

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

FABIANO HONORATO PEREIRA E SILVA

**EXPRESSÃO DO GENE *VEGFA* EM TECIDO ADIPOSEO
SUBCUTÂNEO E VISCERAL DE MULHERES COM
OBESIDADE GRAU III**

VITÓRIA

2013

FABIANO HONORATO PEREIRA E SILVA

**EXPRESSÃO DO GENE *VEGFA* EM TECIDO ADIPOSEO
SUBCUTÂNEO E VISCERAL DE MULHERES COM
OBESIDADE GRAU III**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Flavia Imbroisi Valle Errera

VITÓRIA

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

"Expressão do gene VEGFA em Tecido Adiposo Subcutâneo e Visceral de
Mulheres com Obesidade"

Fabiano Honorato Pereira e Silva

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção
do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada por:

Prof^ª. Dr^ª. Flavia Imbroisi Valle Errera (UFES)
Orientadora

Prof^ª. Dr^ª. Flavia de Paula (UFES)
Membro Interno

Prof^ª. Dr^ª. Everlayny Fiorot Costalonga (UWV)
Membro Externo

Vitória-ES, 25 de fevereiro de 2013.

Dedico essa dissertação aos perseverantes e corajosos alunos de programas de pós-graduação, mestrandos e doutorandos, de todo o Brasil que, com fé, vão sempre em busca de um sonho.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e a seus membros, por possibilitarem a oportunidade de realização do Mestrado em Biotecnologia.

À Profª Drª Flávia Imbroisi Valle Errera, pela orientação na pesquisa, pelo incentivo constante, pelo aconselhamento em momentos difíceis e por me mostrar os valores de um pesquisador, sempre com muita honestidade, dedicação e determinação.

À Profª Drª Maria Rita dos Santos e Passos Bueno e ao Laboratório de Genética do Desenvolvimento da Universidade de São Paulo, por me receberem prontamente.

Ao Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez e ao Departamento de Ciências Fisiológicas da UFES, pela disponibilização de equipamentos e laboratórios para a pesquisa.

Aos colegas do Laboratório de Genética da EMESCAM e da USP, pela companhia agradável e pelo aprendizado muito mais que científico e em especial à Karine, pela amizade, pelas longas discussões e por me mostrar como funciona de fato a Ciência no Brasil e no Espírito Santo.

Ao Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes (HUCAM), ao Programa de Cirurgia Bariátrica, ao Dr. Gustavo Peixoto e a toda sua equipe por possibilitarem a coleta de material e às pacientes voluntárias da cirurgia bariátrica, pelo consentimento e por se doarem à pesquisa. A Leonardo Costa Pereira e Janine Batista Coimbra pela coleta das amostras de tecidos.

Aos membros da banca de defesa Profª Drª Everlayny Fiorot Costalonga e Profª Drª Flavia de Paula, por aceitarem o convite.

À Beatriz, aos meus amigos e aos meus pais e irmãos pelo apoio e compreensão.

Às agências de apoio e financiamento: CAPES, FAPES, CNPq e FAPESP.

“Se as portas da percepção fossem limpas, tudo apareceria ao homem tal como é:
infinito.”

William Blake

RESUMO

A obesidade é uma doença crônica e multifatorial que resulta de uma interação complexa entre fatores de risco genéticos e ambientais. Apesar de esforços para o desenvolvimento de medidas de prevenção e controle, a prevalência da obesidade continua crescendo em todo o mundo. Essa doença é caracterizada pelo excesso de peso e acúmulo de gordura corporal em depósitos de tecido adiposo subcutâneos (TAS) e viscerais (TAV). O tecido adiposo é altamente vascularizado e possui intensa atividade angiogênica. Para sua expansão é necessário que ocorra angiogênese, que é o desenvolvimento de vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes. O gene *VEGFA* é um dos principais fatores pró-angiogênicos e atua promovendo a vasopermeabilidade, migração e proliferação de células endoteliais. Os objetivos desse trabalho foram verificar se há diferença na expressão de *VEGFA* em TAS e TAV e se a expressão desse gene está associada a parâmetros clínicos e à expressão do gene da adiponectina, uma adipocina anti-inflamatória associada à proteção contra alterações da tolerância à glicose. Foi realizada uma análise da expressão do gene *VEGFA*, por meio da técnica de PCR quantitativa em tempo real, em amostras de TAS e TAV de 33 pacientes do sexo feminino, com obesidade grau III (IMC ≥ 40), sendo que para 25 pacientes a análise pareada para TAS e TAV foi realizada. A amostra total foi dividida em dois grupos: um com alterações na tolerância à glicose (n= 9) e outro sem essas alterações (n=19). Na amostra total, o *VEGFA* foi expresso de forma semelhante nos dois depósitos. No entanto, mulheres com alterações na tolerância à glicose apresentaram expressão reduzida de *VEGFA* no TAV. Além disso, no TAS a idade foi correlacionada negativamente a este gene e no TAV o *VEGFA* foi positivamente associado ao excesso de peso e negativamente associado aos níveis de colesterol total e HDL. Também foram observadas correlações positivas consistentes entre *VEGFA* e adiponectina, tanto no TAS, quanto no TAV. Esses resultados são importantes, pois ajudam a esclarecer o envolvimento e a atividade do *VEGFA* no tecido adiposo.

Palavras-chave: *VEGFA*. Obesidade. Tecido Adiposo. Expressão gênica. Alterações na tolerância à glicose.

ABSTRACT

Obesity is a chronic and multifactorial disease resulting from a complex interaction of genetic and environmental risk. Despite efforts to develop actions to prevent and control, the prevalence of obesity continues to grow around the world. This disease is characterized by excess of body fat accumulation in adipose tissue deposits, subcutaneous (SAT) and visceral (VAT). Adipose tissue is highly vascularized and has intense angiogenic activity. For its expansion is required to occur the development of blood vessels from pre-existing vessels. The *VEGFA* gene is an important pro-angiogenic factor and acts promoting vasopermeability, migration and proliferation of endothelial cells. The objectives of this study were to observe the differences in the expression of *VEGFA* in SAT and VAT. The objectives of this study were to observe the differences in the expression of *VEGFA* in SAT and VAT. In addition, we also analyzed associations with clinical parameters and gene expression of adiponectin, an anti-inflammatory adipokine associated with protection against changes in glucose tolerance. In this study was performed, using the technique of quantitative PCR in real-time, the analysis of *VEGFA* gene expression in SAT and VAT of 33 female patients with morbid obesity (BMI \geq 40). The sample was divided into two groups: a group with abnormal glucose tolerance (n = 9) and a group without these abnormalities (n = 19). In the total sample, the *VEGFA* was expressed similarly in both deposits. However, women with abnormal glucose tolerance had reduced expression of *VEGFA* in VAT. Moreover, in SAT the age was negatively correlated to this gene and in VAT the *VEGFA* gene was positively associated with overweight and negatively associated with total cholesterol and HDL. Furthermore, consistent positive correlations were observed between *VEGFA* and adiponectin, both SAT and in VAT. These results are important because they help to clarify the involvement and activity of *VEGFA* in adipose tissue.

Keywords: *VEGFA*. Obesity. Adipose Tissue. Gene expression. Changes in glucose tolerance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fatores que podem contribuir para o desenvolvimento da obesidade	16
Figura 2 - Distribuição de gordura corporal, andróide (maçã) e ginoide (pêra)	19
Figura 3 - Prevalência da obesidade entre os continentes e os países em diferentes situações econômicas	21
Figura 4 - Prevalência do excesso de peso e obesidade na população adulta brasileira com 20 anos ou mais	22
Figura 5 - Desenvolvimento de adipócitos	27
Figura 6 - Fotomicrografia de tecido adiposo multilocular (a) e tecido adiposo unilocular (b)	28
Figura 7 - Esquema geral dos processos de lipogênese e lipólise	29
Figura 8 - Distribuição corporal do tecido adiposo branco	30
Figura 9 - Deposição de gordura ectópica na obesidade visceral e na obesidade subcutânea	31
Figura 10 - Obesidade e DM2	33
Figura 11 - Expansão e angiogênese do tecido adiposo	34
Figura 12 - Principais membros da família VEGF e suas isoformas	35
Figura 13 - Média de expressão de VEGFA em TAV de NGLY e HGLY	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais métodos para avaliar a obesidade	17
Tabela 2 - Classificação da obesidade em adultos de acordo com o IMC	18
Tabela 3 - Principais citocinas produzidas no tecido adiposo	25
Tabela 4 - Características clínicas das pacientes	41
Tabela 5 - Lista de primers	44
Tabela 6 - Correlação da expressão de VEGFA a dados clínicos	46
Tabela 7 - Correlações de VEGFA com separação em NGLY e HGLY	47

LISTA DE SIGLAS

ADIPOQ	Adiponectina (do inglês <i>Adiponectin</i>)
ATGL	Triacil Glicerol Lipase (do inglês, <i>Adipose Triglyceride Lipase</i>)
ATP	Trifosfato de Adenosina (do inglês <i>Adenosine Triphosphate</i>)
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
cDNA	DNA Complementar (do inglês <i>Complementary DNA</i>)
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COL18A1	Colágeno tipo XVIII, Alfa 1 (do inglês <i>Collagen type XVIII, Alpha 1</i>)
Ct	Ciclo Limite (do inglês <i>Cycle threshold</i>)
DCNT	Doenças Crônicas Não Transmissíveis
DM2	Diabetes Tipo 2
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (do inglês <i>Desoxyribonucleic Acid</i>)
EMESCAM	Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia
FA	Ácidos Graxos (do inglês <i>fatt acid</i>)
FAPES	Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

GAPDH	Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase (do inglês <i>Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase</i>)
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade (do inglês <i>High Density Lipoprotein</i>)
HPRT1	Hipoxantina Fosforribosiltransferase 1 (do inglês <i>Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1</i>)
HSL	Lipase Hormônio Sensível (do inglês <i>Hormone-sensitive Lipase</i>)
HUCAM	Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDF	Federação Internacional do Diabetes (do inglês <i>International Diabetes Federation</i>)
IGT	Intolerância à Glicose (do inglês <i>Impaired Glucose Tolerance</i>)
IL6	Interleucina 6 (do inglês <i>Interleukin 6</i>)
IMC	Índice de Massa Corporal
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade (do inglês <i>Low Density Lipoprotein</i>)
LPL	Lipoproteína Lipase
NS	Não Significativo
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>)

<i>PIGF</i>	Fator de Crescimento Placentário (do inglês <i>Placental Growth Factor</i>)
POF	Pesquisa de Orçamentos Familiares
qPCR	PCR quantitativa (do inglês <i>quantitative PCR</i>)
RCQ	Relação cintura / quadril
RNA	Ácido Ribonucleico (do inglês <i>Ribonucleic Acid</i>)
RNAm	RNA Mensageiro
SD	Desvio Padrão (do inglês <i>Standard Deviation</i>)
SDHA	Complexo Succinato Desidrogenase, Subunidade A (do inglês <i>Succinate Dehydrogenase Complex, Subunit A</i>)
SUS	Sistema Único de Saúde
<i>sVEGFr2</i>	Receptor solúvel de VEGF 2 (do inglês <i>Soluble VEGF Receptor 2</i>)
TAS	Tecido Adiposo Subcutâneo
TAV	Tecido Adiposo Visceral
<i>TCF7L2</i>	Fator de Transcrição 7 - semelhante ao 2 (do inglês <i>Transcription Factor 7 like-2</i>)
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TG	Triglicerídeos
TNFA	Fator de Necrose Tumoral A (do inglês <i>Tumor Necrosis Factor A</i>)

TOTG	Teste Oral de Tolerância à Glicose
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo
USP	Universidade de São Paulo
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (do inglês <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)
VEGFA	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular A (do inglês <i>Vascular Endothelial Growth Factor A</i>)
VEGFB	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular B (do inglês <i>Vascular Endothelial Growth Factor B</i>)
VEGFC	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular C (do inglês <i>Vascular Endothelial Growth Factor C</i>)
VEGFD	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular D (do inglês <i>Vascular Endothelial Growth Factor D</i>)
VEGFE	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular E (do inglês <i>Vascular Endothelial Growth Factor E</i>)
VLDL	Lipoproteína de Muito Baixa Densidade (do inglês <i>Very Low Density Lipoprotein</i>)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 A Obesidade	16
1.2 Epidemiologia e Impacto Socioeconômico da Obesidade	19
1.3 Considerações Genéticas e Moleculares sobre a Obesidade	23
1.4 O Tecido Adiposo	26
1.5 <i>VEGF</i> e Obesidade	33
2 OBJETIVOS	39
2.1 Objetivo Geral	39
2.2 Objetivos Específicos	39
3 METODOLOGIA	40
3.1 Sujeitos e Métodos	40
3.2 Antropometria, Composição Corporal e Parâmetros Bioquímicos	42
3.3 Amostras de Tecido Adiposo, Extração de RNA e Síntese de cDNA	42
3.4 Análise de PCR quantitativa	43
3.5 Análise Estatística	44
4 RESULTADOS	45
4.1 Expressão de <i>VEGFA</i> nos depósitos TAS e TAV	45
4.2 Correlação da expressão de <i>VEGFA</i> com dados clínicos	45
4.3 Correlações entre as expressões de <i>VEGFA</i> e <i>ADIPOQ</i> no Tecido Adiposo	46
4.4 Expressão de <i>VEGFA</i> nos grupos com e sem alterações na tolerância à glicose	46
5 DISCUSSÃO	48
6 CONCLUSÕES	53
7 REFERÊNCIAS	54
8 ANEXOS	65
8.1 Anexo I - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	65
8.2 Anexo II – Modelos de Fichas para Coleta de Dados	66

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença crônica, com prevalência crescente, que requer estratégias eficientes para prevenção e tratamento. Esta doença possui etiologia complexa e sua manifestação depende tanto de fatores genéticos quanto ambientais. Além disso, a obesidade é fator de risco para o desenvolvimento de múltiplas comorbidades, constituindo-se em um grave problema de saúde pública (NIH, 2001; WHO, 2000).

Esta doença é caracterizada pelo acúmulo de gordura em depósitos de tecido adiposo, os quais tem sido foco de pesquisa em estudos da obesidade (WHO, 2000). Esse tecido é altamente vascularizado e sua expansão durante a progressão da doença depende de intensa atividade angiogênica (CAO, 2007). Assim, a análise da expressão de genes relacionados com a angiogênese pode viabilizar a ampliação de conhecimentos sobre os mecanismos envolvidos nas transformações desse tecido.

O principal gene envolvido no processo de angiogênese é o *VEGF*. A expressão desse gene atua diretamente no endotélio vascular, induzindo a vasopermeabilidade, migração e proliferação de células endoteliais, promovendo a vascularização do tecido. Desse modo, é crescente o número de pesquisas indicando que o *VEGF* está relacionado ao desenvolvimento e expansão do tecido adiposo e por esta razão, esta molécula tem sido considerada um novo alvo no tratamento contra a obesidade (CELEC e YOUNEMITSU, 2004; FERRARA, 2004).

Assim, neste trabalho foi realizada uma análise de expressão do gene *VEGFA* em tecido adiposo de mulheres obesas, com e sem alterações na glicemia.

1.1 A Obesidade

Em uma análise mais simplificada pode-se dizer que a obesidade é causada por um desequilíbrio energético gerado entre as calorias consumidas e as calorias gastas pelo organismo. Por exemplo, um aumento exagerado do consumo de alimentos altamente calóricos, sem a intensificação de atividades físicas, pode gerar um balanço energético positivo e conseqüente produção de gordura e ganho de peso. Esse desequilíbrio energético pode ocorrer em virtude de múltiplos fatores, tais como: sedentarismo, má alimentação, fisiopatologias, desordens emocionais, fatores genéticos e sócio-econômicos (Figura 1). Assim, essa doença é de natureza complexa e multifatorial na maioria dos casos (NIH, 2001).



Figura 1: Fatores que podem contribuir para o desenvolvimento da obesidade. Fonte: Próprio autor.

A obesidade é definida como o acúmulo excessivo ou anormal de gordura nos depósitos de tecido adiposo (WHO, 2000). Este excesso pode ser estimado e avaliado por meio de diferentes métodos, dentre os quais destacam-se as medidas Índice de Massa Corporal (IMC), Circunferência Abdominal, Dobras Cutâneas e

Bioimpedância (Tabela 1), além de exames de imagem como Ressonância Magnética Nuclear, Tomografia computadorizada e Ultra-sonografia (KOPELMAN, 2000). Porém, cada um desses métodos possui aplicações e limitações, que devem ser bem avaliadas no processo de identificação da doença.

Tabela 1: Principais métodos para avaliar a obesidade. Fonte: KOPELMAN, 2000 (adaptado).

MÉTODO	DEFINIÇÃO	PRINCIPAIS LIMITAÇÕES
IMC	Peso, em quilogramas, dividido pelo quadrado da altura, em metros.	Este índice não distingue massa gorda e massa magra.
Circunferência Abdominal	Medida, em centímetros, da circunferência abdominal no ponto médio, entre a borda inferior das costelas e a borda superior da pelve.	Apesar de fornecer medidas para avaliar a deposição superior de gordura no corpo, não fornece estimativas precisas de gordura intra-abdominal.
Dobras Cutâneas	Medição com pinça da espessura de dobras cutâneas (em centímetros).	As medições são subjetivas, requerem pinças precisas e não fornecem informações sobre a gordura abdominal e intramuscular.
Bioimpedância	Medição de resistência a uma corrente fraca (impedância), aplicada através de extremidades, que fornece uma estimativa da gordura corporal.	Não gera resultados consideravelmente mais precisos do que simples medidas antropométricas.

O IMC é um método bastante conhecido para identificação do excesso de peso e da obesidade na população. Este método pode ser aplicado da mesma forma entre homens e mulheres e em adultos com qualquer idade (acima dos 20 anos). No entanto, deve ser considerado como um guia geral, uma vez que nem sempre corresponde a quantidades iguais de gordura em indivíduos diferentes. Apesar dessas limitações, o IMC é a técnica mais utilizada para identificação de obesidade em estudos epidemiológicos. Por se basear em medidas antropométricas, este é um método simples e com aplicabilidade ampla. Esse índice é obtido por meio da

divisão entre o peso, em quilogramas, e o quadrado da altura, em metros (kg/m^2). Assim, de acordo com os valores de IMC, a obesidade pode ser classificada de modo que para valores acima de 25 são identificadas diferentes formas de excesso de peso, enquanto que indivíduos com IMC menor que 18.5 são considerados de baixo peso (Tabela 2) (WHO, 2000).

Tabela 2: Classificação da obesidade em adultos de acordo com o IMC. Fonte: WHO, 2000 (adaptado).

CLASSIFICAÇÃO	IMC	RISCO DE COMORBIDADES
Baixo Peso	< 18.5	Baixo (mas com alto risco para outros problemas clínicos)
Varição Normal	18.5 - 24.99	Médio
Excesso de Peso:	\geq 25.0	
Sobrepeso	25.0 - 29.99	Aumentado
Obesidade Grau I	30.0 - 34.99	Moderado
Obesidade Grau II	35.0 - 39.99	Alto
Obesidade Grau III	\geq 40.0	Muito Alto

A distribuição de gordura na região média do corpo também é um dos parâmetros mais importantes para a avaliação da obesidade. De acordo com a relação cintura / quadril (RCQ), indivíduos obesos podem apresentar duas formas corporais diferentes, a androide (também conhecida como “maçã”) e a ginoide (também conhecida como “pêra”) (Figura 2). A forma androide é identificada pela $\text{RCQ} > 1.0$ em homens e $\text{RCQ} > 0.85$ em mulheres, enquanto que a forma ginoide é identificada pela $\text{RCQ} < 1.0$ em homens e $\text{RCQ} < 0.85$ em mulheres. A forma corporal androide apresenta deposição de gordura principalmente ao redor da cintura e na região abdominal superior do corpo. Essa distribuição de gordura, na região central, é mais comum em homens e freqüentemente é associada ao desenvolvimento de comorbidades. O tipo ginoide é geralmente encontrado em mulheres e caracteriza-se pela deposição de gordura em torno dos quadris, coxas e nádegas. Embora exista essa tendência, não há uma regra e tanto homens quanto mulheres podem

apresentar qualquer uma dessas formas de distribuição da gordura corporal. Além disso, nos dois casos pode haver o risco de surgimento de comorbidades (NIH, 1998; WHO, 2000). As comorbidades mais comuns são Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2), Dislipidemia, Hipertensão, outras Doenças Cardiovasculares, doenças osteoarticulares e alguns tipos de Câncer (LAWRENCE e KOPELMAN, 2004). No entanto, essas doenças também são complexas e podem se manifestar independentemente da obesidade, em indivíduos normais ou mesmo de baixo peso.

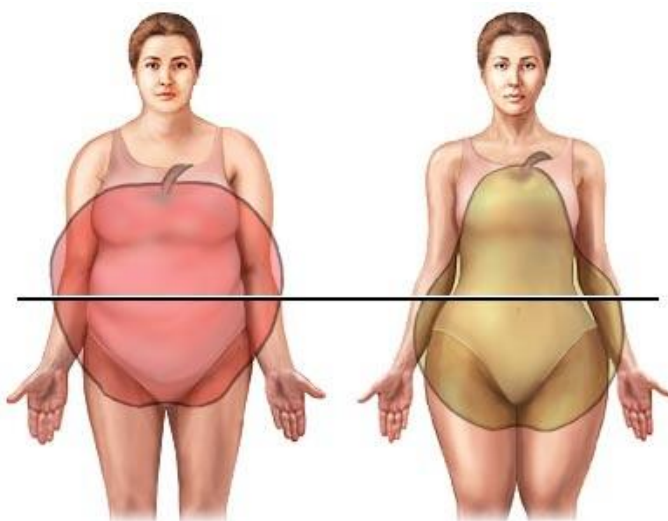


Figura 2: Distribuição de gordura corporal, andróide (maçã) e ginoide (pêra). Fonte: ADAM, 2012 (adaptado).

1.2 Epidemiologia e Impacto Socioeconômico da Obesidade

A maior parte da população mundial vive em países nos quais o excesso de peso causa mais mortes que o baixo peso. Isto é, a obesidade e o sobrepeso paradoxalmente são problemas maiores que a subnutrição e não é raro encontrar localidades onde estes problemas coexistem. Assim, esta doença é classificada

como um dos problemas de saúde mais preocupantes em todo o mundo (WHO, 2012a e 2012b).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) a Obesidade e o sobrepeso são considerados uma epidemia global crescente, que está assumindo proporções cada vez maiores em quase todos os países. Entre os anos de 1980 e 2008 a prevalência mundial dessa doença praticamente dobrou e a obesidade, que afetava 5% dos homens e 8% das mulheres em 1980, alcançou em 2008 a 10% dos homens e 14% das mulheres. Assim, no ano de 2008 aproximadamente 1,5 bilhões de adultos, com 20 anos de idade ou mais, apresentavam algum tipo de excesso de peso, sendo que mais de meio bilhão eram obesos. Ou seja, no geral, pelo menos um em cada dez indivíduos da população mundial adulta estava obeso (WHO, 2012a, 2012b e 2012c).

Essas estatísticas tornam-se ainda mais preocupantes. Pelo menos 2,8 milhões de pessoas morrem a cada ano como resultado do excesso de peso. Além disso, as comorbidades relacionadas à obesidade foram responsáveis em 2008 pela morte de 36 milhões de pessoas. Ou seja, 63% do total de óbitos do mundo foram por doenças que podem ter sido geradas ou agravadas em razão da obesidade (WHO, 2012a e 2012d).

O excesso de peso é bastante prevalente tanto em países de baixa renda quanto em países de média e alta renda. Mas a maior prevalência dessa doença ainda é na região das Américas (62% com sobrepeso e 26% com obesidade) e a menor, na região do Sudeste da Ásia (14% com sobrepeso e 3% com obesidade) (WHO, 2012d).

Além disso, é possível observar que existem diferenças significativas na prevalência de obesidade entre homens e mulheres. As regiões da Europa, do Leste Mediterrâneo e das Américas apresentam mais de 50% de mulheres com excesso de peso. Para essas três regiões, cerca de metade das mulheres acima do peso são obesas (23% na Europa, 24% no Leste Mediterrâneo, 29% nas Américas) e em todas as regiões o sexo feminino apresenta prevalência de obesidade maior que o sexo masculino. Entre os países com diferentes situações econômicas (classificados

como de renda baixa, média ou alta) a prevalência de obesidade foi considerada maior nas mulheres em todas as categorias, exceto em países com renda alta (Figura 3) (WHO, 2012d).

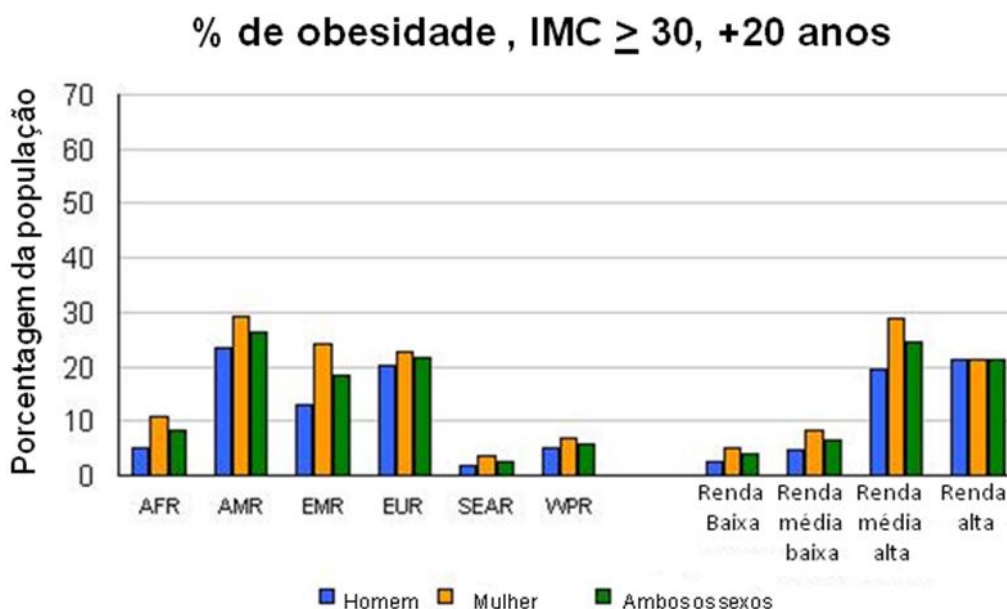


Figura 3: Prevalência da obesidade entre os continentes e os países em diferentes situações econômicas. AFR: Região da África, AMR: Região das Américas, EMR: Região do Leste Mediterrâneo, EUR: Região da Europa, SEAR: Região do Sudeste da Ásia, WPR: Região do Pacífico Ocidental. Fonte: WHO, 2012d (adaptado).

No Brasil, a prevalência de sobrepeso e obesidade acompanha a tendência mundial. A Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF), realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), mostrou que em 2008-2009 mais da metade dos brasileiros apresentavam excesso de peso (IMC \geq 25). A obesidade foi observada em 12,5% dos homens e em 16,9% das mulheres (IBGE, 2010). Essa pesquisa mostrou também um aumento constante de excesso de peso e de obesidade na população brasileira adulta, com 20 anos de idade ou mais, desde 1974-1975 até 2008-2009. A prevalência de obesidade aumentou mais de quatro vezes entre homens (de 2,8% para 12,4%) e em mais de duas vezes entre mulheres (de 8,0% para 16,9%) (Figura 4).

Prevalência do excesso de peso e obesidade na população com 20 anos ou mais de idade, por sexo
Brasil – Período de 1974-75, 1989, 2002-2003 e 2008-2009

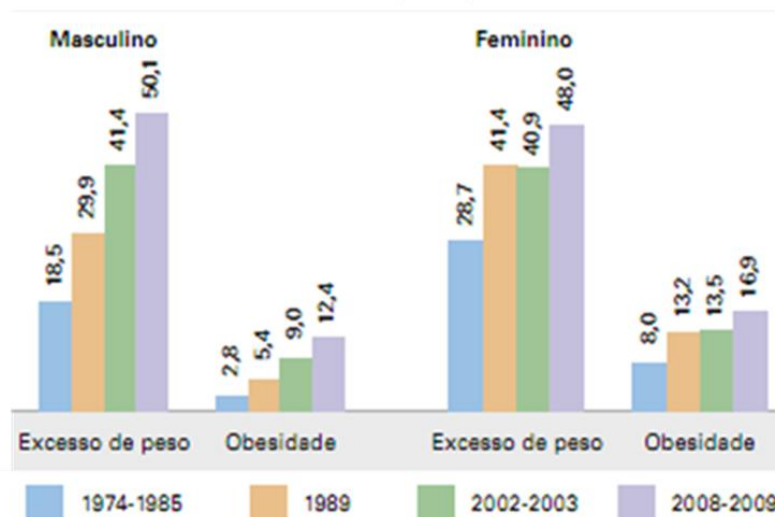


Figura 4: Prevalência do excesso de peso e obesidade na população adulta brasileira com 20 anos ou mais de idade, por sexo, entre os anos de 1974-1975 a 2008-2009. Fonte: IBGE, 2010.

A região Sul foi a que revelou os maiores índices de obesidade, com prevalência de 19,6% entre mulheres e 16,9% entre homens, seguida pela região Sudeste, com prevalência de 17,4% no sexo feminino e 13% no sexo masculino (IBGE, 2010).

A frequência de pessoas com excesso de peso no país aumentou em mais de um ponto percentual ao ano. Esse aumento acelerado é preocupante e a OMS estima que em 2015, no Brasil, a prevalência da obesidade alcançará cerca de 40% das mulheres e 21,6% dos homens com idade superior a 30 anos (WHO, 2011).

Segundo o Ministério da Saúde (2003), no Espírito Santo o quadro geral da obesidade se assemelha ao restante do país. Nos últimos dados disponíveis, de 2002-2003, a prevalência de sobrepeso na população de Vitória era de 29,2% e de obesidade 8,2%. Além disso, o excesso de peso alcançou 18% dos indivíduos entre 15 a 24 anos, 43,3% dos indivíduos entre 25 a 49 anos e 46% dos indivíduos com mais de 50 anos de idade.

As complicações ocasionadas pela obesidade podem gerar graves danos à saúde, além de comprometer a produtividade dos indivíduos afetados e a economia do país. No Brasil, a obesidade e suas comorbidades representam grande parcela das despesas com assistência hospitalar no Sistema Único de Saúde (SUS) e no Setor Suplementar. O Ministério da Saúde, no ano de 2005, estimou que cerca de R\$3,8 bilhões foram gastos em cuidados ambulatoriais e R\$3,7 bilhões gastos em internação, totalizando quase R\$7,5 bilhões nesse ano em gastos (MALTA et al., 2006). Isto é, além de contribuir para diminuição da qualidade de vida da população a obesidade gera alto prejuízo econômico e assim torna-se cada vez mais indispensável a busca pelo desenvolvimento de estratégias que visem a diminuir seus impactos sociais e econômicos. Desse modo, a pesquisa em genética da obesidade pode auxiliar no desenvolvimento de medidas mais eficazes contra a doença.

1.3 Considerações Genéticas e Moleculares sobre a Obesidade

Com o avanço da genética e da biologia molecular, a compreensão da influência genética na variação do excesso de peso tem aumentado. Estudos de famílias de gêmeos e de adoção indicam herdabilidade que variam de 20% a mais de 70% para variações no IMC, sugerindo que o excesso de peso está fortemente associado a fatores genéticos (HEDEBRAND e HINNEY, 2009; HERRERA e LINDGREN, 2010)

A forma mais comum de obesidade resulta de interações entre fatores ambientais e genéticos. Esses fatores determinam variações fisiológicas e bioquímicas em resposta à dieta e atividades físicas. Assim, o corpo de cada indivíduo responde de maneira diferente a estímulos relacionados ao consumo e gasto energético, que estão ligados ao desenvolvimento do tecido adiposo (HEDEBRAND e HINNEY, 2009).

De forma geral, há pelo menos três formas de obesidade, classificadas de acordo com a origem em: monogênica, sindrômica e multifatorial, sendo esta última a mais

comum. Isto é, a obesidade comum é geralmente considerada uma desordem poligênica resultante da interação sinérgica entre múltiplos genes. Esses genes interagem de modo que cada um deles contribui moderadamente para um efeito metabólico maior que, em conjunto com fatores ambientais, resultam na obesidade (LOSS e BOUCHARD, 2003).

A identificação e o estudo de genes envolvidos na obesidade podem ser feitos por diferentes abordagens, tais como a estratégia do Gene Candidato (com o estudo de polimorfismos ou PCR quantitativa) e técnicas genômicas como Microarray (LIU et al., 2003). Estudos feitos por meio da estratégia do gene candidato buscam por uma variação genética em um gene que participe na fisiopatologia e que justifique em parte a alteração fenotípica de indivíduos afetados. A maioria dos genes candidatos em estudos da obesidade são genes relacionados à homeostase energética, a aspectos metabólicos do tecido adiposo ou a qualquer alteração que possa induzir a essa doença. Uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares e genéticos envolvidos no desenvolvimento do tecido adiposo e na regulação do peso corporal poderá proporcionar o desenvolvimento de intervenções terapêuticas mais eficientes contra a obesidade.

Muitos genes candidatos que são expressos no tecido adiposo se relacionam diretamente com a regulação endócrina desse tecido. O tecido adiposo é um órgão endócrino ativo e desempenha papel central no metabolismo dos lípidos e da glicose, produzindo grande quantidade de hormônios e citocinas (adipocitocinas) (Tabela 3), envolvidos no desenvolvimento de comorbidades como síndrome metabólica, DM2 e outras doenças vasculares (HAJER, HAEFTEN e VISSEREN, 2008). Além da manutenção do estado nutricional, este tecido também desempenha funções corporais importantes, relacionadas ao comportamento alimentar, ao crescimento e ao metabolismo.

Algumas das moléculas produzidas e secretadas pelo tecido adiposo são importantes para o controle da homeostase calórica do corpo e para o desenvolvimento do próprio tecido. Compreender as relações complexas que se estabelecem entre essas moléculas e vias metabólicas é objetivo fundamental de pesquisas que visam o tratamento da obesidade. Nesse sentido, a análise da

expressão de genes no tecido adiposo é indispensável para o embasamento de pesquisas em genética da obesidade.

Tabela 3. Principais citocinas produzidas no tecido adiposo (adipocitocinas). Fonte: HAJER, HAEFTEN e VISSEREN, 2008 (adaptado).

ADIPOCITOCINA	NOME COMPLETO	EFEITOS
Leptina	Leptina	Ingestão de alimentos
Adiponectina	Adiponectina	Resistência à insulina, Inflamação
Resistina	Resistina	Resistência à insulina, Inflamação
Visfatina	Visfatina	Resistência à insulina
Omentina	Omentina	Resistência à insulina
Vaspin	Serpina derivada do tecido adiposo visceral	Resistência à insulina
Apelina	Apelina	Vasodilatação
CETP	Proteína de transferência de colesterol éster	Metabolismo de lipídeos
LPL	Lipoproteína lipase	Metabolismo de lipídeos
HSL	Lipase hormônio-sensível	Metabolismo de lipídeos
Perilipina	Perilipina	Metabolismo de lipídeos
ASP	Proteína estimulante de acilação	Metabolismo de lipídeos
AT II	Angiotensina II	Pressão sanguínea
ACE	Enzima conversora de angiotensina	Pressão sanguínea
AGT	Angiotensinogênio sanguíneo	Pressão sanguínea
TNFA	Fator de necrose tumoral A	Inflamação
IL-6	Interleucina 6	Inflamação
CRP	Proteína C reativa	Inflamação

A Adiponectina é uma importante citocina secretada exclusivamente pelo tecido adiposo e sua produção está negativamente correlacionada à obesidade (KIESS et al., 2008; KERN et al., 2003; SILHA et al., 2003). Esta molécula participa da regulação e homeostase energética, atuando sobre o metabolismo dos lipídeos e da glicose. Embora tenha sido extensivamente estudada, o envolvimento dessa molécula em processos como a angiogênese e alterações na tolerância à glicose ainda permanece controverso (OKAMOTO et al., 2002; UKKOLA e SANTANIEMI, 2002; YAMAUCHI et al., 2001; SUN et al., 2011)

No presente estudo a expressão do gene da adiponectina (*ADIPOQ*) também foi verificada (em colaboração com outros pesquisadores do grupo de pesquisa). Assim, esses dados puderam ser correlacionados à expressão do gene *VEGFA*.

1.4 O Tecido Adiposo

O tecido adiposo, um tipo especializado de tecido conjuntivo, é importante na manutenção da homeostase calórica do organismo, sendo considerado o maior reservatório de energia do organismo e capaz de armazenar de maneira eficiente o excesso de calorias na forma de lipídeos. Desse modo, o tecido adiposo é responsável por suprir as demandas de energia do corpo sempre que for necessário. No entanto, além de reserva energética, o tecido adiposo possui ainda outras funções importantes, tais como modelar a superfície do corpo, absorver choques mecânicos, preencher espaços entre órgãos, promover isolamento térmico, participar da imunomodulação, sintetizar e secretar citocinas e, em alguns casos, participar da termorregulação (WRONSKA e KMIEC, 2012; ROSS e PAWLINA, 2008).

Os adipócitos são as células principais do tecido adiposo. Essas células armazenam calorias na forma de triglicérides e podem ser organizadas em dois tipos diferentes, formando adipócitos uniloculares, ou brancos, e adipócitos multiloculares, ou marrons. Assim como todas as células do tecido conjuntivo, os adipócitos são derivados de células-tronco mesenquimais multipotentes, as quais dão origem aos pré-adipócitos (HENRIKSON, KAYE e MAZURKIEWICZ, 1997; ROSS e PAWLINA, 2008).

A diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos maduros é denominada adipogênese. Durante esse processo, numerosas gotas lipídicas começam a se acumular no interior do pré-adipócito. No adipócito branco, essas gotas se fundem para formar uma única e grande gotícula de gordura que preenche completamente a célula, comprimindo o citoplasma, o núcleo e as organelas celulares. Já no adipócito

marrom, ao fim da adipogênese cada gota lipídica permanece separada uma da outra no citoplasma, formando múltiplas gotículas de gordura (Figura 5) (HENRIKSON, KAYE e MAZURKIEWICZ, 1997; SAELY, GEIGER e DREXEL, 2012).

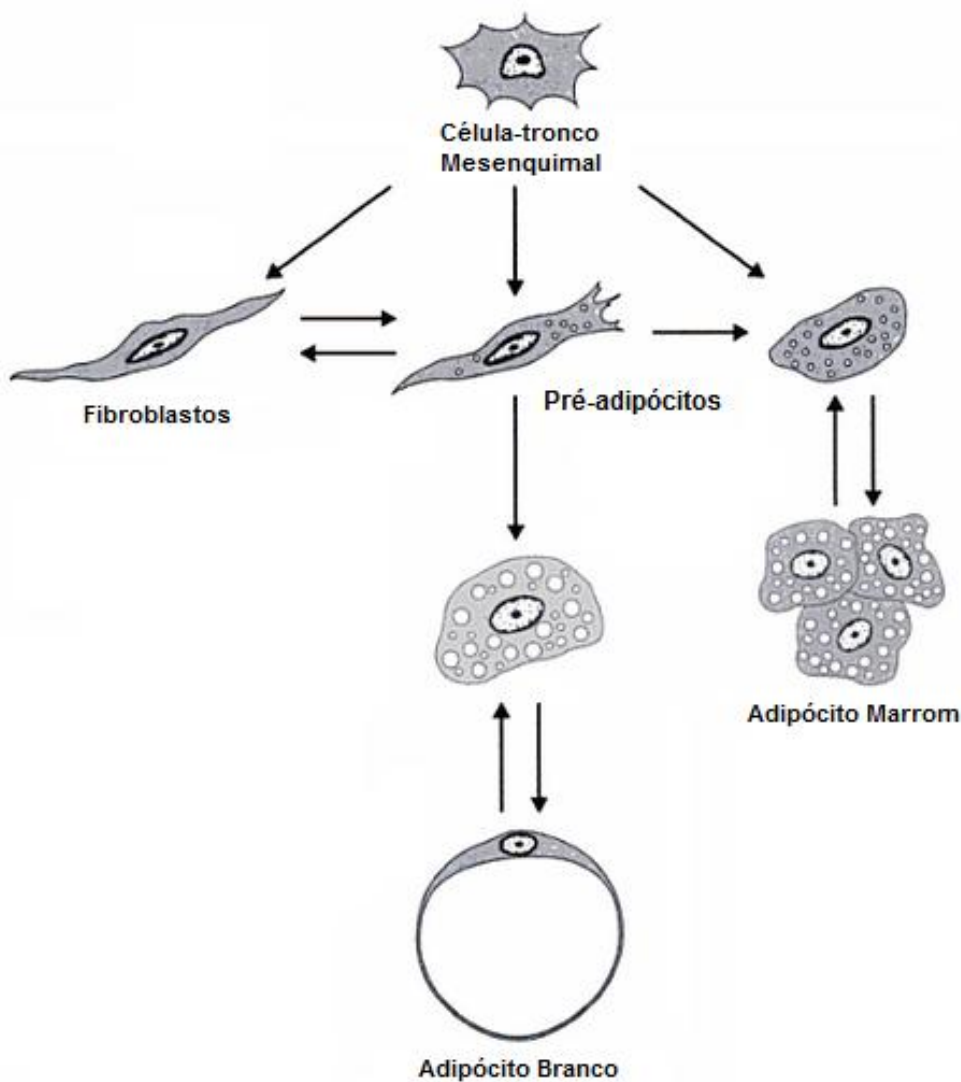


Figura 5: Desenvolvimento de adipócitos. Fonte: HENRIKSON, KAYE e MAZURKIEWICZ, 1997 (adaptado).

O tipo tecido adiposo em que há predominância de adipócitos marrons é denominado Tecido Adiposo Multilocular (ou marrom), enquanto que o Tecido

Adiposo Unilocular (ou branco) é aquele predominante em adipócitos brancos (Figura 6).

O tecido adiposo marrom (Figura 6a) é especializado na termogênese, de modo que os lipídeos presentes nesse tecido, ao serem oxidados, produzem calor ao invés de ATP, como nos outros tecidos do corpo. Em alguns mamíferos, o tecido adiposo marrom é importante na hibernação. Na espécie humana, este tecido é abundante no recém-nascido e sua quantidade diminui gradualmente no decorrer do tempo. Durante os primeiros estágios de vida, a função desse tecido é produzir calor, protegendo o recém-nascido contra o frio (SAELY, GEIGER e DREXEL, 2012; ROSS e PAWLINA, 2008).

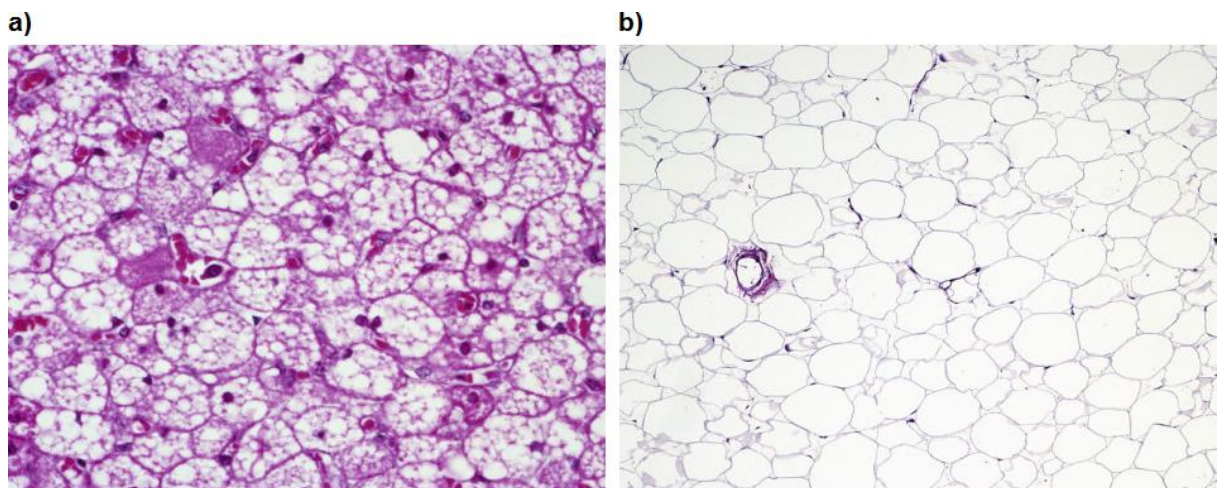


Figura 6: Fotomicrografia de tecido adiposo multilocular (a) e tecido adiposo unilocular (b). Fonte: ALLPOSTERS, 2012 (adaptado).

O tecido adiposo branco (Figura 6b) está envolvido principalmente na estocagem de energia, armazenando calorías na forma de triglicerídeos. Para esse processo os triglicerídeos são transportados na corrente sanguínea em quilomícrons e VLDL e, chegando ao adipócito, sofrem ação da Lipoproteína Lipase (LPL), liberando ácidos graxos e glicerol. Os ácidos graxos são captados pelos adipócitos e podem ser oxidados como combustíveis ou novamente esterificados para armazenagem. Entre as refeições e no estado de fome, os triglicerídeos armazenados podem ser

mobilizados, sofrendo ação das enzimas Triacilglicerol Lipase e Lipase Homônio Sensível, sendo a insulina e as catecolaminas os principais reguladores desse mecanismo. As catecolaminas, e também o glucagon, estimulam a lipólise, enquanto que a insulina inibe esse processo e estimula a lipogênese (Figura 7) (KARASTERGIU et al., 2012).

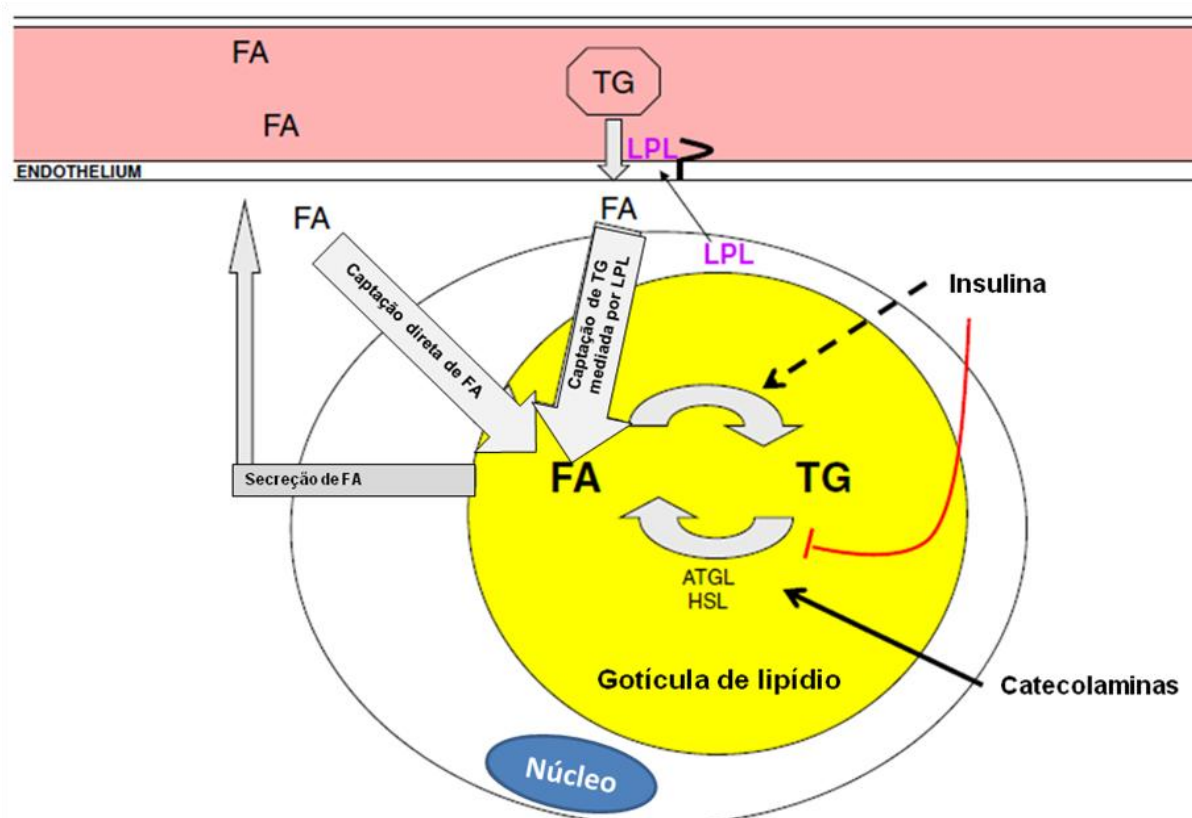


Figura 7: Esquema geral dos processos de lipogênese e lipólise. TG: Triglicerídios. LPL: Lipoproteína Lipase. FA: Ácidos Graxos. ATGL: Triacilglicerol Lipase. HSL: Lipase Hormônio Sensível. Fonte: KARASTERGIU et al., 2012 (adaptado).

O tecido adiposo branco é o mais predominante em homens e mulheres de idade adulta. Este tecido possui distribuição corporal bastante heterogênea e, de acordo com sua deposição, pode ser classificado em Tecido Adiposo Subcutâneo (TAS) e Tecido Adiposo Visceral (TAV).

O TAS representa a solução fisiológica para estocagem de energia, depositando gordura na região que forma o panículo adiposo e também na região gluteofemoral. O TAV encontra-se distribuído principalmente na cavidade intra-abdominal, onde pode ser dividido em três depósitos principais: omental, que é a gordura mais superficial que circunda os intestinos; mesentérico, que é a gordura mais profunda em torno dos intestinos e retroperitoneal, que se localiza perto dos rins no lado dorsal da cavidade abdominal (Figura 8). Além disso, quantidades menores de TAV são encontradas no mediastino (tecido adiposo intratorácico) e em torno de órgãos específicos, como o coração (tecido adiposo epicárdico), estômago (tecido adiposo epigástrico) e vasos sanguíneos (tecido adiposo perivascular) (IOZZO, 2011; WRONSKA e KMIEC, 2012).



Figura 8: Distribuição corporal do tecido adiposo branco. Fonte: WRONSKA e KMIEC, 2012 (adaptado).

Na obesidade, a expansão tanto de TAS quanto de TAV pode estar relacionada ao risco de desenvolvimento de comorbidades. No entanto, a deposição de gordura ectópica e riscos elevados à saúde são mais fortemente associados à obesidade visceral, como esquematizado na Figura 9, e seus mecanismos ainda não são totalmente conhecidos. Estudos mais recentes indicam que a deposição de gordura em TAS gera um efeito protetor contra lipotoxicidade (DESPRÉS e LEMIEUX, 2006; WRONSKA e KMIEC, 2012).

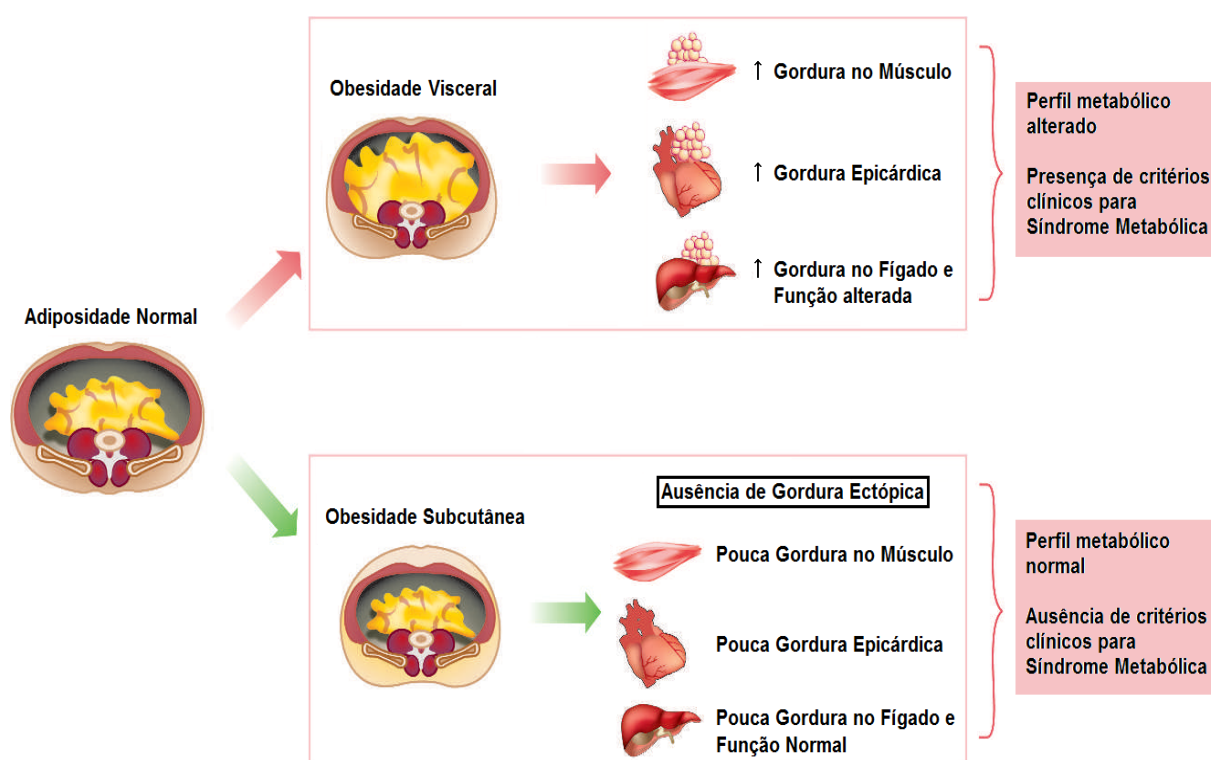


Figura 9: Deposição de gordura ectópica na obesidade visceral e na obesidade subcutânea. Fonte: DESPRÉS e LEMIEUX, 2006 (adaptado).

A expansão do tecido adiposo pode ocorrer por hiperplasia, por hipertrofia de adipócitos ou por ambos. A hiperplasia está relacionada ao número de adipócitos maduros que compõem o tecido e depende de adipogênese, como já ilustrado na Figura 5. A hipertrofia e quaisquer outras alterações no volume e tamanho de adipócitos acontecem em resposta a funções metabólicas típicas como lipogênese e lipólise. Essa resposta varia de acordo com a necessidade de incorporação e

liberação de lipídeos pela célula e com o equilíbrio entre lipólise e lipogênese. Assim, a hipertrofia pode sofrer influência de fatores como estado nutricional, gasto energético e resposta hormonal (QUEIROZ et al., 2009; GRAY e VIDAL-PUIG, 2007).

Há evidências indicando que a capacidade de expansão do tecido adiposo é limitada e quando o acúmulo de gordura nos depósitos alcança seu limite máximo, alguns órgãos podem ser seriamente prejudicados. Essa limitação pode gerar deposição de gordura ectópica e ocasionar graves danos à saúde. O excesso de gordura nos órgãos contribui para o desenvolvimento de algumas das comorbidades associadas à obesidade e pode causar lipotoxicidade em indivíduos obesos (SETHI e VIDAL-PUIG, 2007; VIRTUE e VIDAL-PUIG, 2008).

Além disso, o efeito prejudicial da expansão exagerada do tecido adiposo pode gerar um quadro complexo de disfunções no organismo, como acontece no desenvolvimento de DM2. A elevada taxa de lipólise que ocorre na obesidade é responsável por uma constante liberação de ácidos graxos livres, prejudicando a absorção de insulina, que possui atividade anabólica e atua em muitas vias metabólicas do organismo. Esse processo resulta em aumento da gliconeogênese, além de induzir a produção de glicose pelo fígado e gerar dislipidemia sistêmica. Todos esses fatores em conjunto contribuem para alteração nas concentrações circulatórias de insulina e aumento da resistência à insulina, assim como redução na captação de glicose. Inicialmente, as células β do pâncreas compensam estes processos, produzindo mais insulina, resultando em hiperinsulinemia. Com o tempo, essa situação pode levar à falência das células β , reduzindo drasticamente a produção e secreção de insulina. Dessa forma, ocorre aumento nas concentrações de glicose no sangue (hiperglicemia) e, conseqüentemente, desenvolvimento de DM2 (Figura 10) (KOPELMAN, 2000; HAJER, HAEFTEN e VISSEREN, 2008).

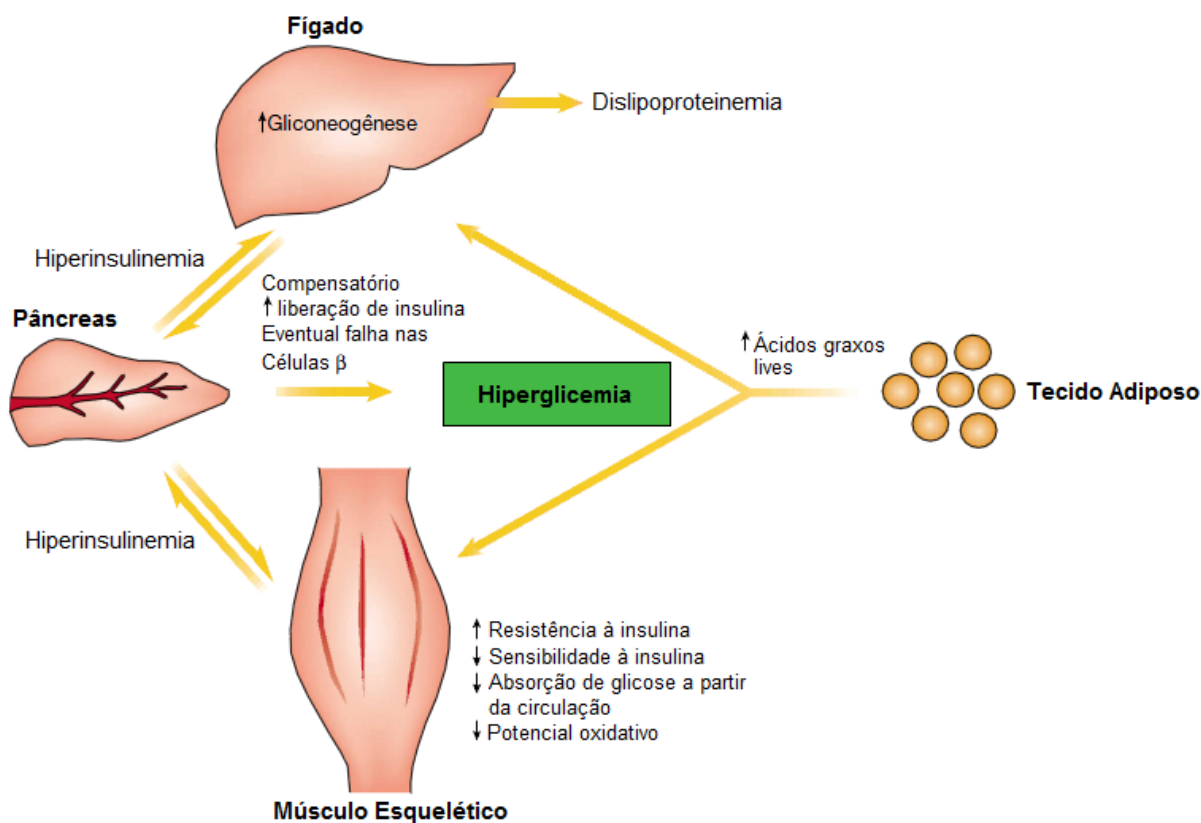


Figura 10: Obesidade e DM2. Fonte: KOPELMAN, 2000 (adaptado).

Múltiplas vias metabólicas estão envolvidas no processo de expansão do tecido adiposo. Assim, é importante compreender o envolvimento e a influência desses processos no desenvolvimento e expansão desse tecido e de que forma isso pode ter repercussão clínica.

1.5 VEGF e Obesidade

O tecido adiposo é altamente vascularizado e possui intensa atividade angiogênica. Para a expansão fisiológica desse tecido é necessário recrutamento de células precursoras adipogênicas, assim como uma resposta angiogênica eficiente, com o desenvolvimento de grande quantidade de vasos sanguíneos (CAO, 2007;

FOLKMAN, 2006). Ou seja, é necessária vascularização que acompanhe o desenvolvimento normal desse tecido (Figura 11).

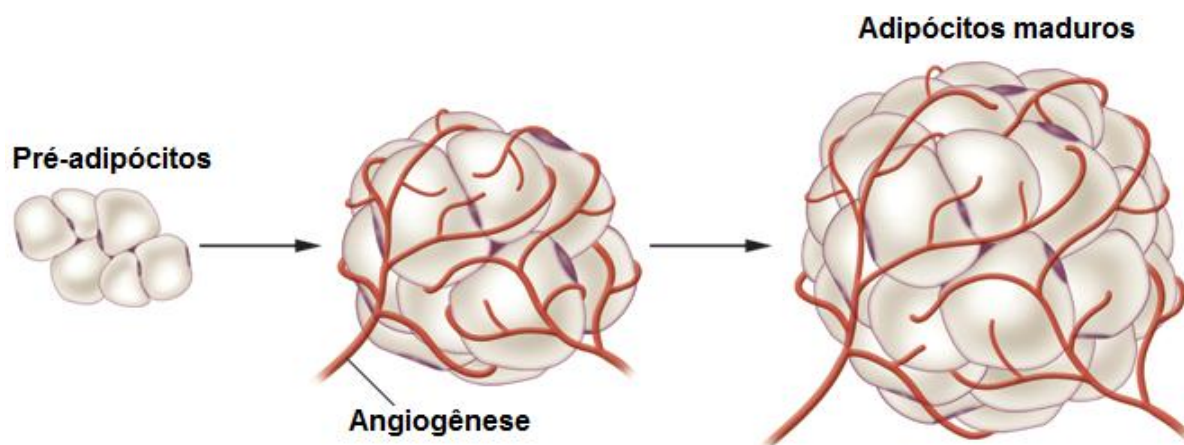


Figura 11: Expansão e angiogênese do tecido adiposo. Fonte: SUN et al., 2011 (adaptado).

O gene *VEGF* possui função central nesse processo e atua promovendo a vascularização do tecido. Participa de mecanismos que induzem a migração e proliferação de células endoteliais e está diretamente associado à expansão do endotélio vascular e à vasopermeabilidade (CELEC e YOUNEMITSU, 2004; FERRARA, 2004).

A produção de *VEGF* pode ser regulada por fatores endógenos e exógenos, como a atividade de citocinas e, principalmente, a hipóxia. Além disso, a regulação pode ocorrer de maneira indireta, agindo nos receptores desse gene. O *VEGF* liga-se a três principais receptores específicos: *VEGFR-1*, *VEGFR-2* e o *VEGFR-3*. Os dois primeiros são expressos geralmente em células endoteliais vasculares e hematopoiéticas, enquanto que o *VEGFR-3* é expresso principalmente no endotélio linfático (CELEC e YOUNEMITSU, 2004).

A família *VEGF* é formada por alguns dos mais importantes fatores proangiogênicos. Esta família é atualmente composta pelos membros *VEGFA*, *VEGFB*, *VEGFC*, *VEGFD*, *VEGFE* e *PlGF*, que compartilham domínios homólogos. Além disso, o

VEGFB possui duas isoformas (*VEGFB*₁₆₇ e *VEGFB*₁₈₆) e o *VEGFA* possui sete isoformas (*VEGF*₁₂₁, *VEGF*₁₄₅, *VEGF*₁₄₈, *VEGF*₁₆₅, *VEGF*₁₈₃, *VEGF*₁₈₉ e *VEGF*₂₀₆) (HOEBEN et al. 2004; CELEC e YOUNEMITSU, 2004).

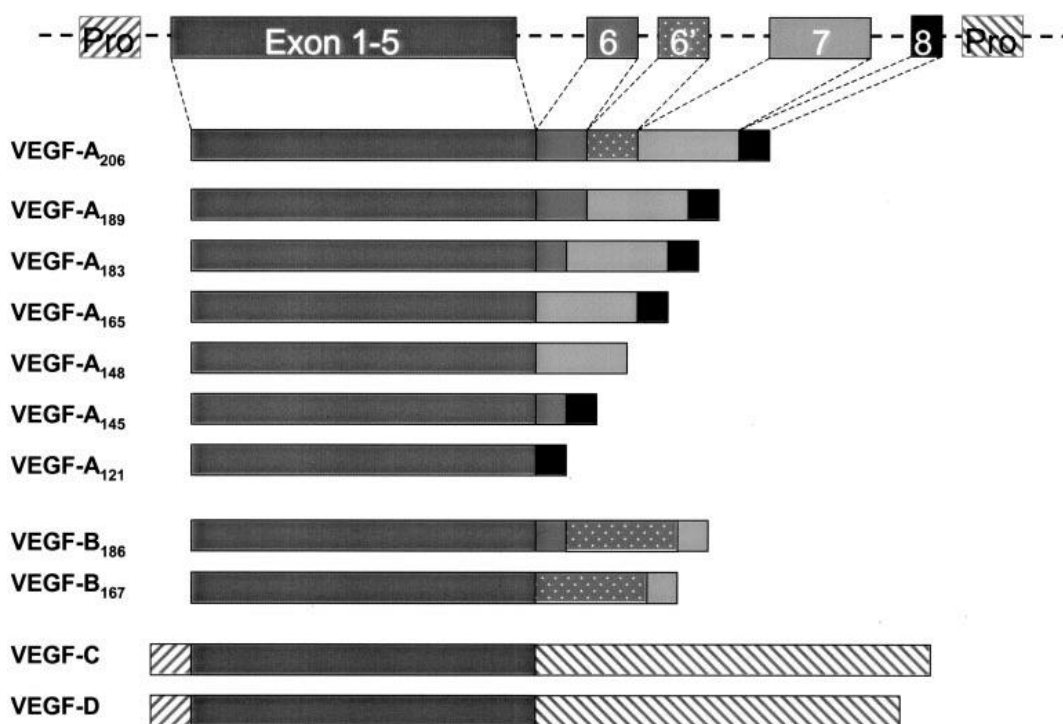


Figura 12: Principais membros da família VEGF e suas isoformas. Fonte: HOEBEN et al., 2004 (adaptado).

O *VEGFA* é formado a partir da transcrição de 8 éxons e suas isoformas são formadas por meio de splicing alternativo entre os éxons de 6 a 8 (Figura 12). Isto é, os aminoácidos codificados pelos éxons de 1 a 5 são conservados em todas as isoformas, enquanto que o splicing envolve os éxons 6, 7 e 8. A presença ou ausência destes domínios influencia na solubilidade da molécula e na ligação a receptores (HOEBEN et al. 2004; CELEC e YOUNEMITSU, 2004).

O *VEGFA* possui grande importância na angiogênese e níveis elevados de RNAm deste gene podem ser encontrados em muitos tecidos e órgãos (HOEBEN et al. 2004). Assim, algumas vezes a atividade do gene *VEGFA* e de outros membros

dessa família é relacionada à obesidade e a processos de expansão do tecido adiposo, como pode ser observado a seguir.

Miyazawa-Hoshimoto et al. (2003) fizeram correlações com as concentrações séricas de *VEGF* de 38 indivíduos (10 homens e 28 mulheres) com sobrepeso ou obesidade (IMC = 33.8 ± 5.1). Os resultados demonstraram que as concentrações séricas de *VEGF* foram positivamente correlacionadas com o IMC e com a área de gordura visceral. A análise de regressão mostrou que a área de gordura visceral é um dos fatores de determinação mais importantes para os níveis de *VEGF* circulante. Assim, foi possível concluir que o aumento das concentrações de *VEGF* associado ao acúmulo de gordura visceral no corpo pode influenciar na função endotelial vascular de indivíduos com excesso de peso.

Silha et al. (2005) analisaram as concentrações de *VEGFA*, *VEGFC*, *VEGFD* e do receptor solúvel de *VEGF 2* (*sVEGFr2*) em 58 indivíduos magros (24 homens, 34 mulheres, IMC = 22.2 ± 0.3) e 42 indivíduos obesos ou com sobrepeso (16 homens, 26 mulheres, IMC = 35.5 ± 1.2). Um dimorfismo sexual foi observado nas concentrações de *VEGFC* e *VEGFD*. Os níveis dessas moléculas foram significativamente mais elevados em mulheres que em homens. O IMC foi positivamente correlacionado às concentrações de *VEGFC*, *VEGFD* e *sVEGFr2*, mesmo depois que os valores foram ajustados por idade e sexo, demonstrando que níveis elevados de fatores de crescimento endotelial vascular estão presentes em indivíduos obesos ou com sobrepeso.

García de La Torre et al. (2008) analisaram a relação entre o peso e o *VEGFA* circulante em indivíduos obesos mórbidos antes e depois da cirurgia bariátrica. O estudo foi feito em um total de 45 mulheres obesas mórbidas (IMC = 49.9 ± 8.1), com idade variando entre 20 e 65 anos, e 9 magras controle (IMC = 20.6 ± 0.7). Para a análise foram coletadas amostras de soro de *VEGFA* antes da cirurgia bariátrica e de 9 a 12 meses depois. As pacientes obesas apresentaram níveis de *VEGFA* maiores que os controles (306.3 ± 170.3 vs. 187.6 ± 91.9 pg/ml). Interessantemente, esses níveis decresceram após a cirurgia bariátrica (246.1 ± 160.4 pg/ml). Com isso, concluiu-se que os níveis séricos de *VEGFA* são

significativamente aumentados em pacientes obesas, quando comparadas a controles magros e que esses níveis decrescem após a perda de peso.

Gómez-Ambrosi et al. (2009) compararam as concentrações de *VEGFA*, *VEGFB*, *VEGFC* e *VEGFD* em 12 homens e 12 mulheres obesos (IMC = 47.6 ± 5.9), com média de idade de 33.5 ± 11.2 anos, e em 7 homens e 8 mulheres magros (IMC = 20.3 ± 2.5). Pacientes obesos apresentaram aumento significativo nas concentrações de *VEGFA* (150 ± 104 vs. 296 ± 160 pg/ml), *VEGFB* (2788 ± 1038 vs. 4609 ± 2202) e *VEGFC* (13453 ± 5750 vs. 17635 ± 5117 pg/ml). As concentrações de *VEGFA* decresceram significativamente após perda de peso decorrida da cirurgia bariátrica (345 ± 229 vs. 290 ± 216 pg/ml). Além disso, foi realizado também um estudo em modelos animais (murinos) que demonstrou aumento significativo nas concentrações de *VEGFA* após 12 semanas de dieta rica em gordura (43.3 ± 9.0 vs. 29.7 ± 9.1 pg/ml; $p < 0.01$). Esses dados indicam o envolvimento do *VEGF* na expansão do tecido adiposo que ocorre na supernutrição ou em dietas hipercalóricas.

Lieb et al. (2009) realizaram análises de correlações com as concentrações de *VEGF* circulante em 3754 participantes do Estudo Framingham, sendo 1752 homens (IMC = 27.8 ± 4.6) e 2002 (IMC = 25.9 ± 6) mulheres. As concentrações de *VEGF* foram positivamente associadas à presença de obesidade abdominal, hipertensão e síndrome metabólica. Além disso, o *VEGF* foi positivamente correlacionado ao aumento do IMC. O estudo revelou também que a herdabilidade das concentrações desta molécula foi de quase 80%. Assim, foi demonstrado que o *VEGF* pode estar também associado a fatores de risco à saúde e que o padrão de herdabilidade da expressão desse gene é elevado.

Mais recentemente, Loebig et al. (2010) analisaram as concentrações de *VEGFA* em 15 indivíduos de peso normal, 15 de baixo peso e 15 obesos do sexo masculino e com idades variando entre 18 e 30 anos. As concentrações de *VEGFA* diferiram significativamente entre os grupos de IMC. Os níveis de *VEGFA* foram mais baixos em indivíduos normais que em obesos e mais altos em obesos comparados a indivíduos de baixo peso, demonstrando assim uma correlação positiva entre os níveis de *VEGFA* e o IMC.

Esses estudos revelam a importância do *VEGFA* na obesidade e demonstram que essa molécula é importante para o desenvolvimento do tecido adiposo. Assim, a hipótese desse trabalho é que há diferenças na expressão de VEGF em TAS e TAV e que alterações na expressão do *VEGFA* nesses depósitos podem estar associadas à maior frequência de alterações da tolerância à glicose. Neste trabalho foi realizada uma análise de expressão do gene *VEGFA* em TAS e TAV de mulheres com obesidade grau III e também do gene da adiponectina, visto que este é um dos principais marcadores para alterações na tolerância à glicose.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar a expressão do gene *VEGFA* em TAS e TAV de mulheres com obesidade grau III, com e sem alterações na tolerância à glicose.

2.2 Objetivos Específicos

- Comparar a expressão do gene *VEGFA* entre os depósitos TAS e TAV na amostra total e na amostra dividida de acordo com a presença de alterações da tolerância à glicose.
- Correlacionar a expressão do gene *VEGFA* a fatores antropométricos, bioquímicos e clínicos.
- Correlacionar a expressão do gene *VEGFA* à expressão do gene *ADIPOQ*.

3 METODOLOGIA

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, com o protocolo número 049/06. Todos os sujeitos selecionados receberam esclarecimentos sobre os objetivos do trabalho, isto é, que as análises moleculares têm finalidade de contribuir para o melhor entendimento da obesidade e suas comorbidades, de identificar fatores de risco e/ou predisposição à obesidade, mas que ainda não são utilizadas para fins diagnósticos. Foram informados que os resultados são confidenciais e que teriam privacidade garantida. Além disso, foram informados ainda que poderiam ter acesso aos resultados da pesquisa, se assim desejassem. Assim, a coleta dos tecidos foi realizada somente após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo I) pelo paciente ou por um responsável.

Para a execução do projeto as normas de biossegurança foram adotadas a fim de garantir um ambiente limpo e seguro para os manipuladores dos materiais biológicos retirados dos sujeitos selecionados para a pesquisa. Além disso, uma política de redução de geração de resíduos foi seguida e os resíduos gerados foram descartados de forma adequada.

3.1 Sujeitos e Métodos

A amostra deste estudo foi constituída por um total de 33 pacientes do sexo feminino com obesidade grau III. A coleta deste material foi realizada pelas professoras Flávia Imbroisi V. Errera e Elaine Cristina Viana, junto com os estudantes Leonardo Costa Pereira e Janine Batista Coimbra, no Programa de Cirurgia Bariátrica do Hospital Universitário Cassiano Antonio Moraes da Universidade Federal do Espírito Santo (HUCAM/UFES), em colaboração com o Dr. Gustavo Peixoto (GSPM). As pacientes foram voluntárias de um protocolo de pesquisa, tese do Dr. GPSM, que visava comparar duas técnicas cirúrgicas do trato digestivo (registrado em clinicaltrials.gov -

NCT00873405) (MIGUEL et al., 2011). Essas pacientes haviam realizado muitas tentativas, sem êxito, de redução de peso e nenhuma possuía histórico de doença mental, uso de drogas ilícitas, risco cirúrgico elevado, compulsão por doces e cirurgia anterior no trato digestivo. Além disso, não apresentavam doenças inflamatórias, infecciosas e tireoidianas e também não faziam uso de antidepressivos ou drogas anti-obesidade durante o período de estudo de cirurgia.

Foram incluídas apenas pacientes que não estavam na menopausa e que possuíam o IMC ≥ 40 (obesidade grau III). As principais características clínicas encontram-se expostas na Tabela 4.

Tabela 4: Característica clínicas das pacientes (n=33)

	Média \pm DP	Mediana	Varição
Idade (anos)	35.5 \pm 5.4	36.0	21.0 - 43.0
IMC (kg/m ²)	42.5 \pm 1.6	42.5	40.0 - 44.9
Peso (kg)	111.5 \pm 10.7	110.0	92.7 - 139.0
Excesso de peso (kg)	54.6 \pm 6.6	53.1	43.9 - 71.8
Circunferência abdominal (cm)	119.8 \pm 6.5	120.0	107.0 - 138.0
%Gordura	48.9 \pm 2.5	49.1	41.0 - 52.1
Glicemia em jejum (mg/dL)	91.9 \pm 12.9	89.0	70.0 - 125.0
Glicemia / 2h (mg/dL)	118.9 \pm 36.4	112.0	63.0 - 195.0
Triglicérides (mg/dL)	137.8 \pm 69.8	114.0	68.0 - 228.0
Colesterol total (mg/dL)	183.6 \pm 33.4	189.0	104.0 - 258.0
HDL (mg/dL)	40.0 \pm 10.0	39.0	16.0 - 74.0
LDL (mg/dL)	122.6 \pm 49.9	120.0	67.6 - 289.0

DP = Desvio Padrão; IMC = Índice de Massa Corporal; TOTG = Teste Oral de Tolerância à Glicose; HDL = Lipoproteína de Alta Densidade; LDL = Lipoproteína de Baixa Densidade.

O DM2 e o Grau de Tolerância Oral à Glicose foram classificados de acordo com critérios da IDF (2006). Foram realizadas análises na amostra total e também em grupos separados de acordo com alterações na tolerância à glicose, de modo que tanto a presença de DM2 quanto de intolerância à glicose (IGT) foram consideradas alterações na tolerância à glicose. Assim, o grupo com presença de alterações na

tolerância à glicose foi chamado de Hiperglicêmicas (HGLY) e o grupo sem alterações foi chamado de Normoglicêmicas (NGLY).

3.2 Antropometria, Composição Corporal e Parâmetros Bioquímicos

Todas as pacientes foram acompanhadas seguindo os protocolos clínicos multidisciplinares do Programa de Cirurgia Bariátrica, os quais viabilizaram a obtenção dos dados dessa pesquisa. Foram analisados dados relativos ao peso corporal (kg), IMC (Índice de Massa Corporal) (kg/m^2) e circunferência abdominal (cm), bem como porcentagem de gordura corporal (%) e porcentagem de massa magra (%). O excesso de peso foi calculado pela diferença entre o peso das pacientes e o peso ideal, de acordo com a altura. Além disso, também foram verificados dados bioquímicos relativos aos níveis do TOTG, Teste de Glicemia em Jejum, Triglicerídeos, Colesterol Total e frações.

3.3 Amostras de Tecido Adiposo, Extração de RNA e Síntese de cDNA

As amostras de TAS da parede abdominal, e TAV do omento, foram coletadas durante a cirurgia bariátrica. Essas amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até o isolamento do RNAm. Um total de 80-100 mg de cada amostra de TAS e TAV das 33 pacientes foi homogeneizado em Qiazol com auxílio do Tissue Ruptor (Qiagen). O RNA total foi tratado com DNase I (Kit RNase-Free DNase set, Qiagen) e isolado usando o Kit RNeasy Lipid Tissue Mini (Qiagen). A qualidade e a concentração do RNA foram avaliadas no equipamento NanoDrop® ND-1000 e em gel de agarose 1%. O cDNA foi sintetizado a partir de 2000ng de RNA usando Kit Superscript II (Invitrogen™), de acordo com as recomendações do fabricante, e armazenado a -20°C até a realização da PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR).

3.4 Análise de PCR quantitativa em tempo real

A principal vantagem da qRT-PCR em relação à PCR tradicional é a possibilidade de acompanhar o andamento da reação. A técnica de qRT-PCR é realizada a fim de monitorar o progresso de uma reação de PCR à medida que ela ocorre. As reações são caracterizadas pelo ponto no tempo durante a sucessão de ciclos em que a amplificação de um alvo é primeiramente detectada e não pela quantidade de alvo acumulado após um número fixo de ciclos. Quanto maior o número de cópias iniciais do ácido nucléico alvo, em menor tempo um aumento significativo na fluorescência é observado.

A expressão dos genes *VEGFA* e *ADIPOQ* em TAS e TAV das mulheres obesas foi verificada por meio de qRT-PCR, em colaboração com a Dr^a Maria Rita Passos-Bueno (USP) e também com a colaboração da aluna de Doutorado Karine Lourenzone de Araújo Dasilio (RENORBIO). Um total de 1 µl (30ng) de cada amostra de cDNA foi misturada a 2.5 µl de primer específico a 1 µM, 12.5 µl de 1X SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e DNase/RNase-free water para um volume final de 25 µl. As reações de qPCR foram realizadas em triplicatas usando ABI Prism 7500 Fast Sequence Detection System (Applied Biosystems) com protocolo de temperatura padrão. Os primers dos genes controles endógenos (*SDHA*, *HPRT1* e *GAPDH*) e dos genes *VEGFA* e *ADIPOQ* estão listados na Tabela 5. O Ct (Cycle threshold) foi definido como o número do ciclo em que um aumento significativo no sinal da fluorescência foi detectado pela primeira vez.

Uma curva padrão para cada conjunto de primers foi gerada pela diluição em série de amostras aleatórias de cDNA, com base na relação linear entre o Ct e o logaritmo da quantidade inicial de cDNA. Cada uma dessas reações foi feita em duplicata e as médias foram usadas para calcular o declive. A eficiência de amplificação (E) de cada primer foi calculada de acordo com a equação $E=10^{(-1/\text{declive})}$. O programa GeNorm v3.4 foi usado com todos os 3 genes endógenos para calcular o fator de normalização para cada amostra. Os valores de expressão foram calculados de acordo com Pfaffl (2001).

Tabela 5: Lista primers usados na qPCR para medir os níveis de transcrição dos genes-alvo estudados e dos genes-controle SDHA, HPRT1 e GAPDH.

Gene	Primer Senso	Primer Anti-senso
ADIPOQ	CCCTGGTGAGAAGGGTGAGA	AAAGCCTCGGGGACCTTCAG
VEGFA	CTTTCTGCTGTCTTGGGTGC	TCGTGATGATTCTGCCCTCC
SDHA	TGGGAACAAGAGGGCATCTG	CCACCACTGCATCAAATTCATG
HPRT1	TGACACTGGCAAACAATGCA	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT
GAPDH	CCATCTTCCAGGAGCGAGAT	TTCTCCATGGTGGTGAAGAC

Todas as sequências estão listadas no sentido 5' - 3'. *ADIPOQ* = Adiponectina; *COL18A1* = Colágeno, Tipo XVIII, Alfa 1; *IL6* = Interleucina Tipo 6; *TCF7L2* = Fator de Transcrição 7-like 2; *VEGFA* = Fator de Crescimento Endotelial Vascular A (todas isoformas); *SDHA* = Complexo Succinato Desidrogenase, Subunidade A; *HPRT1* = Hipoxantina Fosforibosiltransferase 1; *GAPDH* = Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase.

3.5 Análise Estatística

Como os valores referentes à glicemia em jejum, colesterol total, HDL, triglicerídeos e expressão gênica não apresentaram distribuição normal, foram utilizados testes não-paramétricos para a análise de dados. O número exato de pacientes foi diferente para cada análise e encontra-se especificado nos resultados.

O teste pareado de Wilcoxon foi usado para comparação de valores relativos de expressão gênica entre TAS e TAV. Para a comparação entre dois grupos não pareados a significância estatística foi avaliada de acordo com o Teste de Mann-Whitney. Coeficientes de Correlação de Spearman foram calculados para avaliar a força da associação. Para as análises estatísticas foi adotada uma significância de $p < 0.05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism 5 para Windows (versão 5.00.288).

4 RESULTADOS

A amostra foi composta por um grupo homogêneo de mulheres com obesidade grau III, cujas principais características clínicas estão descritas na Tabela 4.

4.1 Expressão de *VEGFA* nos depósitos TAS e TAV na amostra total

No TAV foi encontrada maior variação de expressão para o gene *VEGFA*, com valores entre 0.0002606 e 0.08165 (SD \pm 0.01815). Foram observados valores médios de expressão de *VEGFA* semelhantes entre TAS e TAV (0.02170 \pm 0.002997 vs. 0.02157 \pm 0.003631, $p=0.7672$, $n=25$).

4.2 Correlação da expressão de *VEGFA* com dados clínicos e parâmetros bioquímicos na amostra total

Uma análise de correlação foi feita entre os valores da expressão de *VEGFA* e algumas variáveis clínicas (Tabela 6). No TAS, a idade foi correlacionada negativamente ao *VEGFA* ($n=29$, $r=-0.4409$, $p=0.0167$). No TAV, este gene foi positivamente associado ao excesso de peso ($n=28$, $r=0.3824$, $p=0.044$) e negativamente associado aos níveis de colesterol total ($n=27$, $r=-0.3957$, $p=0.0411$) e HDL ($n=28$, $r=-0.4130$, $p=0.0289$). Nenhuma correlação significativa foi encontrada em relação ao IMC, circunferência abdominal e porcentagem de gordura corporal.

Tabela 6: Correlação da expressão do gene *VEGFA* a dados clínicos, em TAS e TAV.

	TAS		TAV	
	r	p	r	p
Idade (anos)	-0.441	<0.05	-0.011	NS
IMC (kg/m ²)	0.281	NS	0.233	NS
Excesso de peso (kg)	0.286	NS	0.382	<0.05
Glicemia em jejum (mg/dL)	-0.231	NS	-0.029	NS
Triglicerídios (mg/dL)	0.165	NS	0.262	NS
Colesterol Total (mg/dL)	-0.204	NS	-0.396	<0.05
HDL (mg/dL)	-0.126	NS	-0.413	<0.05
LDL (mg/dL)	-0.215	NS	-0.291	NS

NS = Não Significativo; IMC = Índice de Massa Corporal; HDL = Lipoproteína de Alta Densidade; LDL = Lipoproteína de Baixa Densidade

4.3 Correlações entre as expressões de *VEGFA* e *ADIPOQ* no Tecido Adiposo

A expressão de RNAm do gene *VEGFA* foi positivamente correlacionada à expressão de *ADIPOQ* tanto no TAS (n=29, r=0.5793, p=0.001) quanto no TAV (n=28, r=0.5523, p<0.01).

4.4 Expressão de *VEGFA* nos grupos com e sem alterações na tolerância à glicose

A amostra total foi subdividida em (HGLY) e NGLY (Tabela 7). Foi possível observar que, no TAV, pacientes HGLY apresentaram expressão de *VEGFA* menor que NGLY (HGLY: 0.01364 ± 0.003740, n=9 vs. NGLY: 0.02614 ± 0.004474, n=19; p=0,0491) (Figura 13). Além disso, do mesmo modo como ocorre na amostra total,

não foram observadas diferenças significativas quando comparadas as expressões de VEGFA entre TAS e TAV em cada um desses grupos.

Tabela 7: Correlações de expressão do gene *VEGFA* com separação em hiperglicêmicas e normoglicêmicas.

	HGLY				NGLY			
	TAS (n=11)		TAV (n=9)		TAS (n=18)		TAV (n=19)	
	r	p	r	p	r	p	r	p
<i>ADIPOQ</i>	0.664	<0.05	0.867	<0.01	0.573	0.01	0.402	<0.01
Idade (anos)	-0.547	NS	-0.119	NS	-0.406	NS	-0.119	NS
IMC (kg/m ²)	0.392	NS	0.31	NS	0.055	NS	0.191	NS
Excesso de peso (kg)	0.218	NS	0.433	NS	0.265	NS	0.38	NS
Glicemia em jejum (mg/dL)	-0.429	NS	-0.029	NS	-0.043	NS	0.027	NS
Triglicerídios (mg/dL)	0.017	NS	0.405	NS	0.345	NS	0.515	<0.05
Colesterol Total (mg/dL)	0.333	NS	-0.524	NS	-0.378	NS	-0.154	NS
HDL (mg/dL)	-0.151	NS	-0.335	NS	-0.29	NS	-0.425	NS
LDL (mg/dL)	0.027	NS	-0.333	NS	-0.334	NS	-0.181	NS

NS = Não Significativo; HGLY = Hiperglicêmicas; NGLY = Normoglicêmicas; HDL = Lipoproteína de Alta Densidade; LDL = Lipoproteína de Baixa Densidade; *ADIPOQ* = Adiponectina; *VEGFA* = Fator de Crescimento Endotelial Vascular A.

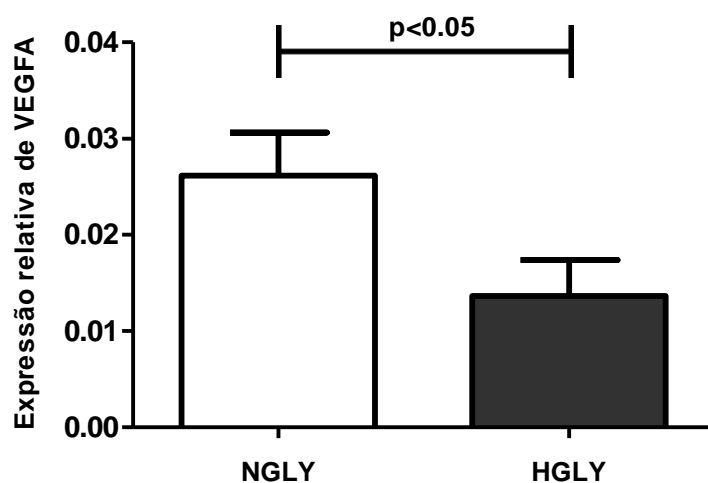


Figura 13. Média de expressão do gene *VEGFA* em TAV de Normoglicêmicas (NGLY) e Hiperglicêmicas (HGLY).

5 DISCUSSÃO

A adipogênese é caracterizada principalmente pela diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos maduros, gerando desenvolvimento e expansão do tecido adiposo. Esse processo abrange diferentes vias metabólicas e grande quantidade de moléculas. A adipogênese está diretamente relacionada à angiogênese do tecido adiposo e nesse contexto o gene *VEGF* desempenha função importante. Assim, alguns estudos relatam o aumento dos níveis séricos (SILHA et al., 2005; MIYAZAWA-HOSHIMOTO et al., 2003) e de RNAm (LEDOUX et al., 2008) deste gene durante a obesidade.

Gómez-Ambrosi et al. (2009) demonstraram que um grupo de 24 obesos (12 homens e 12 mulheres) apresentou aumento significativo de *VEGF* circulante quando comparado a um grupo de 15 indivíduos não obesos (7 homens e 8 mulheres). O estudo mostrou também que os níveis de *VEGFA* diminuíram significativamente após a perda de peso decorrida da cirurgia bariátrica em 19 pacientes. Além disso, Elias et al. (2012) observaram que, em camundongos transgênicos, a superexpressão do gene *VEGF* induz a um aumento do recrutamento de macrófagos, mantendo um meio anti-inflamatório e evitando a resistência à insulina, contribuindo para um efeito protetor durante a obesidade.

Alguns autores encontraram correlações positivas entre os níveis de *VEGF* e o IMC, sugerindo a associação dessa molécula com o excesso de peso (MIYAZAWA-HOSHIMOTO et al., 2003; LOEBIG et al., 2010; SIERVO et al., 2012). Nesses estudos a amostra geralmente apresentava grande variação nos valores de IMC, possibilitando análises de correlação com essa variável. No entanto, a amostra do presente estudo (Tabela 4) apresentou apenas indivíduos com obesidade grau 3 e IMC variando entre 40,0 e 44,9. É possível que essa característica da amostra tenha inviabilizado correlações de expressão gênica com este índice. Apesar disso, a expressão de *VEGFA* foi correlacionada positivamente à variável excesso de peso (Tabela 6), a qual influencia no cálculo do IMC.

A obesidade é associada ao acúmulo de tecido adiposo branco ou unilocular. Esse tecido é heterogêneo e pode ser classificado, por sua distribuição, em subcutâneo (TAS) e visceral (TAV). Nesse estudo, a expressão de *VEGFA* foi similar em cada um dos dois depósitos, sugerindo que TAS e TAV apresentam um mesmo padrão de expressão para este gene. Dados semelhantes também foram observados por Ledoux et al. (2008) em um modelo de estudo *in vivo*, no qual uma porção do tecido dos pacientes da amostra (36 obesos, sendo 7 homens e 29 mulheres, com 22% de diabéticos) foi mergulhada e estimulada em membrana corioalantóide de frango. Nesses resultados foi mostrado que não houve diferenças significativas entre TAS e TAV quanto à expressão de RNAm dos genes *VEGFA* e *VEGFC*. No presente estudo, a expressão de *VEGFA* permaneceu semelhante entre os depósitos mesmo quando a amostra foi subdividida, de acordo com presença de alterações na glicemia, indicando que TAS e TAV podem expressar *VEGFA* em níveis bastante próximos e simultaneamente, mesmo em grupos com perfis diferentes.

Por outro lado, a expressão do gene *VEGFA* foi diferentemente correlacionada a alguns parâmetros que também podem estar envolvidos com a adipogênese no TAS e no TAV (Tabela 6). Isso indica que a regulação do *VEGFA* possui especificidades diferentes em cada um desses depósitos. Nesse sentido, Miyazawa-Hoshimoto et al. (2003), em uma amostra de 38 obesos, mostram que as concentrações séricas de *VEGF* circulante são positivamente correlacionadas à área de TAV e não à área de TAS (obtidas por meio de tomografia computadorizada). Esses achados mostram que a regulação do gene *VEGFA* pode não ser constante. Isto é, é possível que a atividade reguladora deste gene possa variar de acordo com a amostra e com o depósito de tecido adiposo analisado. Assim, as correlações feitas entre *VEGFA* e outros fatores podem oscilar de maneira complexa em análises e estudos diferentes, de acordo com parâmetros como alterações da glicemia.

No presente estudo o gene *VEGFA* também foi associado a dados bioquímicos e parâmetros clínicos. Assim observou-se que a expressão deste gene está negativamente correlacionada aos níveis de HDL e Colesterol total no TAV. Alguns estudos indicam efeitos específicos na angiogênese gerados por dislipidemias ou hipercolesterolemias (BLANN et al., 2001; RYU et al., 2006; JANG et al., 2000). Esses estudos mostram que altos níveis lipídicos podem prejudicar o

desenvolvimento de vasos sanguíneos em diferentes tecidos. A correlação negativa entre níveis de colesterol e *VEGFA* corrobora esses dados e sugere que é possível que esse efeito ocorra durante a obesidade. Porém, essa associação ainda necessita de mais esclarecimentos.

Além desses resultados, a idade das pacientes foi correlacionada negativamente ao *VEGFA*, sugerindo que este parâmetro pode influenciar na expressão do gene. Alguns autores corroboram essa hipótese e discutem que a angiogênese é prejudicada pelo envelhecimento (MIENO et al., 2006; HOFSTAETTER et al., 2007; RIVARD et al., 1999). No entanto, a relação direta entre o envelhecimento e a expressão do gene *VEGFA* precisa ser mais profundamente investigada.

Há evidências da presença de dimorfismo sexual nas concentrações séricas de *VEGF*, em que mulheres apresentam níveis maiores dessa molécula que homens (SILHA et al., 2005). Esse fato ajuda a explicar o motivo pelo qual a prevalência da obesidade é mais acentuada em mulheres. Nesse contexto, a amostra deste estudo é constituída exclusivamente por um grupo uniforme de mulheres obesas. Esse fato tornou os resultados consistentes e homogêneos. Apesar disso, algumas vezes esses resultados podem ser alterados ou sofrer interferências se o grupo total de indivíduos for dividido por algum parâmetro em grupos menores.

Quando a amostra total foi estratificada em HGLY e NGLY, foi observado que nesses grupos menores algumas correlações foram modificadas ou desapareceram (Tabela 7). É possível observar também que a expressão de *VEGFA* no grupo das HGLY é menor que em NGLY (Figura 13). Nesse sentido, estudos indicam que os níveis de glicose podem interferir na angiogênese (OREN et al., 2003; LING et al. 2012). Assim, por meio de análises *in vitro*, Dubois et al. (2010) mostraram que ilhotas pancreáticas, após receberem tratamento com altos níveis glicêmicos, apresentaram significativa diminuição das concentrações séricas de fatores pro-angiogênicos e da expressão do RNAm de *VEGFA*. Dessa forma, a alteração de expressão observada em HGLY pode estar associada à glicotoxicidade gerada pelos altos níveis de glicose.

Além disso, existe ainda a hipótese de que expansão do tecido adiposo não é um processo ilimitado e que, na verdade, a limitação na capacidade de expansão desse tecido é um fator determinante para o surgimento de comorbidades associadas à obesidade (TAN e VIDAL-PUIG, 2008). Assim, é possível que o desenvolvimento da hiperglicemia e de outras comorbidades em obesos possa ser em razão de uma redução na capacidade do tecido adiposo em expandir-se, a qual pode ser influenciada geneticamente. Então, a baixa expressão de *VEGFA* no TAV de HGLY (Figura 13) pode ser reflexo da limitação da adipogênese mediada por uma baixa atividade angiogênica do tecido adiposo nesses indivíduos.

Nos resultados deste estudo foram observadas algumas correlações entre a expressão do gene *VEGFA* e a expressão do gene *ADIPOQ*. Esse é um dos principais resultados desse estudo, pois se mantém bastante consistente no TAS e no TAV, mesmo depois que a amostra total foi dividida de acordo com alterações na tolerância à glicose. Nesse contexto, Nannipieri et al. (2007) analisaram o gene da adiponectina no TAS e no TAV de 30 obesos com DM2, 19 obesos com IGT, 54 obesos normais e 13 magros controle e foi observado que a presença ou ausência de diabetes não gerou nenhum efeito adicional significativo na expressão de *ADIPOQ*. Assim, é possível que no presente estudo a conservação das correlações entre *VEGFA* e *ADIPOQ*, mesmo após a estratificação da amostra, seja em razão de que alterações da glicemia não geram grandes influências na expressão deste gene no tecido adiposo.

A adiponectina é sintetizada e secretada exclusivamente pelo tecido adiposo e sua atividade é muitas vezes associada a uma função protetora contra aterosclerose e diabetes (SHIBATA et al., 2004; OKAMOTO et al., 2002; UKKOLA e SANTANIEMI, 2002; YAMAUCHI et al., 2001). A produção de adiponectina decresce durante o desenvolvimento da obesidade e indivíduos obesos possuem a expressão dessa molécula em níveis menores que indivíduos não obesos (KIESS et al., 2008; KERN et al., 2003; SILHA et al., 2003).

A função da adiponectina na angiogênese ainda permanece controversa. Alguns autores defendem que a adiponectina induz mecanismos antiangiogênicos (SUN et al., 2011) e também propõem, por meio de experimentos *in vitro* e em modelos

animais, que essa molécula inibe a proliferação e migração de células endoteliais e impede o crescimento de novos vasos sanguíneos (BRAKENHIELM et al., 2004). Por outro lado, estudos mostram que a adiponectina é promotora da angiogênese e, nesse sentido, alguns autores propõem um mecanismo de ação para a função proangiogênica dessa molécula e defendem que a adiponectina promove a angiogênese por meio da estimulação da Sinalização de uma Proteína Quinase AMP-ativada (SHIBATA et al., 2004; OUCHI et al., 2004; NAKAMURA et al., 2009; EREN et al., 2009). A correlação positiva estabelecida entre o *VEGFA* e a Adiponectina nos resultados deste estudo indica que é possível que a adiponectina possa estimular a angiogênese ou que ela tenha efeito compensatório contra um estímulo angiogênico.

Em síntese, foi possível observar com este estudo que as concentrações de RNAm de *VEGFA* foram semelhantes no TAS e no TAV, indicando que o padrão de expressão deste gene foi o mesmo para os dois depósitos. Apesar disso, o *VEGFA* apresentou correlações diferentes em cada um dos depósitos de tecido adiposo, sugerindo que este gene participa de interações complexas e variáveis. Foram observadas também correlações do gene *VEGFA* com o gene *ADIPOQ*, as quais podem estar associadas à obesidade. Além disso, alterações na glicemia e nos níveis de colesterol parecem influenciar na expressão do *VEGFA*. Esses resultados são importantes, pois contribuem para gerar mais esclarecimentos sobre a expressão do gene *VEGFA* no tecido adiposo de mulheres obesas.

6 CONCLUSÕES

A expressão de RNAm do gene *VEGFA* foi semelhante em TAS e TAV de mulheres com obesidade grau III.

O excesso de peso, altos níveis de colesterol e glicemia estão associados à expressão de *VEGFA*.

Indivíduos com alterações na glicemia apresentam concentrações de *VEGFA* reduzidas em TAV, indicando interações metabolicamente específicas neste tecido.

A expressão do *VEGFA* é correlacionada positivamente à expressão do gene *ADIPOQ* em ambos os depósitos do tecido adiposo.

7 REFERÊNCIAS

ABDOLLAHI, A.; HIATKY, L.; HUBER, P. E. Endostatin: The logic of antiangiogenic therapy. **Drug Resistance Updates**, v. 8, p. 59-74, 2005.

ADAM. Different types of weight gain. **ADAM Images**, 2012. Disponível em: <<http://www.adamimages.com/Different-types-of-weight-gain-Illustration/PI11119/F4>> Acesso em: out. 2012.

ALLPOSTERS. Human Unilocular or White Fat and Human Multilocular or Brown Fat. **Human Adipose Tissue**, 2012. Disponível em: <<http://www.allposters.com/gallery.asp?startat=/getthumb.asp&txtSearch=human%20adipose%20tissue&CID=C4EE9372F1E54B6F8CE2EFAA42A1398D>>. Acesso em: nov. 2012.

BELL, C. G.; WALLEY, A. J.; FROGUEL, P. The Genetics of Human Obesity. **Nature Reviews**, v. 6, p. 221-234, 2005.

BLANN, A. D. et al. Plasma Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptor Flt-1 in Patients With Hyperlipidemia and Atherosclerosis and the Effects of Fluvastatin or Fenofibrate. **The American Journal of Cardiology**, v. 87, p. 1160-1163, 2001.

BORG, S. A. et al. Correlation of VEGF production with IL1a and IL6 secretion by human pituitary adenoma cells. **European Journal of Endocrinology**, v. 152, p. 293-300, 2005.

BRAKENHIELM, E. et al. Adiponectin-induced antiangiogenesis and antitumor activity involve caspase-mediated endothelial cell apoptosis. **PNAS**, v. 101, p. 2476-2481, 2004.

CAO, Y. Angiogenesis modulates adipogenesis and obesity. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, p. 2362-2368, 2007.

CAO, Y. Endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic implications. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 33, p. 357-369, 2001.

CAUCHI, S. et al. Effects of TCF7L2 polymorphisms on obesity in European populations. **Obesity (Silver Spring)**, v. 16, p. 476-482, 2008.

CELEC, P.; YONEMITSU, Y. Vascular endothelial growth factor - basic science and its clinical implications. **Pathophysiology**, v. 11, p. 69-75, 2004.

COULON, S. et al. Evaluation of inflammatory and angiogenic factors in patients with non-alcoholic fatty liver disease. **Citokyne**, v. 59, p. 442-449, 2012.

DESPRÉS, J.-P., LEMIEUX, I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. **Nature**, v. 444, p. 881-887, 2006.

DUBOIS, S. et al. Glucose inhibits angiogenesis of isolated human pancreatic islets. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 45, p. 99-105, 2010.

ELIAS, I. et al. Adipose Tissue Overexpression of Vascular Endothelial Growth Factor Protects Against Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance. **Diabetes**, v. 61, p. 1801-1813.

EREN, P. et al. Adiponectinemia Controls Pro-Angiogenic Cell Therapy. **Stem Cells**, v. 27, p. 2712-2721, 2009.

ERRERA, F. I. V. et al. COL18A1 is highly expressed during human adipocyte differentiation and the SNP c.1136C>T in its "frizzled" motif is associated with obesity in diabetes type 2 patients. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 80, p. 167-177, 2008.

FAROOQI, I. S. Genetic and hereditary aspects of childhood obesity. **Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 19, p. 359-374, 2005.

FAIN, J. N. et al. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. **Endocrinology**, v. 145, p. 2273-2282, 2004.

FERRARA, N. Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress. **Endocrine Reviews**, v. 25, p. 581-611, 2004.

FOLKMAN, J. Angiogenesis. **Annual Review of Medicine**, v. 57, p. 1-18, 2006.

GARCÍA DE LA TORRE, N. et al. Effects of weight loss after bariatric surgery for morbid obesity on vascular endothelial growth factor-A, adipocytokines, and insulin. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 93, p. 4276-4281, 2008.

GIL, A. et al. Is adipose tissue metabolically different at different sites? **International Journal of Pediatric Obesity**, v. 6, p. 13-20, 2011.

GÓMEZ-AMBROSI, J. et al. Involvement of serum vascular endothelial growth factor family members in the development of obesity in mice and humans? **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, p. 774-780, 2009.

GRAY, S. L.; VIDAL-PUIG, A. J. Adipose tissue expandability in the maintenance of metabolic homeostasis. **Nutrition Reviews**, v. 65, p. S7-12, 2007.

GUO, Y. et al. Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer. **Cancer Treatment Reviews**, v. 38, p. 904-910, 2012.

HAJER, G. R.; HAEFTEN, T. W.; VISSEREN, F. L. J. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. **European Heart Journal**, v. 29, p. 2959-2971, 2008.

HAO, Q.; WANG, L.; TANG, H. Vascular endothelial growth factor induces protein kinase D-dependent production of proinflammatory cytokines in endothelial cells. *American Journal of Physiology*, **Cell Physiology**, v. 296, p. 821-827, 2009.

HEDEBRAND, J.; HINNEY, A. Environmental and Genetic Risk Factors in Obesity. **Child and Adolescent Psychiatric Clinics of North America**, v. 18, p. 83-94, 2009.

HENRIKSON, R. C.; KAYE, G. I.; MAZURKIEWICZ, J. E. National Medical Series for Independent Study. **NMS: Histology**. 3. ed. 512p., 1997.

HERRERA, B. M.; LINDGREN, C. M. The Genetics of Obesity. **Current Diabetes Reports**, v. 10, p. 498-505, 2010.

HOEBEN, A. et al. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis. **Pharmacological Reviews**, v. 56, p. 549-580, 2004.

HOFSTAETTER, J. G. et al. Age-dependent expression of VEGF isoforms and receptors in the rabbit anterior cruciate ligament. **Miochimica et Biophysica Acta**, v. 1770, p. 997-1002, 2007.

HUANG, Q. Y. et al. Linkage and association of the CA repeat polymorphism of the IL6 gene, obesity-related phenotypes, and bone mineral density (BMD) in two independent Caucasian populations. **Journal of Human Genetics**, v. 48, p. 430-437, 2003.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009. Antropometria e Estado Nutricional de Crianças, Adolescentes e Adultos no Brasil. 2010.

IDF. The International Diabetes Federation Consensus Worldwide Definition of the Metabolic Syndrome, 2006.

IOZZO, P. Myocardial, Perivascular and Epicardial Fat. **Diabetes Care**, v. 34, p. S371-S379, 2011.

JANG, J. J. et al. Angiogenesis Is Impaired by Hypercholesterolemia Role of Asymmetric Dimethylarginine. **Circulation**, v. 102, p. 1414-1419, 2000.

KARASTERGIOU, K. et al. Sex differences in human adipose tissues - the biology of pear shape. **Biology of Sex Differences**, v. 2, p 1-12, 2012.

KERN, P. A. et al. Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor-alpha expression. **Diabetes**, v. 52, p. 1779–1785, 2003.

KERSHAW, E. E.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, p. 2548-2556, 2004.

KIESS, W. et al. Adipocytes and adipose tissue. **Best Practice and Research, Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 22, p. 135-153, 2008.

KLUNDER-KLUNDER, M. et al. rs12255372 variant of TCF7L2 gene is protective for obesity in Mexican children. **Archives of Medical Research**, v. 42, p. 495-501, 2011.

KOPELMAN, P. G. Obesity as a medical problem. **Nature**, v. 404, p. 635-643, 2000.

LEDOUX, S. et al. Angiogenesis associated with visceral and subcutaneous adipose tissue in severe human obesity. **Diabetes**, v. 57, p. 3247-3257, 2008.

LIEB, W. et al. Vascular endothelial growth factor, its soluble receptor, and hepatocyte growth factor: clinical and genetic correlates and association with vascular function. **European Heart Journal**, v. 30, p. 1121-1127, 2009.

LIU, Y. J. et al. Molecular and Genetic Mechanisms of Obesity: Implications for Future Management. **Current Molecular Medicine**, v. 3, p. 325-340, 2003.

LAWRENCE, V. J.; KOPELMAN, P. G. Medical Consequences of Obesity. **Clinics in Dermatology**, v. 22, p. 296-302, 2004.

LING, L. et al. Worse Clinical Outcomes in Acute Myocardial Infarction Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: Relevance to Impaired Endothelial Progenitor Cells Mobilization. **PLoS ONE**, v. 7, p. e50739 1-10, 2012.

LOEBIG, M. et al. Evidence for a Relationship between VEGF and BMI Independent of Insulin Sensitivity by Glucose Clamp Procedure in a Homogenous Group Healthy Young Men. **PLoS ONE**, v. 5, e12610, 2010.

LOSS, R. J. F.; BOUCHARD, C. Obesity - is it a genetic disorder? **Journal of Internal Medicine**, v. 254, p. 401-425, 2003.

LOTTA, S. e PILAHJANIEMI, T. The multiple functions of collagen XVIII in development and disease. **Matrix Biology**, v. 30, p. 83-92, 2011.

MALTA, D. C. et al. A Construção da Vigilância e Prevenção das Doenças Crônicas Não Transmissíveis no Contexto do Sistema Único de Saúde. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 15, p. 47-65, 2006.

MIENO, S. et al. Aging is associated with an impaired coronary microvascular response to vascular endothelial growth factor in patients. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 132, p. 1348-1355, 2006.

MIGUEL, G. P. et al. Erosive esophagitis after bariatric surgery: banded vertical gastrectomy versus banded Roux-en-Y gastric bypass. **Obesity Surgery**, v. 21, p. 167-172, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Brasil. Inquérito Domiciliar sobre Comportamentos de Risco e Morbidade Referida de Doenças e Agravos Não Transmissíveis. 2003.

MIYAZAWA-HOSHIMOTO, S. et al. Elevated serum vascular endothelial growth factor is associated with visceral fat accumulation in human obese subjects. **Diabetologia**, v. 46, p. 1483-1488, 2003.

MIYAZAWA-HOSHIMOTO, S. et al. Roles of degree of fat deposition and its localization on VEGF expression in adipocytes. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**, v. 288, p. 1128-1136, 2005.

NAKAMURA, N. et al. Adiponectin promotes migration activities of endothelial progenitor cells via Cdc42/Rac1. **FEBS Letters**, v. 583, p. 2457-2463, 2009.

NANNIPIERI, M. et al. Pattern of expression of adiponectin receptors in human adipose tissue depots and its relation to the metabolic state. **International Journal of Obesity**, v. 31, p. 1843-1848, 2007.

NIH (National Institutes of Health). Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation and Treatment of Overweight and Obesity in Adults. The Evidence Report. **NIH Publication**, n. 98-4083, 1998.

NIH (National Institutes of Health). Understanding Adult Obesity. Weight-control Information Network. **NIH Publication**, n. 01-3680, 2001.

NOMA, H. et al. Vitreous Levels of Interleukin-6 and Vascular Endothelial Growth Factor in Macular Edema with Central Retinal Vein Occlusion. **Ophthalmology**, v. 116, p. 87-93, 2009.

OKAMOTO, Y. et al. Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. **Circulation**, v. 106, p. 276-2770, 2002.

OREN, Z. et al. Cellular Dysfunction in the Diabetic Fibroblast Impairment in Migration, Vascular Endothelial Growth Factor Production, and Response to Hypoxia. **American Journal of Pathology**, v. 162, p. 303-312, 2003.

OUCHI, N. et al. Adiponectin Stimulates Angiogenesis by Promoting Cross-talk between AMP-activated Protein Kinase and Akt Signaling in Endothelial Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 1304-1309, 2004.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, p. 2002-2007, 2001.

QUEIROZ, J. C. F. et al. Controle da Adipogênese por ácidos graxos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 53, p. 582-594, 2009.

REGA, G. et al. Vascular Endothelial Growth Factor Is Induced by the Inflammatory Cytokines Interleukin-6 and Oncostatin M in Human Adipose Tissue In Vitro and in Murine Adipose Tissue In Vivo. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 27, p. 1587-1595, 2007.

RIVARD, A. et al. Age-Dependent Impairment of Angiogenesis. **Circulation**, v. 99, p. 111-120, 1999.

ROSS, M. H.; PAWLINA, W. **Histologia** - Em correlação com biologia celular e molecular. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 908p., 2008.

ROTH, J. et al. The Obesity Pandemic: Where Have We Been and Where Are We Going? **Obesity Research**, v. 12, p. 88-101, 2004.

RUPINICK, M. A. et al. Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature. **PNAS**, v. 99, p. 10730-10735, 2002.

RYU, J. K. et al. Downregulation of angiogenic factors and their downstream target molecules affects the deterioration of erectile function in a rat model of hypercholesterolemia. **Urology**, v. 67, p. 1329-1334, 2006.

SAELY, C. H.; GEIGER, K.; DREXEL, H. Brown versus White Adipose Tissue: A Mini-Review. **Gerontology**, v. 58, p. 15-23, 2012.

SEIDA, A. et al. Serum bFGF levels are reduced in Japanese overweight men and restored by a 6-month exercise education. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders**, v. 27, p. 1325-1331, 2003.

SETHI, J.; VIDAL-PUIG, A. J. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. **Journal of Lipid Research**, v. 48, p. 1253- 1262, 2007.

SIERVO, M. et al. Body mass index is directly associated with biomarkers of angiogenesis and inflammation in children and adolescents. **Nutrition**, v. 28, p. 262-266, 2012.

SILHA, J. V. et al. Angiogenic factors are elevated in overweight and obese individuals. **International Journal of Obesity**, v. 29, p. 1308-1314, 2005.

SILHA, J. V. et al. Plasma resistin, adiponectin and leptin levels in lean and obese subjects: correlations with insulin resistance. **European Journal of Endocrinology**, v. 149, p. 331–335, 2003.

SHIBATA, R. et al. Adiponectin Stimulates Angiogenesis in Response to Tissue Ischemia through Stimulation of AMP-activated Protein Kinase Signaling. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 28670-28674, 2004.

SUN, K. et al. Adipose tissue remodeling and obesity. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 121, p. 2094-2101, 2011.

TABASSUM, R. et al. Common variants of IL6, LEPR, and PBEF1 are associated with obesity in Indian children. **Diabetes**, v. 61, p. 626-631, 2012.

TAN, C. Y.; VIDAL-PUIG, A. Adipose tissue expandability: the metabolic problems of obesity may arise from the inability to become more obese. **Biochemical Society Transactions**, v. 36, p. 935-940, 2008.

UKKOLA, O.; SANTANIEMI, M. Adiponectin: a link between excess adiposity and associated comorbidities? **Journal of Molecular Medicine**, v. 80, p. 696-702, 2002.

VIRTUE, S.; VIDAL-PUIG, A. J. It's not how fat you are, It's what you do with it that counts. **PLOS Biology**, v. 6, p. e237 1819-1823, 2008.

WHO (World Health Organization). Controlling the Global Obesity Epidemic. **Nutrition**, 2012b. Disponível em: <<http://www.who.int/nutrition/topics/obesity/en/>>. Acesso em: out. 2012.

WHO (World Health Organization). Obesity and Overweight. Fact sheet n. 311. **Media Centre**, 2012a. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. Acesso em: out. 2012.

WHO (World Health Organization). Obesity: preventing and managing the global epidemic. **WHO Technical Report Series**, Geneva, v. 894, 2000.

WHO (World Health Organization). Obesity. Situation and Trends. **Global Health Observatory**, 2012d. Disponível em: <http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/obesity_text/en/index.html>. Acesso em: out. 2012.

WHO (World Health Organization). Overweight. Situation and Trends. **Global Health Observatory**, 2012c. Disponível em: <http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight_text/en/index.html>. Acesso em: out. 2012.

WHO (World Health Organization). Prevalence of Obesity, ages 20+, age standardized Both sexes. **Global Health Observatory Map Gallery**, 2008b. Disponível em: <http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_Obesity_BothSexes_2008.png>. Acesso em: out. 2012.

WHO (World Health Organization). Prevalence of Overweight, ages 20+, age standardized Both sexes. **Global Health Observatory Map Gallery**, 2008a. Disponível em: <http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_Overweight_BothSexes_2008.png>. Acesso em: out. 2012.

WHO (World Health Organization). Who Global Infobase. **Data for Saving Live**. 2011. Disponível em: <<https://apps.who.int/infobase/Indicators.aspx?ISO3=bra>>. Acesso em: out. 2012.

WRONSKA, A.; KMIEC, Z. Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. **Acta Physiologica**, v. 205, p. 194-208, 2012.

WEEDON, M. N. The importance of TCF7L2. **Diabetic Medicine**, v. 24, p. 1062-1066, 2007.

YAMAUCHI, T. et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. **Nature Medicine**, v. 7, p. 941- 946, 2001.

YANG, W.; KELLY, T.; HE, J. Genetic Epidemiology of Obesity. **Epidemiologic Reviews**, v. 29, p. 49-61, 2007.

8 ANEXOS

8.1 Anexo I - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Declaro que concordo em participar do projeto “Estudo genético e molecular da obesidade”. Este projeto faz parte de uma linha de pesquisa que tem como objetivo buscar uma melhor compreensão dos fatores genéticos relacionados com o diabetes e obesidade. Fui informado que esse estudo é independente do meu tratamento no hospital, que devo manter todas as recomendações médicas e que será realizada uma coleta de 5ml de sangue, como ocorre em qualquer exame laboratorial de rotina, e que a mesma será realizada com material estéril e descartável. O sangue coletado será utilizado para dosagens laboratoriais e estudo do meu material genético-DNA. Autorizo a utilização do meu DNA, bem como as informações obtidas na entrevista e nos exames laboratoriais, para os objetivos desse projeto e de outros relacionados a obesidade e diabetes,. Tenho a liberdade de cancelar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que isso traga prejuízo ao meu atendimento e tratamento. Me foi dada a garantia de não ser identificado (a) e que todos os dados referentes a mim serão confidenciais, podendo ser acessados por mim e pelos pesquisadores envolvidos a qualquer tempo.

Por este documento, tomo parte voluntariamente do presente estudo.

Local: _____ Data: _____

Assinatura do paciente

Assinatura do entrevistador

Assinatura do pesquisador responsável

Pesquisadora responsável: Flavia Imbroisi Valle Errera Tel:3334-3547/3340-1353

Comitê de ética em Pesquisa da EMESCAM: 3334-3586 email: comite.ética@emescam.br

Av. Nossa Senhora da Penha, 2190 - Prédio central da EMESCAM, 2º andar

8.2 Anexo II - Modelos de Fichas para Coleta de Dados

Ficha com as informações clínicas obtidas dos prontuários

Nome: _____ RGHC: _____

DN: _____ Idade: _____ Local do Nascimento: _____

Feminino () Masculino () Cor: B () MC () MM () ME () N ()

Endereço: _____ N°: _____

Bairro: _____ Cidade: _____

Tel: _____ Tel: _____ Cel: _____

Altura: _____ peso: _____ IMC: _____ Cintura: _____ Quadril: _____ WHR: _____

Tem parente no ambulatório? Não () Sim () Nome: _____

_____ Tel: _____

Fumo: Não () Sim () Ex- fumante 1 ano () 5 anos () OBS: _____

Álcool: Não () Sim () Socialmente () Todos os dias () OBS: _____

Exercício: Não () Sim () Às vezes () 3x semana ou mais ()

Obesidade: Sim () Não () Tipo: _____

Operada: Não () Sim () Quando? _____

Hipertensão: () Não Sim () PA: _____ Duração: _____

Antes do DM () Após DM () Antes OB () Após OB ()

Tipo de Diabetes: Tipo I () Tipo II () Outros () Início: _____ Duração: _____

OBS: _____

Sintomas: _____

Insulina no 1º ano? Sim () Não ()

Complicações: Cardiovasculares(). Angina(). Infarto(). AVC(). Trombose().

Renais() Neurológicas(). Artrite(). Artrose().

Relacionadas a visão : Retinopatia() Refrativo() Catarata() Glaucoma()

Outras Doenças: _____

Medicação: _____

Em qual tipo abaixo você se identifica:

() branco () negro () mulato () índio () outros

Descendência Avós Maternos _____

Descendência Avós Paternos _____

Listagem de Exames Laboratoriais

Dosagens:

___/___/___	___/___/___	___/___/___	___/___/___	___/___/___
—	—	—	—	—
Uréia	Uréia	Uréia	Uréia	Uréia
Creatinina	Creatinina	Creatinina	Creatinina	Creatinina
Colesterol	Colesterol	Colesterol	Colesterol	Colesterol
LDL	LDL	LDL	LDL	LDL
HDL	HDL	HDL	HDL	HDL
Triglicerídeos	Triglicerídeos	Triglicerídeos	Triglicerídeos	Triglicerídeos
Sódio	Sódio	Sódio	Sódio	Sódio
Potássio	Potássio	Potássio	Potássio	Potássio
TSH	TSH	TSH	TSH	TSH
T3	T3	T3	T3	T3
T4	T4	T4	T4	T4
Glicemia	Glicemia	Glicemia	Glicemia	Glicemia
Gli prandial	Gli prandial	Gli prandial	Gli prandial	Gli prandial
Hb glicada	Hb glicada	Hb glicada	Hb glicada	Hb glicada

Histórico Familiar:

Obesidade: _____

Diabetes: _____

Hipertensão: _____

Dislipidemias: _____

Doença Cardiovascular: _____

Tireoideopatias: _____

Câncer: _____

Asma: _____

Cefaléia: _____

Surdez: _____