

**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS**

**UNIVERSIDADE PRESBITERIANA MACKENZIE**

## **TÍTULO**

**Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma Gama (PPAR $\gamma$ ):  
investigação da associação com marcadores do metabolismo de lipídios e  
glicose e composição da dieta**

## **Pesquisadores**

Ana Paula Pimentel Costa<sup>1</sup>; Yoshimi Yamamoto<sup>2</sup>, Rosana Farah<sup>3</sup>, Marina Lemos da Cunha<sup>4</sup>, Ana Luiza Abdo Aganame<sup>5</sup>, Murilo Correa<sup>4</sup> e Tania Marsulo<sup>6</sup>

1 Professora Doutora- Ciências Biológicas, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/ UPM, líder do projeto

2 Professora Doutora- Farmácia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/ UPM,, colaborador do projeto

3 Professora Doutora- Nutrição, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/ UPM,colaborador do projeto

4 Aluno de graduação, Curso de Farmácia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/ UPM

5 Aluno de graduação, Curso de Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/ UPM

6 Aluno de graduação, Curso de Nutrição do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/ UPM

## Introdução

Os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs) são fatores de transcrição pertencentes à família de receptores nucleares que regulam a homeostase da glicose, metabolismo de lipídeos e inflamação. Três proteínas, codificadas por genes distintos têm sido identificadas: PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$  e PPAR $\gamma$ , que controlam a expressão gênica pela ligação a elementos responsivos específicos (PPREs) localizados na região promotora. O gene PPAR $\gamma$  humano é conhecido por induzir adipogênese pela interação com outros fatores de transcrição e por controlar a expressão de enzimas chave do metabolismo de lipídios (SPIEGELMAN, 1998; GERVOIS *et al.*, 2000; OLEFSKY, 2000). PPAR $\gamma$  também está intimamente implicado na regulação da homeostase da glicose e sensibilidade à insulina (LATRUFFE *et al.*, 1997; HAMADA *et al.*, 2007).

Foram identificados, até o momento, sete polimorfismos no gene PPAR. Entre estes polimorfismos, o polimorfismo Pro12Ala (a substituição de uma alanina por prolina na posição 12 no éxon B da parte NH<sub>2</sub> terminal) no PPAR $\gamma$ 2 (PPAR $\gamma$ 2<sup>Pro12ALA</sup>) é o mais comum. Este polimorfismo, identificado em 1997, apresenta diferentes frequências alélicas de acordo com a etnia com uma variação, por exemplo, de 12% em caucasianos a 1% em chineses (STUMVOLL e HARING, 2002). O PPAR $\gamma$ 2<sup>Pro12ALA</sup> tem sido associado a um índice de massa corporal (IMC) mais baixo, aumento da sensibilidade à insulina e resistência ao risco de DM2 em indivíduos portadores deste polimorfismo (HE, 2009).

Conforme descrito por Dedoussis *et al.* (2010), a relação do polimorfismo PPAR $\gamma$ 2<sup>Pro12ALA</sup> e diversas desordens metabólicas incluindo DM2, sensibilidade à insulina, variações lipídicas e obesidade tem sido amplamente investigada. Logo após a identificação deste polimorfismo, um estudo independente demonstrou que a variante Ala12 está associada com a diminuição da função de transativação do PPAR $\gamma$ 2 e menor IMC. Estudos posteriores indicaram que o efeito na massa corporal é mais complexo, pois o mesmo polimorfismo resulta em diferentes respostas em diferentes grupos étnicos (HE, 2009).

Uma das mais consistentes associações do polimorfismo PPAR $\gamma$ 2<sup>Pro12ALA</sup> descrita é a associações do alelo Ala12 com alta sensibilidade à insulina (DEBB *et al.*, 1998, KOCH *et al.*, 1999), embora existam estudos nos quais esta associação não foi encontrada (MORI *et al.*, 1998, HASSTED *et al.*, 2001). A razão destas discrepâncias pode estar relacionada ao componente étnico das amostras, de gênero e desenho da pesquisa (EK *et al.*, 2001, TAVARES *et al.*, 2005). Considera-se que o polimorfismo PPAR $\gamma$ 2<sup>Pro12ALA</sup> está em desequilíbrio de ligação

para a mutação funcional do gene PPAR que pode ter efeito direto na sensibilidade à insulina. Uma vez que a resistência à insulina pode ser um fator de risco para DM2, aumento da sensibilidade à insulina pode ser um dos mecanismos, com o qual o alelo Ala12 protegeria contra o DM2 (TAVARES *et al.*, 2005).

Dado ao papel proadipogênico do PPAR $\gamma$ 2, é esperado que uma redução moderada na função de transativação resulte em IMC menor em portadores do PPAR $\gamma$ 2<sup>Pro12ALA</sup>. Sabe-se que a regulação da fisiologia do tecido adiposo é complexa, assim, vários estudos sugerem interação com fatores ambientais, tais como o tipo de dieta, modelando os padrões de associação do polimorfismo PPAR $\gamma$ 2<sup>Pro12ALA</sup> com a composição de gordura corporal em diferentes populações humanas. Tipicamente, dietas com alto teor de ácidos graxos saturados estão relacionadas positivamente com a resistência à insulina, enquanto dietas com alto teor de ácidos graxos poli-insaturados aumentam a sensibilidade à insulina.

Nos estudos realizados por Luan *et al.* (2001), foi demonstrado que o polimorfismo PPAR $\gamma$ 2<sup>Pro12ALA</sup> modifica a razão entre ácidos graxos poli-insaturado e saturados (razão P:S) e a insulina plasmática na população inglesa analisada. A ingestão na dieta de menor proporção de ácidos graxos poli-insaturados em relação a ácidos graxos saturados estava associada com maior IMC em portadores do alelo Ala em comparação com os homozigotos Pro12, com um efeito oposto para uma razão P:S mais alta. De modo similar, a ingestão de ácidos graxos monoinsaturados também apresentou este efeito em portadores do alelo Ala12 (MEMISOGLU *et al.*, 2003). Em outro estudo, a ingestão de gorduras totais e gorduras saturadas apresentou correlação positiva com a alteração da massa corporal em homozigotos Pro12, enquanto portadores do alelos Ala12 estavam protegidos (ROBITAILLE *et al.*, 2003).

Dentre os múltiplos mecanismos, contribuem para a patogênese da sensibilidade à insulina, entre outros, a obesidade e quantidade de tecido adiposo são de fundamental importância. Ácidos graxos livres liberados do tecido adiposo via lipólise são mediadores chave da sensibilidade à insulina (VACCARO *et al.*, 2002). Portanto, acredita-se que a regulação pelo PPAR $\gamma$  de genes envolvidos no metabolismo de ácidos graxos livres deve por sua vez contribuir na modulação da sensibilidade à insulina. Uma supressão mais eficiente da lipólise no tecido adiposo e menor nível de ácidos graxos livres circulantes foi observada, sob condições experimentais, em portadores do alelo Ala, em comparação com os não portadores corroborando esta hipótese (STUMVOLL *et al.*, 2001). Portanto, a relação entre o polimorfismo PPAR $\gamma$ 2<sup>Pro12ALA</sup> com os níveis circulantes de ácidos graxos livres sob condições fisiológicas devem ser investigados; assim como as associações combinadas do teor de ácidos graxos na

dieta, o polimorfismo PPAR $\gamma$ 2<sup>Pro12ALA</sup> e outros marcadores do metabolismo de lipídios e glicose descritos como componentes da síndrome de resistência à insulina.

Alguns estudos demonstram a clara associação entre este polimorfismo com menor IMC, aumento da sensibilidade à insulina, e resistência ao risco de DM2. Estudos posteriores com diferentes populações étnicas, contudo, revelaram resultados conflitantes, sugerindo uma interação complexa entre o polimorfismo PPAR $\gamma$ 2<sup>Pro12ALA</sup> e fatores ambientais como a composição da dieta (HE,2009; MORI *et al.*, 2001; Lindi *et al.*, 2002; Dedoussis *et al.*, 2010).

Neste ponto, um estudo com a população brasileira notadamente miscigenada mostra-se extremamente vantajoso. É sabido que a população brasileira constitui um dos grupos mais heterogêneos do mundo, como resultado de cruzamentos interétnicos entre europeus, africanos, ameríndios e asiáticos (ALVES-SILVA *et al.*, 2000). Há raros dados sobre esse tipo de estudo na população brasileira, o que evidencia a importância de um estudo nessa área. Desse modo, os dados do presente projeto serão importantes fontes de comparação com trabalhos já realizados com populações européias, africanas e asiáticas, assim como para o reconhecimento da influência de tais aspectos em nossa população.

### **Objetivos**

Este trabalho tem como objetivo verificar a relação entre o polimorfismo PPAR $\gamma$ 2<sup>Pro12ALA</sup> com os níveis circulantes de ácidos graxos livres sob condições fisiológicas; através da investigação das associações combinadas do teor de ácidos graxos na dieta, analisar a frequência do polimorfismo PPAR $\gamma$ 2<sup>Pro12ALA</sup> e outros marcadores do metabolismo de lipídios e glicose descritos como componentes da síndrome de resistência à insulina, e testar a hipótese de associação, tendo como base a análise de sujeitos atendidos no Laboratório Escola de Análises Clínicas e Toxicológicas da UPM

## **Metodologia**

### **Casística**

As amostras de sangue foram colhidas de sujeitos atendidos no Laboratório de Análises Clínicas, Toxicológicas e de Biologia Molecular da Universidade Presbiteriana Mackenzie (São Paulo, SP) que fizeram dentro da rotina de exames, dosagem plasmática de colesterol e frações, triglicérides e glicose. A autorização para o estudo genético de cada sujeito foi realizada após entrevista, na qual foram expostas as informações sobre o trabalho, seguidas do preenchimento do termo de consentimento livre e esclarecido. Após o consentimento, foram colhidas amostras de sangue periférico para a extração de DNA genômico e triagem do polimorfismo do gene em estudo. Os sujeitos também autorizaram a consulta aos resultados aos seus exames de dosagem de colesterol e frações e triglicérides e c

A presente pesquisa foi amparada pelo parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UPM.

### **Determinações bioquímicas**

As concentrações séricas de colesterol total, HDL colesterol, triglicérides e glicose foram determinadas por métodos enzimático-colorimétricos. As concentrações de LDL e VLDL colesterol forma calculadas pela fórmula de Friedwald (1972).

A classificação das alterações glicêmicas foi baseada nos critérios da ADA (2010) e apoiada pela OMS. Os pontos de corte adotados para a classificação de dislipidemia serão os recomendados pela III Diretriz Brasileira de Dislipidemia (2001).

### **Variáveis antropométricas**

Todas as medidas antropométricas foram obtidas em duplicata utilizando-se a media para os cálculos dos índices antropométricos e registradas em formulário.

**Peso e altura:** as medidas de peso (em kilograma) e altura (em metros) foram obtidas em balança digital (capacidade de 150 kg, precisão de 10 g) e em estadiômetro portátil, respectivamente. Estas medidas foram realizadas com o mínimo de roupa possível e sem sapatos. O índice de massa corporal (IMC) foi obtido dividindo-se o peso (kg) pela altura (m) ao quadrado, utilizando-se a classificação do estado nutricional preconizada pela Organização Mundial da Saúde

**Circunferência da cintura:** a circunferência foi obtida utilizando-se fita métrica inelástica, tendo como ponto de referencia o plano horizontal na altura da cicatriz umbilical, com o funcionário em pé, abdome relaxado, os braços ao longo do corpo e pés unidos. Para classificação da obesidade central foram considerados os pontos de corte para risco de complicações metabólicas (WHO, 2003).

### **Extração de DNA**

A extração de DNA foi realizada após a coleta por punção venosa de 5 ml de sangue periférico utilizando o método de precipitação salina, segundo a técnica descrita por Miller *et al.* (1988).

As amostra de DNA obtidas foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,7% para quantificação utilizando marcadores de concentração ( $\lambda$  DNA, Invitrogen).

### **Análise do polimorfismo Pro12Ala.**

O segmento do gene PPAR- $\gamma$  englobando o sítio polimórfico Pro12Ala foi amplificado através de PCR. Foram utilizados dois iniciadores a jusante (P1 e P2) e um iniciador comum a montante (P3). O iniciador P1(5'-GTGTATCAGTGAAGGA ATCGCTTCTTG-3') era específico para o alelo C (Pro); e o iniciador P2 (5'-TTGTGATATGTTTGCAGACAAGGTATCAGTGAAGGAATCGCTTGTGC-3') liga-se ao alelo G (Ala). O iniciador a montante P3 era 5'-TTTCTGTG TTTATCCCATCTCTCCC-3'. As bases destacadas indicam os "mismatches" que mantêm a especificidade de cada reação de amplificação (RUST *et al.*, 1993).

Cada reação de PCR foi realizada em um volume final 25 µl contendo 100 ng de DNA genômico, 10 pmol dos iniciadores P1 e P3, 5 pmol do iniciador P2, 200 mmol/l DNTPs, 3 mM MgCl<sub>2</sub> e 1 u de Taq polimerase em tampão (50 mmol/l of KCl, 1.5mmol/l of MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol/l Tris-HCl pH9.0 ). As condições da PCR: desnaturação inicial de 94 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 45 s, anelamento 62 °C por 45 s e extensão de 72 °C por 45 min, com a extensão final de 3 min a 72 °C. Um produto de 230 pb identifica o alelo Pro, e um produto de 250pb identifica o alelo Ala.

Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 3,0% e visualizado através de coloração com Syber Safe (Invitrogen).

### **Análise dos resultados**

A análise estatística foi realizada utilizando o programa PASW Statistics 21 (SPSS Inc. Chicago, EUA). O teste t de Student foi utilizado para comparar as variáveis contínuas (com nível de significância de 5%) – expressas em médias e desvio-padrão. As distribuições gênicas e genóticas foram calculadas para testar se as proporções estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. As freqüências alélicas e genóticas foram comparadas através do teste do Qui-quadrado com nível de significância de 5%.

## Resultados e Discussão

Dentro das análises bioquímicas inicialmente previstas neste projeto estava a determinação sérica dos ácidos graxos livres. Esta determinação quantitativa *in vitro* dos ácidos graxos livres seria realizada pelo método colorimétrico enzimático Wako NEFA C teste (Wako chemical, Neuss, Germany). Contudo problemas relativos a distribuição deste reagente e seu alto custo inviabilizaram estas análises. Seria também realizada a avaliação da composição corporal através de bioimpedanciometria e a avaliação do consumo alimentar através de um questionário. Estas análises seriam realizadas conjuntamente através de uma entrevista onde seria realizada a anamnese e a bioimpedanciometria. Este processo só foi realizado com menos de 10% dos indivíduos atendidos dada a baixa adesão dos voluntários, uma vez que cada entrevista demandava em média 45 - 50 minutos. Sendo assim, estes dados foram desconsiderados na nossa análise.

### 1- Caracterização da população estudada

Segundo a *International Diabetics Federation*, são considerados como parâmetros marcadores da resistência a insulina, a presença de obesidade abdominal, com circunferência abdominal superior a 94 cm em homens e 80 cm em mulheres, e ao menos duas das seguintes alterações: distúrbio do metabolismo glicêmico, que inclui a hiperglicemia de jejum ( acima de 99 mg/dl), intolerância a glicose ou o DM; a hipertensão arterial sistêmica (HAS), quando maior ou igual a 130/85mmHg; hipertrigliceridemia superior a 150mg/dl; e HDL-c inferior a 40mg/dl para o homem e 50mg/dl para a mulher.

Sendo assim no nosso estudo foram analisados os parâmetros bioquímicos: glicemia em jejum, colesterol total e frações, triglicérides; e os parâmetros antropométricos: peso (Kg) e altura (cm) para o calculo do IMC e circunferência abdominal (cm).

Foram coletadas amostras de sangue periférico de 166 indivíduos atendidos no Laboratório de Análises Clínicas, Toxicológicas e de Biologia Molecular da Universidade Presbiteriana Mackenzie (São Paulo, SP). A amostra analisada foi composta de 125 mulheres e 41 homens com idades variando entre 17 e 77 anos (média  $39,7 \pm 14,23$  anos). A amostra de pacientes abaixo de 25 anos (6,6%) é bem inferior às amostras com pacientes com idades acima de 25 anos. O numero de indivíduos nas faixas de 35 a 45 anos e acima de 56 anos é



equivalente, com cada faixa correspondendo a 24% da população, já 20 % dos sujeitos estão na faixa de 25 a 35 anos e 28% na faixa de 45 a 56 anos.

**Tabela 1: Parâmetros bioquímicos e antropométricos da população analisada**

	Valor mínimo	Valor Maximo	Media	Desvio padrão
Idade (anos)	17.00	77.00	39.73	14.23
IMC <sup>(1)</sup>	17.20	38.20	26.19	4.00
CA <sup>(2)</sup>	60.00	119.00	85.74	10.71
Colesterol total (mg/dL)	110.00	318.00	182.57	37.76
LDL(mg/dL)	11.00	252.00	110.09	35.31
HDL(mg/dL)	22.00	105.00	48.48	14.00
VLDL(mg/dL)	6.50	163.00	23.30	17.64
Triglicerides (mg/dL)	32.50	357.00	112.32	69.72
Glicose (mg/dL)	63.00	203.00	87.57	15.21

(1) índice de massa corporal (IMC) foi obtido dividindo-se o peso (kg) pela altura (m) ao quadrado.

(2) CA = circunferência abdominal

**Tabela 2: Valores de referência para os parâmetros bioquímicos**

Triglicérides (mg/dL)	Colesterol Total (mg/dL)	HDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)	VLDL (mg/dL)	Glicose (mg/dL)
< 150	<200	>40 H >50 M	<100	Não há	<100

**Tabela 3- Valores de referência para o calculo do IMC**

Valor IMC	Faixa
Abaixo de 17	Muito abaixo do peso
Entre 17 e 18,49	Abaixo do peso
Entre 18,5 e 24,99	Peso normal
Entre 25 e 29,99	Acima do peso
Entre 30 e 34,99	Obesidade
Entre 35 e 39,99	Obesidade severa
Acima de 40	Obesidade mórbida

Considerando-se os valores de referência para as análises bioquímicas (Tabela 2) e IMC (Tabela 3), na população estudada foi observado que todos os parâmetros bioquímicos estão

compatíveis com os níveis de referência. Uma análise individual dos sujeitos indica que 13% (22 indivíduos) apresentam nível de glicose elevada, 35,48 % (58 indivíduos) apresentam nível de colesterol elevado, 53,79% (89 indivíduos) apresentam níveis de HDL elevado, 65,59% (108 indivíduos) apresentam níveis de LDL elevados e 22,5% (37 indivíduos) apresentam níveis elevados de triglicérides.

Em relação ao índice IMC e circunferência abdominal estavam disponíveis dados referentes a 82 sujeitos. Onde 38,2% (31 indivíduos) encontra-se na faixa considerada peso normal, 42% (na faixa acima do peso) 17,7% na faixa obesidade e 5% nas faixas obesidade severa e obesidade mórbida. Os valores de referência para a circunferência abdominal utilizados foram valores inferiores 94 cm em homens e 80 cm em mulheres. Em relação à circunferência abdominal 46% (39 mulheres e 7 homens) dos sujeitos estão na faixa acima dos valores de referência.

As amostras de DNA coletadas foram analisadas para determinação dos genótipos a partir da identificação do sítio polimórfico Pro12Ala do gene PPAR $\gamma$ . Um produto de PCR de 230 pares de base (pb) identifica o alelo Pro, e um produto de 250 pb identifica o alelo Ala. As frequências genotípicas e alélicas, expressas em porcentagem, encontram-se na tabela abaixo.

**Tabela 4: Frequências alélicas e genotípicas da população analisada (n)**

	Frequência genotípica			Frequência alélica	
	Pro/Pro	Pro/Ala	Ala/Ala	Pro	Ala
<b>Total</b> (166)	73,5% (122)	18,2% (30)	8,32% (144)	79,5%	20,5%
<b>Mulheres</b> (125)	72% (91)	18% (22)	9% (12)	81,6%	18,4%
<b>Homens</b> (41)	76% (31)	18,4% (8)	5% (2)	85,4%	14,6%

Os três genótipos do polimorfismo Pro12Ala, Pro12Pro (73,5%), Pro12Ala (18,2%) e Ala12Ala (8,32%) foram encontrados em nossa análise. Não há diferença significativa nas frequências genotípicas Pro12Pro e Pro12Ala em relação ao gênero ( $p \leq 0,05$ ). A distribuição genotípica do Pro12ALA PPAR- $\gamma$ 2 não apresenta desvio significativo do equilíbrio de Hardy Weinberg.

Diferentes trabalhos indicam variação nas frequências alélicas e genotípicas deste polimorfismo. A presença do alelo polimórfico Ala pode variar de 1 a 23% em diferentes grupos étnicos (TAVARES *et al.*, 2007, MIERHAEGHE *et al.*, 2004). Yen *et al.* (1997) reportam

um frequência genotípica de 1,4% para Ala12Ala, 21,2% para Pro12Ala e 77,4% para Pro12Pro em americanos caucasianos, e respectivamente, de 1%, 18% e 80% para americanos de origem mexicana, e 0,1% 5,9% e 94% para afro-americanos. Sanchez *et al.* (2002), ao analisarem uma população espanhola, encontraram uma frequência genotípica de 83%, 16,1% e 0,9% para os genótipos Pro12Pro, Pro12Ala e Ala12Ala, respectivamente. Em estudos com uma população brasileira, Mattevi *et al.* (2002) encontraram frequências genotípicas de 85%, 14% e 1,5% respectivamente para Pro12Pro, Pro12Ala e Ala12Ala. Em um trabalho com populações ameríndias, a frequência do genótipo Pro/Pro e dos genótipos com o alelo ALA foi 79.7 e 20.3 % respectivamente, enquanto a frequência do alelo Ala era de 10.5 %. (Arnaiz-Villena *et al.*, 2013).

De modo geral a frequência do alelo Ala na população é baixa. Foram encontrados valores de 3,2% em japoneses (HARA *et al.*, 2000), 4% em japoneses americanos (nissei) (HAMADA *et al.*, 2007), 12% em venezuelanos caucasianos (FÈRNANDEZ *et al.*, 2009) e 12,9% em australianos (SWARBRICK *et al.*, 2001), 7% em italianos (Costa *et al.*, 2009) , 9% em espanhóis (Gonzalez *et al.*, 2002). O alelo Ala 12 estava ausentes em uma população de africanos do grupo bantu (Scacchi *et al.*, 2007).

Nossos resultados também demonstram uma menor frequência do alelo ALA 12 na amostra analisada. Variações observadas nas frequências genotípicas entre o nosso estudo e dados descritos na literatura refletem a variação inerente a composição da nossa amostragem. Sabe-se que as frequências alélicas e genotípicas podem variar entre os indivíduos do sexo masculino e feminino, assim como entre os diferentes grupos étnicos. A população brasileira reflete o resultado de cinco séculos de miscigenação entre povos de quase todos os continentes (europeus, africanos e asiáticos), bem como de ameríndios autóctones, compondo uma das mais heterogêneas populações do mundo (CARVALHO-SILVA *et al.*, 2001). Assim os resultados obtidos refletem esta miscigenação e também o perfil da nossa população analisada, que era majoritariamente feminina.

## **2- Relação do polimorfismo Pro12Ala com os parâmetros indicadores da resistência a insulina**

O polimorfismo Pro12Ala do gene PPAR gama 2 pode ser relacionado com diferentes componentes da síndrome metabólica e resistência a insulina. Estudos desse gene têm servido para esclarecer os mecanismos que a envolvem, principalmente por ser regulador do

metabolismo de lipídeos e glicose (FERNANDÉZ *et al.*, 2009) e da diferenciação e função dos adipócitos (JENINGA *et al.*, 2009). Estudos para determinar a associação do polimorfismo Pro12Ala com diabetes tipo 2, resistência à insulina e obesidade ainda apresentam uma significância muito controversa (DONGXIA *et al.*, 2008). O mesmo tem ocorrido ao buscar a associação ao perfil de lipídeos (HAMADA *et al.*, 2007). Uma vez que é conhecido que a resistência a insulina está relacionada com distúrbios metabólicos da glicose e/ou lipídicos, muitos estudos investigam a hipótese da relação entre o polimorfismo do gene PPAR $\gamma$ 2 e o nível das concentrações séricas de glicose e lipídios (IWATA *et al.*, 2001).

Foi investigada a possível relação entre as variantes do polimorfismo Pro12Ala do gene PPAR $\gamma$ 2 com as concentrações séricas de colesterol total, HDL, VLDL e LDL colesterol, triglicérides e glicose, além do IMC e medida da circunferência abdominal nas amostras analisadas neste estudo. Os valores médios destes parâmetros foram comparados entre os alelos pelo teste t de Student. Assumiu-se que valores de P menores que 0,05 seriam considerados estatisticamente significantes.

O alelo Pro12 é considerado o alelo selvagem (Ruiz-Narvaez, 2005) e o alelo Ala 12 é associado com o risco reduzido da síndrome metabólica e seus componentes (Huguenin e Rosa 2010; Gouda *et al.*, 2010). Foi descrito que o alelo Ala 12 estaria relacionado com a redução da ativação da transcrição do PPAR $\gamma$ 2 (Debb *et al.* 1998). Isto resultaria em uma menor atividade do PPAR $\gamma$ 2 na promoção da adipogênese, da obesidade associada a síndrome metabólica e suas complicações cardiovasculares (Arnaiz-Villena *et al.*, 2013).

Deste modo os indivíduos Ala 12 homozigotos (isto é, com o genótipo Ala12Ala) foram combinados com os sujeitos heterozigotos Pro12Ala, compondo o grupo Ala/X. Os sujeitos deste grupo foram comparados com os sujeitos homozigotos Pro12Pro em todas as análises estatísticas. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 5.

**Tabela 5: Parâmetros bioquímicos de acordo com o genótipo PPAR $\gamma$ 2 Pro12Ala. Valores expressos em médias  $\pm$  desvio-padrão. (n)**

		<b>Pro12Pro</b>	<b>Ala12/X</b>	<b>P*</b>
<b>Glicose (mg/dL)</b>	Total	88.12 $\pm$ 16.52 (131)	85.46 $\pm$ 8.22 (34)	0,154
<b>Colesterol total (mg/dL)</b>	Total	182.24 $\pm$ 38.87(132)	183.83 $\pm$ 33.57(34)	0,437
<b>HDL (mg/dL)</b>	Total	48.19 $\pm$ 13.93 (132)	49.65 $\pm$ 14.44 (34)	0,548
<b>LDL (mg/dL)</b>	Total	108.86 $\pm$ 36.86 (132)	114.89 $\pm$ 28.51(34)	0,418
<b>VLDL (mg/dL)</b>	Total	24.34 $\pm$ 19.25 (132)	19.27 $\pm$ 7.99 (34)	0,092
<b>Triglicérides (mg/dL)</b>	Total	116.46 $\pm$ 75.08 (132)	96.34 $\pm$ 40.26 (34)	0,105
<b>CA<sup>(1)</sup> (cm)</b>	Total	86.501 $\pm$ 0.84 (66)	82.68 $\pm$ 9.86(16)	0,939
<b>IMC <sup>(2)</sup></b>	Total	26.28 $\pm$ 3.73(66)	25.81 $\pm$ 5.06(16)	0,180

\*valores foram comparados pelo teste t de Student .

(1) CA = circunferência abdominal

(2) índice de massa corporal (IMC) foi obtido dividindo-se o peso (kg) pela altura (m) ao quadrado.

Os dados bioquímicos e antropométricos avaliados neste estudo foram analisados em relação aos genótipos Pro/Pro e Ala /X (Tabela 5). Nenhuma associação estatisticamente significativa foi encontrada entre qualquer um dos parâmetros estudados e os genótipos Pro12Ala do PPAR $\gamma$ 2. Além disso, não foram observadas diferenças significativas nos mesmos parâmetros e os genótipos ao se analisar os sujeitos que apresentavam alguns dos parâmetros bioquímicos e antropométricos analisados acima dos valores de referência (dados não apresentados).

Em um trabalho com populações ameríndias, Arnaiz-Villena *et al.* (2013) não encontraram associação entre genótipos Pro12Ala do PPAR $\gamma$ 2 tanto com análise de todo o grupo amostral bem como na análise de sujeitos obesos. Deeb *et al.* (1988); Dongxia *et al.* (2008) e Fernández *et al.* (2009) perceberam que houve uma diminuição nos níveis de triglicérides nos indivíduos heterozigotos Pro12Ala, em comparação aos homozigotos Pro12Pro. Estes resultados não são consistentes com os encontrados por Hamada *et al.* (2007) e Swarbrick *et al.* (2001), que observaram maior nível de triglicérides no soro de indivíduos carregadores do alelo Ala. Em um estudo realizado em uma população Australiana, o alelo Ala foi relacionado a um perfil mais aterogênico do que o alelo Pro, apresentando níveis menores de HDL (SWARBRICK *et al.*, 2001). Os resultados foram diferentes para a população Chinesa e Finlandesa, em que o alelo Ala foi relacionado com maiores níveis de HDL, em comparação ao alelo Pro (DONGXIA *et al.*, 2008; DEEB *et al.*, 1998).

A grande parte dos trabalhos que tratam sobre estudos de associação sobre o papel do polimorfismo Pro12Ala do PPAR $\gamma$ 2 e sua relação com os marcadores do metabolismo de lipídeos e glicose em populações distintas apresentam resultados muitas vezes controversos. Em alguns estudos, o alelo Ala é associado com menor risco para obesidade em seres humanos (DEEB *et al.*, 1998), já em outros, este alelo é associado com ganho de peso em pacientes obesos (MEIRHAEGUE e AMOUYEL, 2004; MATTEVI *et al.*, 2007). Em contrapartida, é relacionado à proteção contra o desenvolvimento de diabetes tipo 2 em pacientes não obesos (HARA *et al.*, 2000; BACK-NIELSEN *et al.*, 2003; TAVARES *et al.*, 2005; CECIL *et al.*, 2006 e DONGXIA *et al.* 2008) enquanto nos obesos, essa função não está clara (BEN ALI *et al.*, 2009).

Para completar, observou-se que alguns dos efeitos desse polimorfismo são, em alguns casos, restritos ou diferenciais em um grupo específico seja ele caracterizado pelo gênero ou origem étnica (MATTEVI *et al.*, 2007). A diferença étnica é mais um dos motivos para discrepâncias nos estudos de associação. Por exemplo, os estudos de Fornage *et al.* (2005) mostraram que o polimorfismo Pro12Ala apresenta efeitos inversos sobre o IMC em afro – americanos e caucasianos, o que pode ocorrer devido à diferença nos fatores ambientais que exercem influência sobre as duas populações. Também podem existir diferenças étnicas em relação à sensibilidade à insulina (TAVARES *et al.*, 2005). Por exemplo, os estudos de Fornage *et al.* (2005) mostraram que o polimorfismo Pro12Ala apresenta efeitos inversos sobre o IMC em afro – americanos e caucasianos, o que pode ocorrer devido à diferença nos fatores ambientais que exercem influência sobre as duas populações.

Devido à forte influência étnica, torna-se importante também realizar estudos de associação em populações de origens diferentes. Assim, é importante a realização de novos estudos nos quais, com uma amostragem maior de diferentes grupos étnicos, o acúmulo de informações trará importantes subsídios para a melhor compreensão do tema. Neste ponto, um estudo com a população brasileira notadamente miscigenada mostra-se extremamente vantajoso. Há raros dados sobre esse tipo de estudo na população brasileira, o que evidencia a importância de um estudo nessa área (ALVES-SILVA *et al.*, 2000).

Outro fator que pode influenciar a atividade do PPAR gama 2 é a interação gene–gene. Segundo Tavares *et al.* (2005) e Mattevi *et al.* (2007), é possível que o Pro12Ala esteja em desequilíbrio de ligação com uma variante desconhecida em outro lugar do gene, podendo ser por exemplo, uma mutação funcional no gene PPAR gama que pode ter efeito direto na sensibilidade à insulina. Essa pode ser a explicação porque Tavares *et al.* (2005) não tenham encontrado associação entre obesidade e o polimorfismo. A variante pode interagir com várias

combinações genéticas e ambientais em sujeitos normais e obesos, causando efeitos modulatórios no IMC e controle do peso corporal (EK *et al.*, 1999).

Outro ponto importante é o tamanho da amostra analisada. Muitos estudos têm uma amostra de tamanho reduzido para que seja rejeitada ou confirmada definitivamente a hipótese da associação. As amostras devem conter um número grande de indivíduos, para fins estatísticos e devido à baixa frequência do alelo Ala na população em geral (CLÉMENT, 2005).

Dois pontos devem ser considerados na análise dos resultados obtidos neste estudo: a composição da amostra analisada e o número de sujeitos analisados. Na amostra analisada não há uma distribuição equivalente entre os homens e mulheres. Isto é decorrente do público atendido no LACTS da UPM. Os voluntários participantes do projeto eram estudantes universitários, alunos do EJA Mackenzie ou participantes do programa QualiMack. Em todos estes grupos os voluntários eram majoritariamente mulheres. Como o corpo de voluntários se restringiu a população mackenzista isto também acarretou um número de participantes abaixo do esperado. Uma associação com serviços públicos de saúde, por exemplo, seria uma alternativa para a ampliação do número de sujeitos analisados e melhorar a equidade das amostras em relação ao gênero. A ampliação do número de voluntários ao projeto possibilitará contornar problemas como a não adesão a todas as etapas de coleta de dados. Com uma amostragem maior, mesmo não havendo adesão total, poderemos obter um número de sujeitos representativos para a continuidade das análises.

Assim os nossos resultados indicam que na nossa amostra analisada não foi observada associação entre os parâmetros bioquímicos e antropométricos relacionados a resistência à insulina e os genótipos Pro12 Ala do PPAR $\gamma$  2. Para corroborar estes resultados seria necessário aumento do número de indivíduos analisados e melhorar a equivalência entre gêneros presentes na amostra.

É necessário também ampliar os parâmetros analisados incluindo dados sobre a composição da dieta e prática de atividade física. Discute-se que a heterogeneidade de resultados nos estudos pode ser explicada, em partes, pelo fato de a atividade do PPAR gama ser modulada pela ingestão de gorduras através da dieta (BEN ALI *et al.*, 2009). As interações entre gene e nutriente tem papel chave em esclarecer como uma dieta rica em gorduras pode eliminar os efeitos benéficos do polimorfismo Pro12Ala na adiposidade, perfil de lipídeos no plasma e sensibilidade à insulina (KEIKKINEN *et al.*, 2009). Tais fatores dietéticos podem interagir com o gene PPAR gama, levando a diferenças na sensibilidade à insulina em sujeitos com ou sem a substituição Alanina por Prolina, obesos ou em sobrepeso (HARA *et al.*, 2000).

Pode ser que mudanças benéficas na dieta, aumento na prática de atividades físicas com redução no peso possam por si só, modifiquem o impacto genético do alelo Ala, devido à menor incidência de diabetes tipo 2 e melhora na sensibilidade à insulina (HAMADA *et al.*, 2007). O PPAR gama representa, portanto, um *link* direto entre adiposidade, resposta à ingestão alimentar, controle de apetite e balanço de energia (CECIL *et al.*, 2006).

Dentro deste contexto, os nossos resultados são importantes, pois compõem um levantamento de dados para investigar a relação entre o polimorfismo Pro12 Ala com concentrações séricas de glicose e lipídios sob condições fisiológicas, em uma população brasileira. A partir dos dados obtidos novas propostas de investigação podem ser definidas para maior entendimento das associações entre este polimorfismo e fatores envolvidos na susceptibilidade à síndrome metabólica, resistência a insulina. Este levantamento foi iniciado em 2009 no âmbito do projeto “Análise diagnóstica laboratorial de indivíduos da comunidade Mackenzista e da população assistida do entorno para promoção da saúde e fins epidemiológicos”(aprovado pelo Mackpesquisa edital 2009).

A coleta e análise de amostras continuam sendo realizadas, agora no âmbito de outros projetos associados ao LACTs-CCBS e QualiMack. O MackPesquisa será informado, de todos os dados resultantes do prosseguimento deste trabalho, bem como terá o devido crédito nos trabalhos apresentados e/ou publicados oriundos deste estudo.

### **Bibliografia**

- ALVES-SILVA J, Santos MDS, Guimarães PEM, Ferreira ACS, Bandelt HJ, Pena SDJ, *et al.*. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet*;67:444–61. 2000
- Arnaiz-Villena A, Fernández-Honrado M, Areces C, Enríquez-de-Salamanca M, Abd-El-Fatah-Khalil S, Coca C, Arribas I, Algorta M, Rey D. Amerindians show no association of PPAR- $\gamma$ 2 gene Ala12 allele and obesity: an "unthrifty" variant population genetics. *Mol Biol Rep.*;40(2):1767-74. 2013
- BECK-NIELSEN, M.; VAAG, A.; POULSEN, P.; GASTER, M. Metabolic and genetic influence on glucose metabolism in type 2 diabetic subjects - experiences from relatives and twin studies. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. Vol. 17, No. 3, pg. 445–467, 2003.
- BEN ALI, S.; BEN YAHIA, F.; SEDIRI, Y.; KALLEL, A.; FTOUHI, B.; FEKI, M.; ELASMI, M.; HAJ-TAIEB, S.; SOUHEIL, O.; SANHAGI, H.; SLIMANE, H.; JEMAA, R.; KAABACHI, N. Gender-specific effect of Pro12Ala polymorphism in peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ -2 gene on obesity risk and leptin levels in a Tunisian population. *Clinical Biochemistry*. Vol. 42, pg. 1642–1647, 2009.
- CARVALHO-SILVA DR, SANTOS FR, ROCHA J, PENA SD. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. *Am J Hum Genet.*;68(1):281-62001



- CECIL J.E.; WATT P.; PALMER C.N.; HETHERINGTON M. Energy balance and food intake: the role of PPAR gamma gene polymorphisms. *Physiol Behav.* Vol.88; pg.227-233,2006.
- CLÈMENT, K.Genetics of human obesity. *Proc Nutr Soc* . Vol. 64, pg.133–142, 2005.
- COSTA V, Casamassimi A, Esposito K, Villani A, Capone M, Iannella R *et al.* Characterization of a novel polymorphism in PPARγ regulatory region associated with type 2 diabetes and diabetic retinopathy in Italy. *J Biomed Biotechnol* 2009;126917.2009.
- DEDOUSSIS GV, Manios Y, Kourlaba G, Kanoni S, Lagou V, Butler J, Papoutsakis C, Scott RA, Yannakoulia M, Pitsiladis YP, Hirschhorn JN, Lyon HN. An age-dependent diet-modified effect of the PPARγ Pro12Ala polymorphism in children *Metabolism*. doi:10.1016/j.metabol.2010.04.007 .2010 (Epub ahead of print)
- DEEB SS, Fajas L, Nemoto M, Pihlajamaki J, Mykkanen L, Kuusisto J, *et al.*. A Pro12Ala substitution in PPAR2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nat Genet*;20:287-7. 1998.
- DONGXIA, L.; QI H.; LISONG L.; JINCHENG G. Association of peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene Pro12Ala and C161T polymorphisms with metabolic syndrome. *Circ J.* Vol.72, pg.551–557, 2008.
- EK J, Andersen G, Urhammer SA, Hanse L, Carstensen B, Borch JK. Studies of the Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor γ2 gene in relation to insulin sensitivity among glucose tolerant Caucasians. *Diabetologia*;44:1170-6. 2001.
- FERNÁNDEZ, E.; MORALES, L. M.; VARGAS, R.; SANDREA, L.; MOLERO-CONEJO, E.; FERNÁNDEZ, V.; ZAMBRANO, M.; CONNELL, L.; CAMPOS, G.; ARANGUREN-MENDEZ, J. Polimorfismo Pro12Ala del gen PPAR-γ2 síndrome metabólico. Estudio preliminar: *Pro12Ala polymorphism of the PPAR-γ2 gene and the metabolic syndrome. Preliminary study. Acta Bioquím Clín Latinoam.* Vol. 43, nº 01, pg.3-9, 2009.
- FORNAGE, M.; JACOBS JR, D.R.; STEFFES, M. W.; GROSSE, M.D.; BRAY, M.S.; SCHREINER, P. J. Inverse effects of the PPARc2 Pro12Ala polymorphism on measures of adiposity over 15 years in African Americans and whites “The CARDIA study”. *Metabolism Clinical and Experimental.* Vol. 54, pg. 910–917, 2005.
- GERVOIS P., Pinede Torra, I., Fruchart J.C. , Staels, B. Regulation of lipid and lipoprotein metabolism by PPAR activators. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 38: 3–11. 2000.
- GONZALEZ SANCHEZ JL, Serrano RM, Fernandez PC, Laakso M, Martinez Larrad MT Effect of the Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma-2 gene on adiposity, insulin sensitivity and lipid profile in the Spanish population. *Eur J Endocrinol* 147:495–501.2002.
- GOUDA HN, Sagoo GS, Harding AH, Yates J, Sandhu MS, Higgins JP The association between the peroxisome proliferator- activated receptor-gamma2 (PPARG2) Pro12Ala gene variant and type 2 diabetes mellitus: a HuGE review and metaanalysis. *Am J Epidemiol* 171:645–655.2010.
- HAMADA T., Kotani K., Tsuzaki K., *et al.*, “Association of Pro12Ala polymorphism in the peroxisome proliferator-activated receptor γ2 gene with small dense low-density lipoprotein in the general population,” *Metabolism: Clinical and Experimental*, 56 (10) :1345–1349, 2007.
- HARA, K.; OKADA T.; TOBE K.; YASUDA K.; MORI Y. The Pro12Ala polymorphism in PPAR gamma2 may confer resistance to type 2 diabetes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol.271, pg.212–216,2000.

- HE W. PPARgamma2 Polymorphism and Human Health PPAR Res.2009:849538. 2009
- HEIKKINEN,S.; ARGMANN,C.; FEIGE,J.N.; KOUTNIKOVA,H.; CHAMPY,M.F.; DALI-YOUCHEF,N.; SCHADT,E.E.; LAAKSO,M.; AUWERX, J. The Pro12Ala PPARγ2 Variant Determines Metabolism at the Gene-Environment Interface. *Cell Metabolism*. Vol. 9, pg.88–98, January 7, 2009.
- HUGUENIN GV, Rosa G The Ala allele in the PPARgamma2 gene is associated with reduced risk of type 2 diabetes mellitus in Caucasians and improved insulin sensitivity in overweight subjects. *Br J Nutr* 104:488–497.2010.
- IWATA E, MATSUDA H, FUKUDA T, FUKUEN S, MOTOMURA T, IGARASHI T, YAMAMOTO I, AZUMA J. Mutations of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) gene in a Japanese population : the Pro12Ala mutation in PPAR gamma 2 is associated with lower concentrations of serum total and non-HDL cholesterol *Diabetologia*. 2001;44(10):1354-5.
- JENINGA, E.H.; GURNELL, M.; KALKHOVEN, E. Functional implications of genetic variation in human PPAR [gamma]. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. Vol. 20, pg.380–387, 2009.
- KOCH M, Rett K, Maeker E *et al.*. The PPAR-γ2 amino acid polymorphism Pro12Ala is prevalent in offspring of type II diabetic patients and is associated to increased insulin sensitivity in a subgroup of obese subjects. *Diabetologia*; 42: 758–762.1999.
- LATRUFFE N, Vamecq J. Peroxisome proliferators and peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) as regulators for lipid metabolism. *Biochimie*; 79:81–94. 1997
- LINDI VI, Uusitupa MI, Lindström J, Louheranta A, Eriksson JG, Valle TT, Hämäläinen H, Ilanne-Parikka P, Keinänen-Kiukaanniemi S, Laakso M, Tuomilehto J; Finnish Diabetes Prevention Study Association of the Pro12Ala polymorphism in the PPAR-gamma2 gene with 3-year incidence of type 2 diabetes and body weight change in the Finnish Diabetes Prevention Study.*Diabetes*.51(8):2581-6. 2002
- LUAN J., Browne P. O., Harding A.-H., *et al.*., Evidence for gene-nutrient interaction at the PPARγ locus, *Diabetes*, 50(3): 686–689, 2001
- MATTEVI, V.S.; ZEMBRZUSKI, V.M.; HUTZ M.H. Effects of a PPARG gene variant on obesity characteristics in Brazil. *Braz J Med Biol Res*. Vol.40: pg.927–932, 2007.
- MEIRHAEGHE,A.; AMOUYEL, P. Impact of genetic variation of PPAR\_ in humans. *Molecular Genetics and Metabolism*. Vol.83, pg.93–102, 2004.
- MEMISOGLU A, Hu FB, Hankinson SE, Manson JE, De Vivo I, Willett WC, Hunter DJ. Interaction between a peroxisome proliferator-activated receptor γ gene polymorphism and dietary fat intake in relation to body mass.*Human Molecular Genetics* 12 ( 22): 2923–2929, 2003.
- MORI H, Ikegami H, Kawaguchi Y. The Pro12Ala substitution in PPARγ is associated with resistance to development of diabetes in the general population. *Diabetes*;50:891-4. 2001
- MORI Y, Kim-Motoyama H, Katakura T *et al.*. Effect of the Pro12Ala variant of the human peroxisome proliferator-activated receptor γ2 gene on adiposity, fat distribution, and insulin sensitivity in Japanese men. *Biochem Biophys Res Commun*; 251:195–198. 1998
- OLEFSKY, J.M. Treatment of insulin resistance with peroxisome proliferator-activated receptor γ agonists. *Journal of Clinical Investigation* 106 (4): 467–472. 2000
- ROBITAILLE J., Despres J.-P., Perusse L., Vohl M.-C.,The PPAR-gamma P12A polymorphism modulates the relationship between dietary fat intake and components of the metabolic syndrome: results from the Qu'ebec Family Study. *Clinical Genetics*. 63 ( 2):109–116, 2003.

- RUIZ-NARVAEZ E Is the Ala12 variant of the PPARG gene an “unthrifty allele”? *J Med Genet* 42:547–550 .2005.
- SCACCHI R Pinto A, Rickards O, Pacella A, De Stefano GF, Cannella C *et al.* An analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR-gamma 2) Pro12Ala polymorphism distribution and prevalence of type 2 diabetes mellitus (T2DM) in world populations in relation to dietary habits. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 17:632–641.2007.
- SPIEGELMAN BM. PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes*. 47(4):507-14. 1998
- STUMVOLL M, Haring H. The peroxisome proliferators-activated receptor-γ2 Pro12Ala polymorphism. *Diabetes*;51:2341-7. 2002
- SWARBRICK, M.M., CHAPMAN, C. M. L., MCQUILLAN, B. M., HUNG J., THOMPSON, P. L., BEILBY J. P. A Pro12Ala polymorphism in the human peroxisome proliferator-activated receptor-γ2 is associated with combined hyperlipidaemia in obesity. *European Journal of Endocrinology*. Vol. 144, pg. 277-282, 2001.
- TAVARES V, Hirata RDC, Rodrigues AC, Monte O, Salles JEN, Scallissi N, *et al.* Association between Pro12Ala polymorphism of the PPARγ2 gene and insulin sensitivity in Brazilian patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab*;7:605-11. 2005
- VACCARO O, Mancini FP, Ruffa G, Sabatino L, Iovine C, Masulli M, Colantuoni V, Riccardi G. Fasting plasma free fatty acid concentrations and Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma2 gene in healthy individuals *Clin Endocrinol*. 57(4):481-6. 2002