1,57	49,3
10732	38	118	1,68	41,8
10738	24	116	1,61	44,8
10739	31	97,8	1,56	40,2

Código	Idade	Peso (kg)	Altura (m)	IMC (kg/m2)
1	28	69	1,72	23,3
2	29	44	1,53	18,8
3	30	61,3	1,67	21,9
4	31	64	1,7	22,1
5	22	48	1,68	17,5
6	38	56	1,58	22,4
7	25	66	1,72	22,4
8	35	58	1,6	22,6
9	45	54	1,65	19,8
10	29	51	1,64	19,0
11	29	56	1,65	20,6
12	22	53	1,67	19,0
13	29	55	1,6	21,4
15	26	67	1,67	24,0
16	29	56,7	1,54	23,9
17	23	59	1,7	20,4
18	25	59	1,63	22,2
19	25	57	1,7	19,7
20	28	55	1,65	20,2
21	29	68	1,66	24,7
22	39	42	1,46	19,7
23	24	59	1,58	23,6
24	38	66,5	1,65	24,4
25	23	63	1,76	20,3
26	22	65,3	1,65	23,9
27	26	65	1,75	21,2
28	31	59	1,68	20,9
29	29	53	1,66	19,4
30	29	69	1,76	22,3
31	25	65	1,7	22,5
32	31	60	1,68	21,3
33	28	62	1,6	24,2
34	23	61	1,67	21,9
35	23	64	1,73	21,4
36	32	62	1,64	23,1
37	29	57	1,61	22,0
38	25	52	1,64	22,6
39	23	57	1,75	18,6
40	20	55	1,6	21,5
41	34	48	1,54	20,9
42	33	62	1,73	23,0
43	33	64	1,68	22,6

44	28	55,5	1,58	22,2
45	32	60	1,58	23,7
47	32	51	1,61	19,7
48	21	52	1,6	20,3
49	33	66	1,67	24,4
50	29	51	1,62	19,5
51	23	55	1,7	19,0
52	30	69	1,71	23,6
53	30	55	1,63	20,8
54	28	58	1,63	21,8
55	24	54	1,68	19,1
56	30	53	1,68	18,7
57	34	57	1,7	19,7
58	26	60	1,62	22,9
59	20	58	1,61	22,3
61	29	69	1,71	23,6
62	29	61	1,66	22,1
63	28	53	1,63	20,0
64	27	62	1,66	22,5
65	25	56	1,64	21,7
67	30	51	1,61	19,6
68	25	60	1,68	21,2
69	28	63	1,67	23,3
70	30	64	1,7	22,1
71	24	63	1,73	21,7
72	41	60	1,65	18,0
73	21	61	1,73	21,0
74	23	63	1,7	21,7
75	24	63	1,73	21,7
76	33	68	1,62	25,9
77	45	56	1,53	23,9
78	45	56	1,54	23,6
79	45	52	1,52	22,5
82	26	69	1,7	23,8
83	26	59	1,66	21,5
84	25	46	1,56	18,6
85	45	46	1,46	21,6
85	45	46	1,46	21,6
88	26	66	1,8	20,4
89	27	53	1,64	19,7
91	24	55	1,62	20,9
92	25	49	1,65	18,0
93	21	68	1,71	23,3
94	28	66	1,65	24,2

95	39	64	1,61	24,9
96	45	73	1,7	24,9
97	45	58	1,61	22,3
98	45	60	1,55	24,9
99	38	61	1,58	24,4
100	41	71	1,68	24,9
102	40	61	1,57	24,7
106	34	56,7	1,67	20,3
107	24	57	1,67	20,5
108	28	53	1,58	21,2
150	29	52	1,58	20,8
151	24	57	1,67	20,5
153	24	51	1,66	18,5
154	30	62	1,59	24,6
155	24	58	1,63	21,8
157	30	58	1,6	22,7
158	22	65	1,68	23,0
159	23	55	1,54	23,2
160	26	70	1,71	23,9
161	45	64	1,59	24,9
162	22	78	1,8	24,1
163	24	62	1,65	22,8
163	24	62	1,65	22,8
164	21	65,8	1,7	22,8
165	23	58	1,65	21,3
167	45	65	1,7	23,3
168	30	60	1,7	20,8
168	30	60	1,7	20,8
169	33	61	1,62	23,2
170	22	51	1,6	19,9
171	22	53	1,69	18,6
171	22	53	1,69	18,6
172	26	53	1,67	19,0
173	24	63	1,73	21,0
173	24	63	1,73	21,0
174	28	70	1,73	23,4
175	42	74	1,78	23,4
176	22	73	1,71	25,0
177	22	54,5	1,64	20,3
178	22	60	1,6	23,4
179	29	55	1,62	21,0
180	20	70	1,74	23,1
181	30	62	1,58	24,8
182	26	62	1,64	23,1

183	29	69	1,67	24,7
187	24	49	1,57	19,9
188	27	57	1,53	24,3
189	34	60	1,77	19,2
190	22	49	1,57	19,9
191	26	63	1,72	21,3
192	32	60,5	1,62	23,1
193	26	54	1,59	21,4
193	26	54	1,59	21,4
194	28	54	1,58	21,6
195	26	59	1,69	20,7
196	27	68	1,7	23,5
197	23	64	1,71	21,9
198	26	63	1,65	23,1
199	25	69	1,75	22,5
200	29	63	1,63	23,7
201	27	47	1,56	19,3
202	27	66	1,66	24,0
203	43	56	1,6	21,9
204	31	65	1,72	22,0
205	31	65,5	1,74	21,6
205	31	65,5	1,74	21,6
206	23	56	1,6	21,9
207	20	60	1,61	23,1
208	21	58	1,71	19,8
209	35	65	1,63	24,5
210	25	65	1,64	24,2
211	26	66	1,68	23,4
212	33	61	1,67	21,9
213	28	61	1,7	21,1
214	24	67	1,67	24,0
215	25	57	1,65	20,9
216	28	53	1,62	20,2
216	28	53	1,62	20,2
217	24	47	1,56	19,3
218	25	57	1,67	20,4
219	21	53	1,65	19,5
220	26	62	1,67	22,2
221	26	52	1,6	20,3
222	33	60	1,67	21,5
223	30	58	1,59	22,9
223	29	52	1,57	21,1
224	33	69	1,7	23,9
225	27	57	1,64	21,2

226	25	58	1,58	23,2
227	23	67	1,67	24,0
228	24	45	1,53	19,2
229	30	60	1,6	23,4
230	25	50	1,58	20,0
231	26	60	1,59	23,7
232	37	55	1,63	20,7
233	29	52	1,57	21,1
234	23	54	1,57	21,9
235	24	48	1,55	20,0
236	21	62	1,58	24,8
237	26	58	1,65	21,3
238	24	53	1,6	20,7
239	29	60	1,59	23,7
240	27	47	1,51	20,6
241	30	53	1,53	22,6
242	31	53	1,64	19,7
243	23	55	1,68	19,5
244	25	56	1,55	23,3
245	26	46	1,5	20,4
246	27	55	1,66	20,0
247	22	55	1,7	19,0
249	28	60	1,59	23,7
250	25	64	1,67	22,9
251	22	64	1,73	21,4
252	34	60	1,55	25,0
253	30	55	1,67	19,7
254	26	57	1,56	23,4
255	35	72	1,75	23,5
256	27	58	1,6	22,7
257	28	66	1,73	22,1
258	31	68	1,68	24,1
259	25	52	1,6	20,3
259	25	52	1,6	20,3
260	25	60	1,63	22,6
262	25	66	1,68	23,4
263	24	58	1,67	20,8
264	32	70	1,65	25,7
265	23	53	1,65	19,5
266	33	66	1,71	22,6
267	29	55	1,62	21,0
269	44	59	1,67	21,2
270	26	60	1,64	22,3
271	31	51	1,64	19,0

272	21	61	1,66	22,1
273	26	60	1,62	22,9
274	30	51	1,47	23,6
275	26	63	1,63	23,7
277	29	57	1,63	21,5
279	29	49	1,53	20,9
280	21	45	1,5	20,0
281	21	62	1,65	22,8
282	21	59	1,61	22,8
284	21	67	1,68	23,7
289	23	49	1,58	19,6
290	29	62	1,63	23,3
291	24	59	1,63	22,2
292	25	53	1,63	19,9
294	24	60	1,64	22,3
295	26	49	1,59	19,4
296	28	63	1,61	24,3
297	24	67	1,68	23,7
298	24	60	1,68	21,3
299	39	64	1,61	24,7
300	24	62	1,7	21,5
301	28	50	1,6	19,5
302	27	56	1,57	22,7
303	42	50	1,52	21,6
304	38	56	1,62	21,3
305	27	57	1,73	19,0
307	23	50	1,6	19,5
308	26	66	1,76	21,3
309	24	63	1,7	21,8
310	25	62	1,7	21,5
312	32	65	1,64	24,2
314	31	76	1,76	24,5
315	24	75	1,75	24,5
316	24	54	1,56	22,2
317	22	59	1,61	22,8
337	24	65	1,6	25,4
338	26	54	1,63	20,3
339	31	57	1,63	21,5
340	21	64	1,65	23,5
342	33	79	1,68	28,0
343	21	58	1,54	24,5
344	29	65	1,62	24,8
346	23	58	1,65	21,3
347	45	59	1,58	23,6

